

Aus der  
Klinik für Pädiatrische Pneumologie, Allergologie und Neonatologie  
der Medizinischen Hochschule Hannover

**Identifikation und Charakterisierung von IL-17 und  
IL-22 produzierenden Lymphozyten in  
Lungengewebe und bronchialen Lymphknoten  
bei CF-Patienten im Vergleich zu anderen  
terminalen Lungenerkrankungen**

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin  
in der Medizinischen Hochschule Hannover

vorgelegt von  
**Sophia Theres Pallenberg**  
aus Hannover

Hannover, 2021

Angenommen vom Senat am 27.09.2021

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Hochschule Hannover

Präsident: Prof. Dr. med. Michael P. Manns

Betreuer/in der Arbeit: PD Dr. med. Anna-Maria Dittrich

1. Referent/in: PD Dr. med. Felix Ringshausen

2. Referent/in: PD. Dr. med. Matthias Lochner

Tag der mündlichen Prüfung: 27.09.2021

Prüfungsausschuss:

Vorsitz: Prof. Dr. med. Philipp Beerbaum

1. Prüfer/in: Prof.'in Dr. rer. nat Hildegard Büning

2. Prüfer/in: Prof. Dr. med. Dietrich Peest

## Abstract

Recent studies show that the  $T_H17$  pathway, particularly Interleukin (IL-)17A and 22, plays a crucial role in chronic airway inflammation in cystic fibrosis (CF). IL-17A regulates the expression of proinflammatory cytokines, while IL-22 can have both a protective or destructive role which depends among other factors on the presence of IL-17A. The aim of this study is to characterize IL-17A and IL-22 producing T-lymphocytes in endstage lung disease with a focus on their characteristics in endstage CF-lung disease.

Lymphocytes of hilar lymph nodes and lung tissue from patients undergoing lung transplantation due to endstage CF, emphysema or fibrosis and lung donors providing their tissues for transplantation into the recipient patients were isolated and restimulated. To characterize IL-17A and/or IL-22 producing T-cells ( $CD4^+$  and  $CD8^+$ ) fluorescence activated cytometry sorting (FACS)-analyses were conducted.  $T_H17$  cytokines and matrix metalloproteases (MMPs) as secreted factors involved in tissue destruction were detected by bioplex analyses of the cell supernatants.

Our FACS-data showed an increased secretion of IL-17A, IL-17F and IL-22 in CF lymph nodes compared to other disease entities and lung donor-derived lymph nodes. Within the  $CD3^+ CD4^+$  and  $CD8^+$  populations we identified IL-17A and IL-17A/IL-22 high producing CF patients in lymph nodes and lung tissue. We could also find elevated levels of IL-17A/IL-22 $^+$   $T_{naive}$  in CF lung tissue compared to tissue samples from other endstage disease entities and lung donor-derived lung tissue. Several  $T_H17$  associated cytokines, particularly pro-inflammatory (IL-1 $\beta$ , IL-31),  $T_H17$  inducible (IL-6, IL-23) and anti-inflammatory (IL-10, IL-25) cytokines, were found significantly increased in the supernatants of CF patients. Further we could show an increased expression of MMPs (MMP-7, -8) and TIMPs (TIMP-4) in CF samples compared to samples from other disease entities and lung donor-derived samples.

Our results identify various conventional T-cells and memory T-cells, especially  $T_{naive}$ , as producers of IL-17A and IL-22 in CF and show a difference between endstage lung diseases in the local cytokine network. Further we could reproduce published data on increases of  $T_H17$  lymphocytes in CF. This project will contribute to a more detailed understanding of the local cytokine network in CF and the interaction of IL-17A and IL-22 during inflammation in the lung.

# Inhaltsverzeichnis

Abstract .....	
Inhaltsverzeichnis.....	
Abbildungsverzeichnis.....	1
Tabellenverzeichnis.....	3
Abkürzungsverzeichnis.....	4
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>6</b>
<b>1.1 Zystische Fibrose .....</b>	<b>6</b>
1.1.1 Pathogenese der chronischen Inflammation bei CF.....	6
<b>1.2 Angeborene Abwehrmechanismen der Lunge.....</b>	<b>7</b>
<b>1.3 Erworbene Abwehrmechanismen der Lunge .....</b>	<b>8</b>
1.3.1 T-Lymphozyten und ihre Rolle in der adaptiven Immunität .....	8
1.3.2 Die Ausbildung der Gedächtnis-T-Zellen .....	9
1.3.3 T-Helferzellen koordinieren die angeborene und adaptive Immunabwehr .....	10
1.3.4 IL-17 und IL-22 polarisieren die angeborene und adaptive Immunantwort.....	11
1.3.5 Die Regulation des T <sub>H</sub> 17 Signalwegs .....	12
<b>1.4 Die Rolle der Matrix-Metalloproteinasen und Tissue Inhibitors of     Metalloproteinasen in CF.....</b>	<b>13</b>
<b>1.5 Pathogenese weiterer terminaler Lungenerkrankungen .....</b>	<b>14</b>
1.5.1 Die pulmonale Fibrose.....	14
1.5.2 Das Lungenemphysem.....	15
<b>1.6 Stand der Forschung.....</b>	<b>16</b>
<b>2 Zielsetzung .....</b>	<b>18</b>
<b>3 Material und Methoden.....</b>	<b>20</b>
<b>3.1 Material.....</b>	<b>20</b>
3.1.1 Chemikalien .....	20
3.1.2 Verbrauchsmaterialien.....	21
3.1.3 Geräte .....	21
3.1.4 Kommerziell erhältliche Systeme und Kits.....	22
3.1.5 Puffer, Lösungen, Nährmedium .....	22

3.1.6	Fluoreszenzmarkierte Antikörper und Fluorochrome für die Durchflusszytometrie .....	24
3.1.7	Software .....	24
3.1.8	Patientenmaterial .....	24
3.1.9	Eigenanteil der Dissertantin .....	25
<b>3.2</b>	<b>Zellbiologische Methoden .....</b>	<b>26</b>
3.2.1	Zellextraktion und Aufarbeitung .....	26
3.2.2	Restimulation der Immunzellen .....	28
<b>3.3</b>	<b>Immunbiologische Methoden .....</b>	<b>29</b>
3.3.1	Fluoreszenzbasierte Durchflusszytometrie .....	29
3.3.2	Nachweis von sezernierten Zytokinen mittels Multiplexanalyse	36
3.3.3	Nachweis von MMPs mittels Multiplexanalyse .....	38
3.3.4	Bestimmung der TNF $\alpha$ -, IL-1 $\beta$ und IL-6 Sekretion .....	38
<b>3.4</b>	<b>Statistische Methoden .....</b>	<b>40</b>
<b>4</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>41</b>
4.1	Studienpopulation .....	41
4.2	Messung der sezernierten IL-17A, IL-17F und IL-22 mittels Multiplex	44
4.2.1	Vergleich der IL-17A, IL-17F und IL-22 Sekretion in Lymphknotenzellen .....	45
4.2.2	Vergleich der IL-17A, IL-17F und IL-22 Sekretion in Lungengewebszellen .....	46
4.3	Durchflusszytometrische Analyse der IL-17A und IL-22 Produktion durch CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> und CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> T-Zellen .....	47
4.3.1	IL-17A und IL-22 Produktion durch CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> Lymphozyten aus lungendrainierenden Lymphknoten und Lungengewebe .....	47
4.3.2	IL-17A und IL-22 Produktion durch CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> Lymphozyten aus lungendrainierenden Lymphknoten und Lungengewebe .....	49
4.3.3	IL-17A/IL-22 <sup>+</sup> koproduzierende konventionelle T-Zellen in Lymphknoten bei CF .....	50
4.4	FACS-Analyse der CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> Gedächtnis-T-Zellen .....	52
4.4.1	Vergleich der Gedächtniszellen in Lymphknoten .....	52
4.4.2	Vergleich der Gedächtniszellen im Lungengewebe .....	53
4.4.3	Verteilung der Gedächtniszellen nach Lokalisation in Lunge oder Lymphknoten .....	55

4.5	Multiplexanalyse weiterer Analyten des T <sub>H</sub> 17 Signalwegs.....	58
4.6	Analyse der sezernierten MMPs und TIMPs in Lymphknoten .....	62
5	Diskussion .....	64
5.1	Zusammenfassung.....	64
5.2	Diskussion der Methoden .....	64
5.2.1	Stärken und Schwächen der Probengewinnung und Patientenmaterialien.....	65
5.2.2	Stärken und Schwächen der Probenaufarbeitung .....	67
5.2.3	Stärken und Schwächen der Datenanalyse.....	68
5.3	Diskussion der Ergebnisse .....	71
5.3.1	CF-Patientenproben zeigen eine vermehrte Sekretion von IL-17A, IL-17F und IL-22 in lungendrainierenden Lymphknoten.....	72
5.3.2	Die Produktion von IL-17A und IL-22 durch CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> und CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> T-Zellen im Vergleich.....	78
5.3.3	IL-17A und/oder IL-22 sezernierende Gedächtniszellpopulationen im Vergleich .....	82
5.3.4	Effektormechanismen der Immunabwehr zeigen eindeutige Unterschiede zwischen CF und anderen Entitäten.....	88
5.3.5	Chronisches Remodelling mit erhöhter MMP-7, MMP-8 und TIMP- 4 Konzentration als Hinweis für eine Dysbalance in CF- Lymphknoten .....	92
5.4	Gesamtausblick.....	95
6	Zusammenfassung.....	96
7	Anhang.....	97
7.1	Literaturverzeichnis .....	97
7.2	Glossar .....	101
7.2.1	Anglizismen .....	101
7.2.2	Einheiten .....	102
7.3	Danksagung.....	103
7.4	Veröffentlichungen .....	107
7.5	Lebenslauf.....	104
7.6	Erklärung nach § 2 Abs. 2 Nrn. 6 und 7.....	105

# Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b> Erster Schritt des Gatings zur Detektion von lebenden Einzelzellen anhand von Größe und Granularität, Weite und Lebend-Tod-Färbung .....	34
<b>Abbildung 2:</b> Festlegung der Gatinggrenzen mithilfe der Darstellung als Histogramm und Übertragung dieser Grenzen auf die Darstellung als mehrdimensionaler Dot Plot, demonstriert anhand des Zellmarkers CD3 .....	34
<b>Abbildung 3:</b> Gating der CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> Zellen und weitere Detektion der IL-17A und IL-22 sowie der IL-17A/IL-22 koproduzierenden CD4 <sup>+</sup> T-Zellen.....	35
<b>Abbildung 4:</b> Gating der CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> Zellen und weitere Detektion der IL-17A und IL-22 sowie der IL-17A/IL-22 koproduzierenden CD8 <sup>+</sup> T-Zellen .....	35
<b>Abbildung 5:</b> Gedächtniszell-Gating anhand der Expression von CD45RA und CCR7	35
<b>Abbildung 6:</b> Vergleich der Differenzierung der Gedächtnis-T-Zellen innerhalb der IL-17 <sup>+</sup> , IL-17A/IL-22 <sup>+</sup> und IL-22 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> T-Zellen .....	36
<b>Abbildung 7:</b> Alters- und Geschlechterverteilung der Kohorten CF, Emphysem und Fibrose .....	42
<b>Abbildung 8:</b> Mittlere Konzentrationen in pg/ml an sezernierten Interleukinen IL-17A, IL-17F und IL-22 in Lymphknoten- und Lungengewebszellen.....	44
<b>Abbildung 9:</b> Sezernierte IL-17A, IL-17F und IL-22 von Lymphknoten in CF und Kontrollen und innerhalb der einzelnen Entitäten .....	45
<b>Abbildung 10:</b> Sezernierte IL-17A, IL-17F und IL-22 von Lungenlymphozyten in CF und innerhalb der einzelnen Entitäten.....	46
<b>Abbildung 11:</b> IL-17A <sup>+</sup> , IL-22 <sup>+</sup> und IL-17A/IL-22 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> Lymphknotenzellen im Vergleich Spender zu Endstage.....	48
<b>Abbildung 12:</b> IL-17A <sup>+</sup> , IL-22 <sup>+</sup> und IL-17A/IL-22 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> Lymphknoten- und Lungengewebszellen im Vergleich.....	49
<b>Abbildung 13:</b> IL-17A <sup>+</sup> , IL-22 <sup>+</sup> und IL-17A/IL-22 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> Lymphknotenzellen im Vergleich Spender zu Endstage.....	49
<b>Abbildung 14:</b> IL-17A <sup>+</sup> , IL-22 <sup>+</sup> und IL-17A/IL-22 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> Lymphknoten- und Lungengewebszellen im Vergleich.....	50
<b>Abbildung 15:</b> Anteil der IL-17A/IL-22 koproduzierenden Lymphknotenzellen bei CF und in den Kontrollen.....	51
<b>Abbildung 16:</b> Aufteilung der IL-17A/IL-22 CF-Lymphknotenzellen nach „High Producer“ und „Low Producer“ und Vergleich mit Kontrollen in CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> Zellen und CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> Zellen .....	51
<b>Abbildung 17:</b> Anteile der T <sub>naive</sub> , T <sub>CM</sub> und T <sub>EM</sub> an IL-17A <sup>+</sup> Lymphknotenzellen.....	52

<b>Abbildung 18:</b> Anteile der $T_{naive}$ , $T_{CM}$ und $T_{EM}$ an IL-17A/IL-22 <sup>+</sup> Lymphknotenzellen ....	53
<b>Abbildung 19:</b> Anteile der $T_{naive}$ , $T_{CM}$ und $T_{EM}$ an IL-22 <sup>+</sup> Lymphknotenzellen .....	53
<b>Abbildung 20:</b> Anteile der $T_{naive}$ , $T_{CM}$ und $T_{EM}$ an IL-17A/IL-22 <sup>+</sup> Gewebezellen.....	54
<b>Abbildung 21:</b> Anteile der $T_{naive}$ , $T_{CM}$ und $T_{EM}$ an IL-17A <sup>+</sup> Gewebszellen.....	54
<b>Abbildung 22:</b> Anteil der $T_{naive}$ , $T_{CM}$ und $T_{EM}$ an IL-22 <sup>+</sup> Gewebszellen.....	54
<b>Abbildung 23:</b> Anteil der $T_{naive}$ , $T_{CM}$ und $T_{EM}$ innerhalb der CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> IL-17A <sup>+</sup> und/oder IL-22 <sup>+</sup> Populationen in Lymphozyten aus Lymphknoten und Lungengewebe von CF-Patienten.....	55
<b>Abbildung 24:</b> Anteil der $T_{naive}$ , $T_{CM}$ und $T_{EM}$ innerhalb der CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> IL-17A <sup>+</sup> und/oder IL-22 <sup>+</sup> Populationen in Lymphozyten aus Lymphknoten und Lungengewebe von Emphysepatienten.....	56
<b>Abbildung 25:</b> Anteil der $T_{naive}$ , $T_{CM}$ und $T_{EM}$ innerhalb der CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> IL-17A <sup>+</sup> und/oder IL-22 <sup>+</sup> Populationen in Lymphozyten aus Lymphknoten von Fibrosepatienten .....	56
<b>Abbildung 26:</b> Anteil der $T_{naive}$ , $T_{CM}$ und $T_{EM}$ innerhalb der CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> IL-17A <sup>+</sup> und/oder IL-22 <sup>+</sup> Populationen in Lymphozyten aus Lymphknoten von Organspendern .....	57
<b>Abbildung 27:</b> Sezernierte IL-1 $\beta$ , IL-6 und IL-10 von Lymphknotenzellen im Vergleich CF zu Kontrollen und innerhalb der einzelnen Entitäten .....	58
<b>Abbildung 28:</b> Sezernierte IL-23, IL-25 und IL-31 von Lymphknotenzellen in CF und innerhalb der einzelnen Entitäten.....	59
<b>Abbildung 29:</b> weitere sezernierte $T_H17$ Zytokine von Lymphknotenzellen in CF und innerhalb der einzelnen Entitäten.....	60
<b>Abbildung 30:</b> Sezernierte $T_H17$ Zytokine von Gewebszellen in CF, Emphysem und Fibrose .....	61
<b>Abbildung 31:</b> Sekretion von MMP-7, MMP-8 und TIMP-4 von Lymphknotenzellen in CF gegenüber Kontrollen und innerhalb der Entitäten .....	62
<b>Abbildung 32:</b> Weitere MMPs und TIMPs im Vergleich der einzelnen Entitäten .....	63

## Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1:</b> Funktion und phänotypische Marker verschiedener T-Zellpopulationen .....	10
<b>Tabelle 2:</b> Chemikalien .....	20
<b>Tabelle 3:</b> Verbrauchsmaterialien .....	21
<b>Tabelle 4:</b> Geräte .....	21
<b>Tabelle 5:</b> Kommerziell erhältliche Systeme und Kits .....	22
<b>Tabelle 6:</b> Puffer, Lösungen, Nährmedium .....	22
<b>Tabelle 7:</b> Antikörper .....	24
<b>Tabelle 8:</b> Software .....	24
<b>Tabelle 9:</b> Anzahl der analysierten Proben nach Krankheitsentität .....	25
<b>Tabelle 10:</b> Antikörperpanel für T-Zellfärbung mit Zellmarkern und Fluoreszenzfarbstoff .....	30
<b>Tabelle 11:</b> Extrazelluläre Färbung .....	31
<b>Tabelle 12:</b> Intrazellulär angefärbte Antikörper .....	32
<b>Tabelle 13:</b> Intra- und extrazellulär angefärbte Antikörper .....	32
<b>Tabelle 14:</b> Humane T <sub>H</sub> 17 Zytokin Analyten der Multiplexanalyse .....	36
<b>Tabelle 15:</b> Standardkurve der Bioplex Verdünnungsstufen .....	37
<b>Tabelle 16:</b> MMP- und TIMP-Analyten in der Multiplexanalyse .....	38
<b>Tabelle 17:</b> Eingeschlossene Patientenproben in die weitere Analyse nach Krankheitsentität mit Geschlecht, Alter bei Transplantation und Probenart .....	41
<b>Tabelle 18:</b> Histologische Besonderheiten einzelner Proben innerhalb der Entitäten mit Angabe der Häufigkeit .....	42
<b>Tabelle 19:</b> Übersicht über die verwendeten Kohorten: Endstage und Nicht-CF Kontrollen Control .....	43
<b>Tabelle 20:</b> Mittlere Konzentrationen an sezernierten IL-17A, IL-17F und IL-22 in Lymphknoten- und Lungengewebszellen der einzelnen Entitäten .....	44
<b>Tabelle 21:</b> Verteilung der Gedächtnis-T-Zellen innerhalb der zytokinpositiven Lymphozytenpopulationen – Vergleich Lungengewebe und Lymphknoten .....	86

## Abkürzungsverzeichnis

ΔF508	CF-Genmutation auf Chromosom 7q31.2
APC	Allophycocyanin, Fluoreszenzfarbstoff
ASL	<i>Airway Surface Liquid</i>
BV421	Brillant Violett 421, Fluoreszenzfarbstoff
CCR7	CC-Chemokine-Rezeptor 7
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CD45RA	CD45-Rezeptor-α
CF	Zystische Fibrose
CFTR	<i>Cystic Fibrosis Conductance Transmembrane Regulator</i>
Cl	Chlorid
COPD	chronisch obstruktive Lungenerkrankung
Cy	Cyanin, Fluoreszenzfarbstoff
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
EZM	extrazelluläre Matrix
FACS	Fluoreszenz aktivierte Zellsortierung, Durchflusszytometrie
Fc-Rezeptor	<i>Fragment Crystallisable</i> Rezeptor
FITC	Fluorescein Isothiocyanate, Fluoreszenzfarbstoff
FSC	<i>Forward Scatter</i> , Vorwärtsstreuung
G-CSF	Granulozyten Kolonie stimulierender Faktor
GM-CSF	Granulozyten Monozyten Kolonie stimulierender Faktor
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Schwefelsäure
HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i> , ELISA-Rezeptorenzym
IFN <sub>γ</sub>	Interferon γ
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IL-1R <sup>-/-</sup>	Interleukin-1 Rezeptor doppeltes Gen-Knockout
ILC	innate lymphoide Zellen
IMDM	Iscoves modifiziertes Dulbecco's Medium, Zellkulturmedium
IPF	idiopathische pulmonale Fibrose
LK	Lymphknoten
MFI	Mediane Fluoreszenz Intensität
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>

MHH	Medizinische Hochschule Hannover
MMP	Matrix-Metalloproteinasen
NK	Natürliche Killerzelle
PacO	<i>Pacific Orange</i> , Fluoreszenzfarbstoff
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PE	Phycoerythrin, Fluoreszenzfarbstoff
PerCP	Peridinin Chlorophyll, Fluoreszenzfarbstoff
PMA	Phorbol 12-myristate 13-acetate
RNA	Ribonukleinsäure
Rpm	<i>Revolutions per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Zellkulturmedium
sCD40L	löslicher CD-40 Ligand
Scnn1b-Tg	Maustyp mit CF ähnlicher Lungenerkrankung
SSC	<i>Side Scatter</i> , Seitwärtsstreuung
T <sub>CM</sub>	zentrale Gedächtnis-T-Lymphozyten
T <sub>EM</sub>	Effektor-Gedächtnis-T-Lymphozyten
TGF- $\beta$	<i>Transforming Growth Factor <math>\beta</math></i>
T <sub>H1</sub>	Typ1-T-Helferzelle
T <sub>H17</sub>	Typ17-T-Helferzelle
T <sub>H2</sub>	Typ2-T-Helferzelle
TIMP	<i>Tissue Inhibitor of Metalloproteinases</i>
TMB	Tetramethylbenzidin
T <sub>naive</sub>	naive T-Lymphozyten
TNF	Tumornekrosefaktor

# 1 Einleitung

## 1.1 Zystische Fibrose

Die *Zystische Fibrose* (CF), auch Mukoviszidose genannt, ist eine autosomal-rezessiv vererbte Multiorganerkrankung, der ein genetischer Defekt des *Cystic Fibrosis Conductance Transmembrane Regulator* (CFTR)-Gens zugrunde liegt. Dieses Gen kodiert für einen cAMP-abhängigen *Chlorid-* (Cl-) Transporter, ein Kanalprotein der apikalen Membran der Epithelzellen exokriner Drüsen. Hiervon betroffene Organe sind insbesondere die Lunge, das Pankreas, die Leber, der Gastrointestinaltrakt sowie die Schweißdrüsen und die Fortpflanzungsorgane (Elborn, 2016). In der Lunge reguliert der CFTR-Kanal die epitheliale Sekretion von Cl-Ionen und nachfolgend von Wasser in die die Atemwege auskleidende Flüssigkeitsschicht, die als *Airway Surface Liquid* (ASL) bezeichnet wird. Die korrekte Funktion des CFTRs ist essentiell für eine effiziente Säuberung der Atemwege durch das Zusammenspiel von ASL und Zilienschlag der Epithelzellen, die sogenannte *mukoziliäre Clearance* der Atemwege. (Vankeerberghen, et al., 2002)

Der angeborene Defekt im CFTR-Gen führt zu einer verminderten Cl-Sekretion und somit zu einem Anstieg der Viskosität des ASL, wodurch die Bewegung des ASL nach oral gehemmt wird und es zu einer Akkumulation des Mukus in den Atemwegen kommt. Dies bedingt eine Atemwegsobstruktion sowie in Folge chronisch bakterielle Infektionen mit verschiedenen Keimen, die einem altersspezifischen Muster folgen. (Vankeerberghen, et al., 2002) Als Leitkeim der bakteriellen Besiedlung gilt das gramnegative, ubiquitär vorkommende Bakterium *Pseudomonas aeruginosa* (Gaspar, et al., 2013). Der Körper reagiert mit einer chronischen, jedoch dysregulierten Entzündungsreaktionen in der Lunge, die zur Bildung von *Bronchiektasen* und zur Zerstörung des Parenchyms führt und damit verbunden eine progressive, schließlich lebensbedrohliche Abnahme der Lungenfunktion bedingt. (Vankeerberghen, et al., 2002) Die Entzündungsreaktion in der Lunge von Mukoviszidosepatienten umfasst verschiedene immunologische Mechanismen, die Inhalt der aktuellen Forschung sind und deren Verständnis essentiell für die weitere Entwicklung von möglichen anti-entzündlichen Therapieoptionen ist.

### 1.1.1 Pathogenese der chronischen Inflammation bei CF

Zahlreiche Störungen der physiologischen Entzündungsreaktion, wie die Dysregulation des angeborenen und des erworbenen Immunsystems, können auf den

Defekt des CFTR-Gens zurückgeführt werden. Ein defekter CFTR-Kanal führt neben der Störung der mukoziliären Clearance zu einer verminderten Bikarbonatsekretion und folglich zu einer Ansäuerung des ASL. Diese Abnahme des pH-Werts des ASL bewirkt eine Inaktivierung von antimikrobiellen Peptiden und somit eine verminderte Abwehr der Lunge gegenüber pathogenen Keimen. (Cantin, et al., 2015)

Als Reaktion auf die chronisch bakterielle Infektion, aber auch auf die Mukostase selbst (Rosen, et al., 2018), sezernieren Epithel- und Immunzellen proinflammatorische Zytokine und Chemokine, die eine massive Neutrophilenrekrutierung auslösen. Die chronische Inflammation des Lungenepithels ist gekennzeichnet durch eine bronchoalveoläre Neutrophilie und eine submuköse Lymphozytose. (Tan, et al., 2011)

Diese neutrophilen Granulozyten setzen lokal in großen Mengen Neutrophilenelastase sowie weitere Proteasen frei, welche Strukturproteine spalten und so zu Bronchiektasen führen. Gleichzeitig sezernieren sie proinflammatorische Zytokine, Chemokine und Proteasen, fördern deren Sekretion durch andere Zelltypen und halten so eine floride, chronische Entzündung aufrecht, wodurch der Progress der Erkrankung gefördert wird. (Elizur, et al., 2008)

## **1.2 Angeborene Abwehrmechanismen der Lunge**

Die physiologische Abwehrfunktion der Lunge basiert auf einem engen Zusammenwirken von Epithelzellen, extrazellulärer Matrix, Mukus sowie einer Vielzahl an Immunzellen. Das Lungenepithel bildet dabei eine natürliche Barriere gegen eine pathogene Kolonisation der Lunge und produziert den Mukus. Dieser bindet fremde Partikel und wird durch die Zilienbewegung der Epithelzellen aus der Lunge befördert. Gleichzeitig wirken in den Mukus sezernierte Peptide, wie  $\beta$ -Defensine und Lysozyme, stark antimikrobiell. Erreger, die dennoch bis in die Alveolen vordringen, werden dort von residenten Alveolarmakrophagen eliminiert. In das Lungengewebe vordringende Pathogene werden schließlich von neutrophilen Granulozyten, die in hohem Maß in der Frühphase der Abwehrreaktion in das Lungengewebe rekrutiert werden, durch Phagozytose und sezernierte, zytotoxische Mediatoren eliminiert. Die angeborene Immunität agiert vorrangig direkt am Ort der Infektion und demnach im Lungengewebe selbst. Gelingt es nicht, Erreger bereits durch das angeborene Immunsystem zu eliminieren, werden Zellen und Effektormechanismen des erworbenen, adaptiven Immunsystems zentral in den Lymphknoten aktiviert und in die Lunge rekrutiert. (Murphy, et al., 2018)

### 1.3 Erworbene Abwehrmechanismen der Lunge

Insbesondere bei Vorliegen von persistierenden Entzündungen oder Infektionen, wie dies bei verschiedenen chronischen Lungenerkrankungen wie CF oder Emphysem der Fall ist, übernehmen Zellen und Effektormechanismen des erworbenen Immunsystems zentrale Funktionen. Diese adaptive Immunität braucht im Gegensatz zu dem unmittelbar nach Antigenkontakt einsetzenden angeborenen Immunsystem mehrere Tage, um sich zu entwickeln, kann dann jedoch antigenspezifisch und somit hochwirksam interagieren und ein langwirksames immunologisches Gedächtnis ausbilden. Die Hauptakteure der adaptiven Immunantwort bilden die T-Lymphozyten und B-Lymphozyten. B-Lymphozyten sind Zellen der humoralen Immunabwehr und reagieren auf eine Aktivierung durch extrazelluläre Pathogene mit einer Differenzierung in aktive Plasmazellen und mit einer Sekretion von antigenspezifischen Antikörpern. (Murphy, et al., 2018)

#### 1.3.1 T-Lymphozyten und ihre Rolle in der adaptiven Immunität

Die zelluläre Immunantwort des adaptiven Immunsystems wird hauptsächlich durch T-Lymphozyten gesteuert, die durch die Expression definierter immunphänotypischer Oberflächenmerkmale, den *Cluster of Differentiation* (CD) 3 sowie CD4 oder CD8, abhängig von den jeweiligen Subtypen, gekennzeichnet sind. *Naive T-Zellen* ( $T_{\text{naive}}$ ) finden sich insbesondere in den sekundär lymphatischen Organen wie den Lymphknoten und werden durch den Kontakt mit Antigenen durch die antigenpräsentierenden Zellen oder die Erkennung von *Major Histocompatibility Complex* (MHC)-Molekülen auf der Oberfläche von infizierten Zellen aktiviert. Nach Antigenkontakt entwickeln sie sich zu T-Effektor-Lymphozyten, die in mehrere Typen unterteilt werden. Hierzu zählen die zytotoxischen T-Effektorzellen ( $CD3^+ CD8^+$ ), die mit Viren oder intrazellulären Bakterien befallene Zellen, die Antigene dieser Krankheitserreger an ihrer Zelloberfläche präsentieren, töten. T-Helferzellen ( $CD3^+ CD4^+$ ) dagegen liefern Signale, häufig in Form von spezifischen Zytokinen und *Interleukinen* (IL), die andere Immunzellen aktivieren und so zur Beseitigung von Pathogenen beitragen. Die regulatorischen T-Zellen ( $CD3^+ CD4^+$ ) unterdrücken die Aktivität anderer Lymphozyten und kontrollieren somit die Immunabwehr. Zudem entwickeln sich einige Lymphozyten nach Antigenkontakt zu Gedächtnis-T-Zellen und bilden eine langanhaltende Immunität gegen spezifische Krankheitserreger. (Murphy, et al., 2018)

### 1.3.2 Die Ausbildung der Gedächtnis-T-Zellen

Durch die Aktivierung der adaptiven Immunität kann eine langanhaltende Immunität gegen spezifische Erreger ausgebildet werden. Hierzu können sowohl die B-Lymphozyten als auch die T-Lymphozyten Gedächtniszellen ausbilden, die bei erneutem Antigenkontakt schnell und spezifisch agieren und eine erneute Infektion mit einem vorbekannten Erreger verhindern können. Nach Aktivierung der  $T_{naive}$  in den lymphatischen Organen erfolgt die Ausbildung von T-Effektorzellen und Gedächtnis-T-Zellen, die  $CD3^+ CD4^+$  oder  $CD3^+ CD8^+$  sein können. (Murphy, et al., 2018)

Im Laufe des Lebens finden verschiedene Stadien der Gedächtnisausbildung statt. Zum Zeitpunkt der Geburt finden sich ausschließlich  $T_{naive}$  im peripheren Blut. Durch Antigenkontakt in den ersten zwei Lebensdekaden wird das immunologische Gedächtnis ausgebildet, sodass zum Ende der zweiten Dekade Gedächtnis-T-Zellen bis zu 35% der T-Zellen im peripheren Blut ausmachen. Es folgt eine lange Phase der Homöostase, in der durch Zellaustausch die Menge der Gedächtnis-T-Zellen aufrechterhalten wird. (Farber, et al., 2014)

Die Subtypen der Gedächtnis-T-Zellen, die durch die fehlende Expression des Oberflächenmarkers *CD45-Rezeptor- $\alpha$*  (CD45RA) von  $T_{naive}$  abgegrenzt werden, können anhand der Expression des für Lymphknoten spezifischen *CC-Chemokine-Rezeptors 7* (CCR7) in weitere Subtypen differenziert werden.  $T_{naive}$  ( $CD45RA^+ CCR7^+$ ) exprimieren den CCR7 einheitlich als Zeichen für ihre Lokalisation in lymphoiden Geweben. Gedächtnis-T-Zellen können anhand dieses Markers in  $CD45RA^- CCR7^+$  *zentrale Gedächtnis-T-Zellen* ( $T_{CM}$ ), die vorwiegend in Lymphknoten wirken, und  $CD45RA^- CCR7^-$  *Effektor-Gedächtnis-T-Zellen* ( $T_{EM}$ ), die in multiple periphere Gewebe migrieren, unterteilt werden. Eine Effektorfunktion kann jedoch bei beiden Subtypen beobachtet werden, da beide Zellreihen als Antwort auf Viren, Antigene oder andere Stimuli mit der Sekretion von Zytokinen reagieren.  $T_{CM}$  zeigen dabei eine höhere proliferative Kapazität. (Farber, et al., 2014) Tabelle 1 gibt einen Überblick über die verschiedenen T-Lymphozyten, ihre Funktion und phänotypische Zellmarker (Tab.1).

Im peripheren Blut von gesunden Individuen produzieren die meisten Gedächtnis-T-Zellen *Interferon  $\gamma$*  ( $IFN\gamma$ ), IL-2 und *Tumornekrosefaktor-alpha* (TNF $\alpha$ ) nach Stimulation, wohingegen nur ein geringer Anteil der  $CD3^+ CD4^+$  Gedächtnis-T-Zellen IL-4, IL-10 oder IL-17 produziert (Farber, et al., 2014).

**Tabelle 1: Funktion und phänotypische Marker verschiedener T-Zellpopulationen**

Population	Funktion	Zellmarker
T <sub>naive</sub>	naiv, vor Antigenkontakt	CD3 <sup>+</sup> (CD4 <sup>+</sup> oder CD8 <sup>+</sup> ) CCR7 <sup>+</sup> CD45RA <sup>+</sup>
CD8 <sup>+</sup> T-Zellen	zytotoxisch	CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>
CD4 <sup>+</sup> T-Zellen	T-Helferzellen	CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>
- T <sub>H1</sub>	produziert als Leitzytokin IFN $\gamma$	
- T <sub>H2</sub>	produziert als Leitzytokine IL-4, IL-5, IL-13	
- T <sub>H17</sub>	produziert als Leitzytokine IL-17A, IL-17F, IL-22	
T <sub>CM</sub>	zentrale Gedächtnis-T-Lymphozyten	CD3 <sup>+</sup> (CD4 <sup>+</sup> oder CD8 <sup>+</sup> ) CD45RA <sup>-</sup> CCR7 <sup>+</sup>
T <sub>EM</sub>	Effektor-Gedächtnis-T-Lymphozyten	CD3 <sup>+</sup> (CD4 <sup>+</sup> oder CD8 <sup>+</sup> ) CD45RA <sup>-</sup> CCR7 <sup>-</sup>

### 1.3.3 T-Helferzellen koordinieren die angeborene und adaptive Immunabwehr

Bereits seit Mitte der 1980er Jahre werden Immunzellantworten der T-Zellen des adaptiven Immunsystems nach dem vorrangig sezernierten Zytokinmuster der *T-Helferzellen* (T<sub>H</sub>), unterschieden. T<sub>H</sub> sind durch die Oberflächenexpression des T-Zellrezeptors CD3 und des Ko-Rezeptors CD4 gekennzeichnet und sind zentral für die Unterhaltung von chronischen Entzündungsreaktionen. Historisch erfolgte in den 80er Jahren des letzten Jahrhunderts zunächst eine dichotome Unterscheidung der T-Helferzellantworten in die zellulär vermittelte Typ-1 Reaktion zur Abwehr intrazellulärer Pathogene und in die humorale Typ-2 Reaktion, die der Abwehr extrazellulärer Erreger und Parasiten dient. (Mosmann, et al., 1986) Erstere umfasst die Produktion von Zytokinen wie Interferon  $\gamma$ , Interleukin 2, TNF und Lymphotoxin- $\alpha$  durch *Typ1-T-Helferzelle* (T<sub>H1</sub>) und agiert gegen Pathogene, die in Makrophagen überleben können, wie z.B. bestimmte Viren, Protozoen und intrazelluläre Bakterien wie Mykobakterien. Effektorzellen, die in die T<sub>H1</sub> Reaktion eingebunden sind, sind v.a. neutrophile Granulozyten, natürliche Killerzellen und Makrophagen. Die Typ-2 Reaktion wird durch *Typ2-T-Helferzelle* (T<sub>H2</sub>) bestimmt, deren Hauptzytokinprodukte die Interleukine IL-4, IL-5, IL-9 und IL-13 sind. Effektorzellen sind eosinophile Granulozyten, Mastzellen sowie B-Lymphozyten, in denen ein Isotypenwechsel zu *Immunglobulin* (Ig) E angeregt wird. Hierdurch kann eine Infektion mit extrazellulären Parasiten, wie Helminthen, unter Kontrolle gebracht werden. (Murphy, et al., 2018)

Diese dichotome Unterscheidung der T-Helferzellen wurde vor einigen Jahren durch die *Typ17-T-Helferzelle* (T<sub>H17</sub>) erweitert, die die Typ-3 Reaktion triggern. T<sub>H17</sub>

werden als Reaktion auf extrazelluläre Bakterien, wie *Pseudomonas aeruginosa*, und Pilze, wie *Aspergillus fumigatus*, induziert und initiiert und unterhalten durch ihre Zytokine IL-17A, IL-17F und IL-22 die Reaktion und Rekrutierung von neutrophilen Zellen sowie die Produktion von opsonisierenden IgG2 und IgG3 Antikörpern durch B-Zellen. Gleichzeitig werden im Rahmen der Typ-3 Reaktion die Barriere bildenden Epithelzellen in den Atemwegen aktiviert und zur Bildung von antimikrobiellen Peptiden zur Abwehr von Pathogenen angeregt. Effektorzellen sind Neutrophile, Stromazellen, Epithelzellen und myeloische Zellen. (Murphy, et al., 2018)

#### 1.3.4 IL-17 und IL-22 polarisieren die angeborene und adaptive Immunantwort

Die Zytokine IL-17A und IL-22 koordinieren die pulmonale Immunantwort und sind zentral für die frühe Infektionsabwehr gegenüber verschiedenen extrazellulären Pathogenen, u.a. *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* und *Aspergillus fumigatus*, die zu den Leitkeimen bei CF zählen. Diese zentrale Rolle üben die Zytokine durch verschiedene Effektormechanismen aus. T<sub>H</sub>17 werden zur Freisetzung von IL-17A und IL-17F stimuliert, sobald sie an Infektionsherden auf Antigene treffen. IL-17A und IL-22 wirken beide auf das Lungenepithel, wo sie die Sekretion antimikrobieller Peptide auslösen und so Bakterien, die an das Lungenepithel geheftet sind, direkt töten können. IL-17A fördert außerdem die Neutrophilenrekrutierung an den Ort des Entzündungsgeschehens durch die Stimulation von lokalen Stroma- und Epithelzellen zur Ausschüttung von Chemokinen. Gleichzeitig werden diese Zielzellen durch IL-17A zur Produktion des *Granulozyten Kolonie stimulierenden Faktors* (G-CSF) angeregt, wodurch die Neubildung von Neutrophilen im Rückenmark stimuliert wird. (Murphy, et al., 2018)

Die Neutrophilen können vor Ort durch Phagozytose und Sekretion zytotoxischer Substanzen aufgenommene Erreger eliminieren (Kolls, et al., 2008).

IL-17A stimuliert zusätzlich Makrophagen und Dendritische Zellen, die als antigenpräsentierende Zellen die Lymphozyten der adaptiven Immunantwort aktivieren und ihr Zytokinprofil polarisieren. Dendritische Zellen, die mit Bakterien oder Pilzen stimuliert werden, sezernieren IL-1 $\beta$  und IL-23, beides potente Induktoren für die Proliferation von weiteren T<sub>H</sub>17, wodurch eine positive Verstärkung der IL-17A und IL-22 Sekretion erfolgt. IL-22 fördert die epitheliale Proliferation und Reparatur des Gewebes nach Verletzungen. Durch die verstärkte Teilung und Ablösung der Epithelzellen wird die Besiedlung von mukosalen Oberflächen durch Bakterien gestört. (Murphy, et al., 2018)

### 1.3.5 Die Regulation des T<sub>H</sub>17 Signalwegs

Neben IL-17A und IL-22 gibt es weitere Zytokine, die den T<sub>H</sub>17 Signalweg auf direkte oder indirekte Weise beeinflussen. Hierzu zählen unter anderem IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-6, IL-10, IL-21, IL-23, IL-25, IL-31, IL-33, IFN $\gamma$ , *löslicher CD-40 Ligand* (sCD40L) und TNF $\alpha$ , die wir in dieser Arbeit in einem Multiplextestsystem, einem sogenannten *bioplex assay* untersucht haben. Diese Mediatoren greifen in unterschiedlichem Maße in den komplexen Signalweg ein und geben so Hinweise auf die Regulation des IL-17A getriggerten Entzündungsgeschehens. (Gaffen, et al., 2014)

IL-1 $\beta$  ist ein Interleukin, das primär mit akuter und chronischer Inflammation assoziiert ist, da der IL-1 Rezeptor eine TOLL-IL-1-Rezeptor Domäne besitzt und so, vergleichbar mit den *Toll-Like* Rezeptoren des innatens Immunsystems, auf mikrobielle Produkte und Viren reagieren kann. IL-1 $\beta$  dient als therapeutischer Angriffspunkt für eine antiinflammatorische Therapie zahlreicher autoimmuner Erkrankungen. Eine Antagonisierung von IL-1 $\beta$  kann dabei eine effektive Minderung der Erkrankungsschwere erwirken. (Dinarello, 2011) IL-23 trägt eine große Bedeutung in der Pathogenese autoimmunologischer Prozesse, insbesondere zahlreiche innafe Immunzellen, wie  $\gamma\delta$ T-Zellen, natürliche Killerzellen und *innate lymphoide Zellen* (ILCs) reagieren auf IL-23. Eine Stimulation von T<sub>H</sub>17 mit IL-1 $\beta$  oder IL-23 induziert eine lokale Gewebsentzündung durch Ausschüttung von IL-17A, IL-17F, IL-22, IL-10, IFN $\gamma$  und *Granulozyten Monozyten Kolonie stimulierenden Faktor* (GM-CSF). Während eine Stimulation der T<sub>H</sub>17 mit dem eher protektiv wirkenden IL-6 die mukosale Abwehr sowie die Integrität der Schleimhautbarriere fördert und die Immunantwort begrenzt, führt die Stimulation mit IL-23 zu der Entwicklung einer chronischen Inflammation im Gewebe, der Formation von Granulomen und der Ausbildung von Autoimmunität. (Gaffen, et al., 2014)

In der frühen Prägung der T<sub>naive</sub> führt die Stimulation mit IL-6 zu einer Aktivierung von T<sub>H</sub>17 zelllinienspezifischen Genen und somit zur Ausbildung von T<sub>H</sub>17. In Mausmodellen zeigten *IL-6*<sup>-/-</sup> Mäuse sogar die Unfähigkeit zur Ausbildung einiger T<sub>H</sub>17-assoziiertes autoimmuner Erkrankungen, sodass anti-IL-6 als Therapie dieser entzündlichen Erkrankungen dienen kann. (Gaffen, et al., 2014)

IL-10 ist essentiell für die Aufrechterhaltung der Integrität und Homöostase von epitheliale Gewebe, indem es die angeborene Immunantwort zur Begrenzung von Gewebsschäden durch virale oder bakterielle Infektion steuert und gleichzeitig die Reparatur des Gewebes nach Inflammation erleichtert. IL-10 kann eine übermäßige

Entzündungsreaktion unterbinden und stellt somit ein protektives, antiinflammatorisches Zytokin dar. (Ouyang, et al., 2011)

Die Produktion von IL-25 (auch IL-17E genannt) durch epitheliale oder myeloische Zellen wird durch Parasiten und Allergene getriggert und führt zur Aktivierung einer  $T_H2$ - Immunantwort durch Typ2-T-Helferzellen und ILC2s, wohingegen die  $T_H1$  und  $T_H17$  Antwort eher unterdrückt werden. Im Gegensatz zu IL-17A, welches eine Vielzahl an Immunzellen aktiviert, begrenzt sich die Wirkung von IL-25 auf hämatopoetische Zellen, die  $T_H2$  Zytokine wie IL-4, IL-5, IL-9 and IL-13 sezernieren. (Song, et al., 2016)

IL-4 wird hauptsächlich durch T-Zellen, Mastzellen und ILC2s produziert und bewirkt eine B-Zell-Aktivierung und einen IgE-Wechsel sowie eine Induktion der Differenzierung zu  $T_H2$ . IL-33 wird durch Endothelzellen, glatte Muskelzellen und Epithelzellen sezerniert und induziert  $T_H2$  assoziierte Zytokine wie IL-4, IL-5 und IL-13. (Murphy, et al., 2018)

Die Sekretion von IL-21 erfolgt vorwiegend durch  $T_H2$  und sich entwickelnde  $T_H17$ . Es induziert die Proliferation von B- und T-Lymphozyten und *Natürlichen Killer* (NK)-Zellen. (Murphy, et al., 2018)

IL-31 ist ein bisher wenig untersuchtes Zytokin, welches hauptsächlich durch  $CD3^+ CD4^+ T_H2$  die Sekretion proinflammatorischer Zytokine induziert, die Zellproliferation reguliert und in *Airway Remodelling* Prozessen involviert ist. (Di Salvo, et al., 2018)

IFN $\gamma$ , durch eine Vielzahl an Immunzellen gebildet, aktiviert Makrophagen, erhöht die Expression von MHC-Molekülen, führt zu einem Ig-Klassenwechsel und hemmt  $T_H2$  und  $T_H17$ . sCD40L wird durch T-Zellen und Mastzellen sezerniert und bewirkt eine B-Zell Aktivierung und einen Isotypenwechsel von Antikörpern. Der durch Makrophagen, NK-Zellen und T-Zellen sezernierte TNF $\alpha$  wirkt hingegen allgemein proinflammatorisch und aktiviert das Endothel. (Murphy, et al., 2018)

#### **1.4 Die Rolle der Matrix-Metalloproteinasen und *Tissue Inhibitors of Metalloproteinasen* in CF**

Das progressive *Airway Remodelling*, die strukturelle Umbildung der Atemwege, stellt eine Hauptursache für die erhöhte Morbidität und Mortalität in CF dar. Der strukturelle Schaden beruht hierbei auf vermehrter freier proteolytischer Aktivität durch sezernierte Serin-Proteasen (z.B. Elastase) und *Matrix-Metalloproteasen* (MMPs) durch

Neutrophile und Makrophagen. MMPs werden unterteilt in über 20 verschiedene Subgruppen mit variablen Eigenschaften, gemeinsam ist ihnen jedoch ihre physiologische Beteiligung an zahlreichen Prozessen der Homöostase sowie eine Zunahme der proteolytischen Aktivität während Inflammation und Remodelling. Die Regulation erfolgt über verschiedene Zytokine wie IL-1 und TNF $\alpha$ . Gleichzeitig gibt es sowohl unspezifische wie auch spezifische Inhibitoren der MMPs, zu letzterem gehören die *Tissue Inhibitors of Metalloproteinases* (TIMPs). Mit zunehmendem Lebensalter und im fortgeschrittenen Krankheitsverlauf steigt die proteolytische Aktivität durch die MMPs, die antiproteolytische Kapazität der Atemwege wird überschritten und es kommt zur chronisch progressiven Destruktion des Lungenparenchyms. In einer Vielzahl pulmonaler Erkrankungen, wie der *chronisch obstruktiven Lungenerkrankung* (COPD) oder dem Asthma bronchiale, konnte bereits eine Dysbalance zwischen MMPs und TIMPs als Pathomechanismus für pulmonales Remodelling nachgewiesen werden. (Gaggar, et al., 2011)

## 1.5 Pathogenese weiterer terminaler Lungenerkrankungen

### 1.5.1 Die pulmonale Fibrose

Neben CF stellt die pulmonale Fibrose eine weitere chronische Lungenerkrankung dar, die zu terminalem Lungenversagen führt, und somit eine häufige Transplantationsursache darstellt. Die Erkrankung ist charakterisiert durch die übermäßige Akkumulation von extrazellulärer Matrix und einem Remodelling der Lungenarchitektur. Es gibt verschiedene Formen, wie die diffuse fibrosierende Alveolitis, die diffuse interstitielle Fibrose und die *idiopathische pulmonale Fibrose* (IPF). Insbesondere letztere ist mit einer schlechten Prognose assoziiert, wobei mit einem medianen Überleben von 3 Jahren gerechnet werden kann. Die Lungentransplantation stellt die einzige kurative Therapieoption dar. (Todd, et al., 2012)

Die Ätiologie der Erkrankung bildet eine Kombination zweier Pathomechanismen mit gestörter physiologischer Funktion nach einer vorrangegangenen Gewebsschädigung: Zunächst ist die Proliferation und die Apoptose von Fibroblasten zugunsten der Proliferation, insbesondere der Myofibroblasten, verschoben. Gleichzeitig kommt es zu einer vermehrten Akkumulation und einem verminderten Abbau von *extrazellulärer Matrix* (EZM), die durch Fibroblasten und andere pulmonale Zellen gebildet wird, sowie einem Verlust von Alveolarepithelzellen. Eine mögliche Ursache für diesen Prozess ist sowohl das akute wie auch chronische Entzündungsgeschehen in der

Lunge, welches durch die Präsenz von inflammatorischen Zytokinen und einer Vielzahl an Immunzellen bereits mehrfach nachgewiesen werden. (Todd, et al., 2012) Im Mausmodell konnte nach Bleomycin-induzierter Lungenschädigung und daraus resultierender pulmonaler Fibrose außerdem eine Hochregulation des IL-17A als proinflammatorisches Zytokin nachgewiesen wurde. Außerdem induzierte eine exogene Zufuhr von IL-17A in vivo eine Fibrosebildung bei Mäusen. Bei Patienten mit pulmonaler Fibrose zeigte sich IL-17A ebenfalls hochreguliert. (Wilson, et al., 2010)

Weitere Studien suggerieren jedoch, dass diese Inflammation keine Schlüsselrolle in der pulmonalen Fibrose spielt, da antiinflammatorische Therapien, insbesondere mit Corticosteroiden, ineffektiv in der Verbesserung der Lungenfunktion oder dem medianen Überleben sind. (Richeldi, et al., 2003)

### **1.5.2 Das Lungenemphysem**

Neben der pulmonalen Fibrose stellt das Lungenemphysem als destruktive chronische Lungenerkrankung eine der häufigsten Ursachen für eine Lungentransplantation dar. Die Erkrankung tritt durch eine Schädigung des Lungengewebes durch Zigarettenrauch, insbesondere im Rahmen einer COPD, und Luftverschmutzung auf und hat ein mittleres Erkrankungsalter zwischen 45-60 Jahre. Es kommt zu einer definitionsgemäßen Vergrößerung des Atemraums durch eine Destruktion des Lungenparenchyms. Dies geschieht durch die Zerstörung epithelialer und endothelialer Zellen in den Alveolen durch proteolytische Enzyme. (Taraseviciene-Stewart, et al., 2008) Es konnte außerdem eine Beteiligung des adaptiven Immunsystems gezeigt werden. In der Anwesenheit von pathogenetischen CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen sowie nach Transfer dieser Zellen in die Lunge im Mausmodell kam es zur Entwicklung eines Emphysems. Bei einem Mangel an CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen blieb diese Entwicklung dagegen aus. (Taraseviciene-Stewart, et al., 2005)

## 1.6 Stand der Forschung

IL-17A spielt eine wichtige Rolle in zahlreichen entzündlichen Lungenerkrankungen. Eine gesteigerte Sekretion wurde bereits in CF und COPD nachgewiesen (Di Stefano, et al., 2009). Aujla et al. konnten außerdem eine vermehrte Sekretion von IL-17A durch lungendrainierende Lymphknoten in CF im Vergleich zu Nicht-CF Patienten nach Stimulation mit Concanavalin A zeigen (Aujla, et al., 2008). Weitere Untersuchungen brachten die  $T_H17$  als IL-17A Produzenten mit pulmonaler Exazerbation und Neutrophilie in CF in Verbindung und demonstrierten, dass eine Infektion mit *Pseudomonas aeruginosa*, einem extrazellulären Bakterium und damit einem Angriffspunkt der  $T_H17$  Reaktion, zur Exazerbation bei CF führen kann (Dubin, et al., 2011). Dubin et al. zeigten weiterhin, dass CF Patienten mit aktiver *Pseudomonas aeruginosa* Infektion erhöhte Level an  $T_H17$  assoziierten Zytokinen im Sputum aufwiesen. Das  $T_H17$  induzierende Zytokin IL-23 wurde dabei als maßgeblicher Triggerfaktor einer *Pseudomonas aeruginosa* induzierten pulmonalen Inflammation beschrieben. (Dubin, et al., 2007)

In CF resultiert die Unfähigkeit zur Beseitigung einer *Pseudomonas aeruginosa* Infektion, die durch Abnormalitäten im ASL und der Zilienfunktion bedingt ist, in einer persistierenden Aktivierung von Entzündungssignalwegen, die eine chronische IL-17A Produktion und damit die Entwicklung des  $T_H17$  Phänotyps bewirken. Trotz chronischer Neutrophilenaktivierung wird keine effektive Elimination der Erreger erreicht, wodurch weiteres Neutrophilenrekrutment sowie eine chronische Entzündungsreaktion gefördert werden. (Dubin, et al., 2011)

Im Mausmodell zeigten Iannitti et al., dass eine  $T_H17$  Antwort auch die *Clearance* von *Aspergillus fumigatus* in der Lunge verminderte und so zur allergischen bronchopulmonalen Aspergillose führte, wodurch eine Exazerbation in CF getriggert werden kann. (Iannitti, et al., 2013) Kushwah et al. wiesen in ihren Versuchen nach, dass  $T_{naive}$  in CF Patienten und CFTR<sup>-/-</sup> Mäusen, im Vergleich zu anderen Helfer-T-Zelllinien, eine angeborene Prädisposition zur Differenzierung zu  $T_H17$  Zellen zeigen (Kushwah, et al., 2013).

Die Arbeit von Chan et al., die die IL-17A Produktion in humanen Lymphknoten und Lungengewebe bei CF und Nicht-CF Patienten nach Stimulation mit *Pseudomonas aeruginosa*, *Aspergillus* Spezies und *Candida* Spezies untersuchte, konnte einen starken IL-17A Phänotyp und vermehrt IL-17A/IL-22 koproduzierende T-Zellen in CF nachweisen. Zusätzlich zeigte sich eine gesteigerte  $T_H17$  Antwort in

lungendrainierenden Lymphknoten ohne Steigerung im Lungengewebe selbst. (Chan, et al., 2013)

Eine Erhöhung verschiedener MMPs konnten in ersten Untersuchungen von Atemwegsepithel, Sputum und Serum bei CF nachgewiesen werden, u.a. die MMP-7 in Atemwegsepithelien (Dunsmore, et al., 1998) sowie die MMP-8 im Sputum und Serum (Ratjen, et al., 2002) von CF-Patienten. Vergleichbar mit anderen chronischen pulmonalen Erkrankungen wird auch bei CF eine Dysbalance zwischen MMPs und TIMPs erwartet, genauere Untersuchungen stehen hier bisher noch aus (Gaggar, et al., 2011).

Erst kürzlich konnte unsere Arbeitsgruppe in einem Kooperationsprojekt die erhöhte Produktion von IL-17A durch innate und adaptiven Lymphozyten in der Lunge und im Blut von CF Patienten zeigen. Im Mausmodell sahen wir eine durch IL-17A gesteigerte Neutrophilenrekrutierung, Atemwegsinfektion und strukturelle Lungenschädigung in Mäusen mit CF-ähnlicher Lungenerkrankung. (Hagner, et al., 2020)

## 2 Zielsetzung

In der aktuellen Literatur finden sich zunehmend Hinweise für eine Beteiligung des IL-17A bei verschiedenen Lungenerkrankungen. Die Rolle des T<sub>H</sub>17 Signalweges bei der Abwehr pneumotroper Bakterien und Viren, bei nicht-entzündlichen Prozessen sowie Fibrosierungsvorgängen der Lunge rückt aktuell stärker in den Fokus der Forschung. Zunächst wurden die klassischen T-Zellen als IL-17A Produzenten erkannt, zunehmend werden auch weitere IL-17A produzierende Lymphozytenpopulationen beschrieben. Bisher ist jedoch noch unklar, in welchem Rahmen die Prozesse um die Interleukine 17 und 22 und den damit verbundenen Signalwegen am chronischen Entzündungsprozess der Lunge bei Zystischer Fibrose beteiligt und ob hier relevante Unterschiede zu anderen Lungenerkrankungen oder Lungengesunden zu finden sind.

Als internationales Transplantationszentrum verfügt die Medizinische Hochschule Hannover über eine hohe Fallzahl an Lungentransplantationen pro Jahr, wodurch uns der Zugang zu humanem Lungen- und Lymphknotenmaterial von transplantationspflichtigen *endgradigen Lungenerkrankungen* (Endstage) möglich wurde. Aufgrund der Vielzahl an Proben, die wir zur Verfügung hatten, konnten wir einen Vergleich zwischen IL-17A produzierenden Zellsubpopulationen und dem Zytokinprofil von Lymphozyten im Material von CF Patienten und weiteren Lungenerkrankungen im Endstadium, wie Emphysem und Fibrose, sowie zu weitgehend lungengesunden Organspendern ziehen. Hauptziel dieser Dissertation ist es, die Produktion von IL-17A und IL-22 durch verschiedene Subpopulationen der konventionellen CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> und CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen der erworbenen Immunantwort in vivo in lungendrainierenden Lymphknoten und Lungengewebe zu klassifizieren. Es erfolgte der Vergleich zwischen Proben von CF-Patienten und Proben von Patienten mit Fibrose oder Emphysem, sowie im Fall der Lymphknotenproben mit lungengesunden Organspendern. Zur Detektion von Unterschieden zwischen CF und den anderen Entitäten fassten wir diese zunächst als *Kontrollen* zusammen. Gleichzeitig verglichen wir lungengesunde Spender mit den drei endgradigen Lungenerkrankungen, zusammengefasst als *Endstage*.

Für eine umfassende Analyse gliederten wir unseren Ansatz in drei Kernhypothesen:

1. Die Sekretion von IL-17A, IL-17F und IL-22 durch Lymphknoten- und Lungengewebszellen unterscheidet sich quantitativ zwischen CF und den anderen Entitäten.

2. Bei CF erfolgt die Produktion von IL-17A und/oder IL-22 durch andere T-Zellen-Subpopulationen des erworbenen Immunsystems, u.a. durch verschiedene Gedächtnis-T-Zellen.

3. Die Effektormechanismen einer Immunabwehr, insbesondere die Sekretion weiterer Zytokine des T<sub>H</sub>17 Signalweges, und die Produktion von MMPs und TIMPs variiert zwischen CF und den anderen Entitäten.

Hierzu isolierten wir Lymphozyten aus lungendrainierenden Lymphknoten sowie Lungengewebe und bestimmten anschließend durchflusszytometrisch verschiedene T-Zellpopulationen und ihre IL-17A/IL-22 Produktion. Ergänzend wurden die isolierten Zellen zur Sekretion von Zytokinen stimuliert und es erfolgte die quantitative Bestimmung von IL-17A, IL-17F, IL-22, verschiedenen weiteren am T<sub>H</sub>17 Signalweg beteiligten Zytokinen sowie MMPs und TIMPs mittels Immunoassay.

Ein wesentliches Ziel unserer Arbeit ist es, die Entzündungsprozesse der Lunge bei CF besser zu verstehen, insbesondere durch die Identifikation der Hauptakteure der T<sub>H</sub>17 Immunantwort und durch differenzierte Erkenntnisse über das Zytokinprofil der Lunge, um hierdurch langfristig neue Therapieansatzpunkte zu finden. Das detaillierte Verständnis des T<sub>H</sub>17 und IL-17A Signalwegs ist dabei notwendig, um eine mögliche direkte oder indirekte Anti-IL-17A Therapie zur Prävention inflammationsbedingter Lungenschädigung zu evaluieren. Hierzu bedarf es der Identifikation und der weiteren Charakterisierung von IL-17A und IL-22 produzierenden Lymphozytenpopulationen sowie dem Verständnis des komplexen Zytokinnetzwerkes der Lunge.

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Material

#### 3.1.1 Chemikalien

*Tabelle 2: Chemikalien*

Bezeichnung	Bezugsquelle
Amphotericin B	Sigma
DNAse	Sigma
EDTA	Roth
Ethanol	Chemsolute
FCS	Lonza
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Chemsolute
IMDM	Lonza
Ionomycin	Sigma
KCl (Kaliumchlorid)	Merck
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Kaliumdihydrogenphosphat)	Roth
KHCO <sub>3</sub> (Kaliumhydrogencarbonat)	Roth
Kollagenase Typ III	Worthington
L-Glutamin	Gibco
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (Dinatriumhydrogenphosphat)	Roth
NaCl (Natriumchlorid)	Roth
NaN <sub>3</sub> (Natriumazid)	Merck
NH <sub>4</sub> Cl (Ammoniumchlorid)	Sigma
PBS	Sigma
PenStrep	Biochrom
PMA	Sigma
Polysorbat 20	BioLegend
RPMI 1640	Lonza
Sputolysin <sup>®</sup> (Dithiothreitol)	Milipore
Trypanblau	Gibco
Voriconazol	Sigma

β-Mercaptoethanol	Sigma
-------------------	-------

### 3.1.2 Verbrauchsmaterialien

*Tabelle 3: Verbrauchsmaterialien*

Bezeichnung	Bezugsquelle
Aluminiumfolie	CeDo
Biobankröhrchen	ThermoFisher Scientific
FACS-Röhrchen 5ml	BD
Mikrotiterplatte	Sarstedt
Parafilm	Pechiney Plastic
Petrischalen	Greiner bio-one
Pipetten	Sarstedt
Pipettenspitzen	Sarstedt
Reaktionsgefäße 1,5ml	Sarstedt
Separationsfilter 70µm	Miltenyi Biotec
Spritzen 5ml	Braun
Zählkammer	Marienfeld
Zellkulturflasche	TPP
Zellkulturplatte, 24 Vertiefungen	TPP
Zellsieb 100µm	Greiner bio-one
Zentrifugenröhrchen, 15ml	Greiner bio-one
Zentrifugenröhrchen, 50ml	Greiner bio-one

### 3.1.3 Geräte

*Tabelle 4: Geräte*

Bezeichnung	Bezugsquelle
Bio-Plex handheld magnetic washer	Bio-Rad
Bio-Plex MAGPIX™ Multiplex Reader	Bio-Rad
Brutschrank	Labotec
Durchflusszytometer FACSCanto™ II	BD
Mikroskop	Olympus

Mikrotiterplatten-Schüttler	HLC
Multikanalpipetten	Eppendorf
Photometer für ELISA	ThermoFisher Scientific
Pipetten	Gilson
Pipettierhilfe	Hirschmann
Vortex	Scientific Industries
Zentrifuge	ThermoFisher Scientific

### 3.1.4 Kommerziell erhältliche Systeme und Kits

*Tabelle 5: Kommerziell erhältliche Systeme und Kits*

System / Kit	Hersteller
Avidin-HRP	BioLegend
Bio-Plex Pro™ Human MMP Panel, 9-plex	Bio-Rad
Bio-Plex Pro™ Human T <sub>H</sub> 17 Cytokine Panel 96-well premixed 15-plex™ kit	Bio-Rad
Bio-Plex Pro™ Human TIMP Panel	Bio-Rad
ELISA Coating Buffer (5x)	BioLegend
GolgiPlug™ Protein Transport Inhibitor	BD
Human TNF $\alpha$ ELISA MAX™ Capture Antibody	BioLegend
Human TNF $\alpha$ ELISA MAX™ Detection Antibody	BioLegend
Human TNF $\alpha$ Standard	BioLegend
Human TruStain FcX™ (Fc Receptor Blocking Solution)	BioLegend
LEGEND MAX™ Human IL-1 $\beta$ ELISA Kit	BioLegend
LEGEND MAX™ Human IL-6 ELISA Kit	BioLegend
TMB Substratlösung	BioLegend
True-Nuclear™ Transcription Factor Buffer Set	BioLegend

### 3.1.5 Puffer, Lösungen, Nährmedium

*Tabelle 6: Puffer, Lösungen, Nährmedium*

Lösung	Zusammensetzung
ELISA-Beschichtungspuffer	Aqua destillata + 20% ELISA Coating Buffer (5x)

ELISA-Verdünnungslösung	PBS + 10% FCS
ELISA-Waschpuffer	PBS + 0,05% Polysorbat 20
Erylyse-Puffer	Aqua destillata + 153mM Ammoniumchlorid NH <sub>4</sub> Cl + 10mM Kaliumhydrogencarbonat KHCO <sub>3</sub> + 0,1mM EDTA
FACS-Puffer	PBS + 5% FCS + 1% Natriumazid
Fixierungslösung	True-Nuclear™ Fix Diluent + 25% True-Nuclear™ 4X Fix Concentrate
Kulturmedium:	IMDM + 10% FCS + 1% PenStrep + 2mM L-Glutamin + 0,5% β-Mercaptoethanol
Permeabilisierungspuffer	Aqua destillata + 10% True-Nuclear™ 10X Perm Buffer
Restimulationslösung 1	PBS + 1% PMA + 13,3% Ionomycin
Restimulationslösung 2	PBS + 1% PMA + 7,5% Ionomycin + 10% BD GolgiPlug™
Trypanblaufärbelösung	PBS + 0,5% Trypanblau
Verdauungspuffer	RPMI 1640 + 2,5% FCS + 4mg/ml Kollagenase Typ III + 20µg/ml DNase
Waschmedium	RPMI 1640 + 2,5% FCS

### 3.1.6 Fluoreszenzmarkierte Antikörper und Fluorochrome für die Durchflusszytometrie

*Tabelle 7: Antikörper*

Antigen	Fluorochrom	Klon	Isotyp	Verdünnung	Firma
huCD4	FITC	RPA-T4	Maus-IgG1	1/50	BioLegend
huCD8	FITC	RPA-T8	Maus-IgG1	1/100	BioLegend
huCD45R $\alpha$	PerCP/ Cy5.5	HI100	Maus-IgG2b	1/100	BioLegend
huCD197 (CCR7)	PE/Cy7	G043H7	Maus-IgG2a	1/20	BioLegend
huIL-17A	BV421	BL168	Maus-IgG1	1/25	BioLegend
huCD3	APC/Cy7	UCHT1	Maus-IgG1	1/50	BioLegend
huIL-22	APC	IL22JOP	Ratte-IgG2a	1/20	eBioscience
huCD8a	PE	RPA-T8	Maus-IgG1	1/100	BioLegend
PacO	AmCyan				

### 3.1.7 Software

*Tabelle 8: Software*

Software	Hersteller
Bio-Plex Manager™	Bio-Rad
Excel	Microsoft
FACSDiva™ Software	BD
FlowJo Single Cell Analysis™	FlowJo
Gen 5™	Bio-Tek Instruments
GraphPad Prism 5™	GraphPad Software, Inc.

### 3.1.8 Patientenmaterial

Als Patientenmaterial wurden bronchiale (Lungenexplantate von Patienten) und tracheale (Lungenexplantate von lungengesunden Spendern) Lymphknoten sowie Lungengewebe aus Lungenexplantaten von Patienten verwendet, die durch die Pathologie-Plattform der *Medizinischen Hochschule Hannover* (MHH) zur Verfügung gestellt wurden. Wir untersuchten Explantate der drei häufigsten Krankheitsentitäten, die zur Lungentransplantation führen: Zystische Fibrose, pulmonales Emphysem und pulmonale Fibrose (Tab.9). Lymphknoten von Spenderlungen wurden als lungengesund bezeichnet, da diese unmittelbar prä-Explantation internationale Qualitätskriterien für

eine ausreichende Lungenfunktion für die Transplantation aufwiesen, die durch das Entnahmeteam der MHH am Entnahmeort sichergestellt wurde und anamnestisch nach Angabe des über Eurotransplant anbietenden Krankenhauses frei von chronischen Lungenerkrankungen waren. Die Aufarbeitung der Proben erfolgte nach einem genehmigtem Ethikverfahren (Nr.8602\_BO\_K\_2019) und nach Einverständnis. Im Falle der Organspender handelte es sich ausschließlich um Restmaterial, welches für die Transplantation nicht benötigt wurde.

**Table 9: Anzahl (n) der analysierten Proben nach Krankheitsentität**

	Zystische Fibrose	Emphysem	Fibrose	Organspender
Durchflusszytometrie	20	15	14	17
Zytokinanalyse (Bioplex)	13	7	10	15

### 3.1.9 Eigenanteil der Dissertantin

Die zeitintensive Aufarbeitung der Proben erfolgte im Gesamtteam der Arbeitsgruppe, zu dem die Verfasserin dieser Dissertation über 14 Monate aktiv gehörte. Die Verfasserin der Dissertation führte während dieser Zeit alle hier beschriebenen Arbeitsschritte selbstständig durch. Die Proben wurden hinsichtlich T-Zellen, aber auch weiterer Zellpopulationen in einem mehrschrittigen durchflusszytometrischen Färbeverfahren untersucht, wobei sich die Dissertantin analytisch lediglich mit der Subpopulation der CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> und der CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen beschäftigte. Im Rahmen der Datenanalyse erfolgte eine stringente Qualitätskontrolle durch eine erfahrene Postdotorandin aus der Arbeitsgruppe. Die Dissertantin erhielt im Anschluss alle Rohdaten der Färbungen für die CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> und der CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> Subpopulationen, die sie anschließend unter Anleitung der Postdotorandin analysierte. Weiterhin führte sie in Zusammenarbeit mit der Postdotorandin die Immunoassays durch und wertete die entstandenen Rohdaten unter Anleitung aus.

## 3.2 Zellbiologische Methoden

### 3.2.1 Zellextraktion und Aufarbeitung

#### 3.2.1.1 Isolation von Lymphknotenzellen

Die Lymphknoten wurden durch Mitarbeiter der Pathologie der MHH aus peribronchialer Lokalisation aus den Lungenexplantaten sowie im Fall der Spenderlungen von den Tracheen der Spenderlungen abpräpariert und vor Herstellung der Einzelzellsuspensionen in Waschmedium bei 4°C für maximal 8 Stunden gelagert.

Für die Herstellung von Einzelzellsuspensionen wurden die Lymphknoten unter sterilen Bedingungen in ein Metallsieb in einer Petrischale mit 10ml Waschmedium überführt und die Kapsel zunächst mit einer Schere eröffnet. Anschließend wurden die Lymphknotenzellen mithilfe eines Spritzenstempels durch das Sieb gedrückt und dadurch von dem Bindegewebe getrennt. Die entstandene Zellsuspension wurde durch ein Zellsieb mit 100µm Durchmesser gegeben, um weiteres überschüssiges Gewebe sowie Zellklumpen zu entfernen. Im Anschluss wurden die Zellen bei 1200 *Umdrehungen pro Minute* (rpm) für 5min bei 4°C abzentrifugiert. Daran schloss sich eine Lyse der Erythrozyten mit 10ml Erylysepuffer für 5min bei Raumtemperatur an. Nach Beenden der Erylyse durch Zugabe von 10ml Waschmedium folgte eine weitere Zentrifugation (1200rpm, 4°C, 5min). Das entstandene Zellpellet wurde mit 20ml Waschmedium resuspendiert und die Zellzahl bestimmt. Schließlich wurden die Zellen erneut abzentrifugiert und mit IMDM-Kulturmedium auf eine Konzentration von  $1 \times 10^7$  Zellen pro 1ml Kulturmedium eingestellt. Die Zellsuspension wurde abschließend in eine Zellkulturflasche überführt und über Nacht bei 37°C im Brutschrank gelagert. Die weitere Verarbeitung folgte am nächsten Tag.

#### 3.2.1.2 Isolation von Lungengewebszellen

Lungengewebsstücke mit einer Größe von etwa 3x3x1cm wurden aus den Lungenexplantaten durch Mitarbeiter der Pathologie präpariert und ebenfalls in Waschmedium, welches zuvor zur antibiotischen und antimykotischen Prophylaxe mit 2% Penicillin/Streptomycin, Voriconazol (1µg/ml) und Amphotericin B (2,5µg/ml) angereichert wurde, bei 4°C für maximal 8h gelagert.

Zur Isolation der Zellen aus dem Lungengewebe war zunächst eine Verdauung des Gewebeskollagens nötig. Hierfür wurde ein Verdauungspuffer aus RPMI-Waschmedium mit 4mg/ml Kollagenase Typ III sowie 20µg/ml DNase angesetzt. Das

Gewebsstück wurde mit 5ml Waschmedium in einer Petrischale mit einer Schere in ca. 0,2x0,2cm kleine Stücke zerkleinert und der Verdauungspuffer hinzugegeben. Nach einer Inkubation über 35min bei 37°C wurde die Verdauung durch die Zugabe von *Ethylendiamintetraessigsäure* (EDTA) und einer Kühlung auf Eis beendet. Die weiteren Schritte entsprachen den Aufarbeitungsschritten der Lymphknotenzellen: Zunächst wurde das bereits zerkleinerte Lungengewebe mithilfe eines Spritzenstempels durch ein Metallsieb gedrückt. Dann wurde die Zellsuspension in ein weiteres Zellsieb mit 100µm Durchmesser gegeben und anschließend abzentrifugiert. Zu dem Zellpellet wurde 5ml Erylysepuffer gegeben, bei Raumtemperatur für 5min inkubiert und die Lyse der Erythrozyten durch Zugabe von Waschmedium beendet. Nach einem Waschschrift (1200rpm, 4°C, 5min) wurde das Zellpellet in Waschmedium resuspendiert und die Zellzahl bestimmt. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Zellen mit IMDM-Kulturmedium auf eine Konzentration von  $1 \times 10^7$  Zellen pro 1ml Kulturmedium eingestellt und in einer Zellkulturflasche bis zum nächsten Morgen bei 37°C im Brutschrank gelagert. Zur Vermeidung von Pilzinfektionen und bakterieller Kontamination der Zellkultur wurde das Kulturmedium zusätzlich mit 2% Penicillin/Streptomycin sowie 1µg Voriconazol und 2,5µg Amphotericin B pro 1ml Kulturmedium angereichert.

### **3.2.1.3 Zellzahlbestimmung vitaler Zellen**

Für die Zellzahlbestimmung wurde die Zellsuspension zunächst abzentrifugiert und das resultierende Zellpellet mit einer definierten Menge Waschmedium (20ml) resuspendiert. 10µl dieser Zelllösung wurden in einer Mikrotiterplatte mit 90µl Trypanblau-Färbelösung gefärbt (10-fache Verdünnung) und anschließend 10µl der entstandenen Suspension auf eine Zählkammer aufgetragen. Unter einem Lichtmikroskop wurden die intakten Zellen, die den Farbstoff Trypanblau nicht aufgenommen haben, in vier großen Eckquadraten gezählt. Die ermittelte Zellanzahl wurde durch die Anzahl der gezählten Quadrate (4) geteilt und mit dem Verdünnungsfaktor (10), dem Kammerfaktor ( $10^4$ ) sowie dem Volumen der zu Beginn verwendeten Menge Waschmedium (20ml) multipliziert. Das kalkulierte Ergebnis entsprach der Gesamtzahl der in der Zellsuspension enthaltenen Zellzahlen.

### **3.2.1.4 Qualitätskriterien für den Einschluss der Proben in die weiteren Analysen**

Zum Einschluss der Patientenproben in die weitere Analyse wurden einige Kriterien entwickelt, die die Qualität der Ergebnisse garantieren sollten. Hierzu erforderte es zunächst einer ausreichend großen Zellzahl nach Zellisolation sowie einer

kontaminationsfreien Kultivierung der Zellen bis zur FACS-Färbung und Analyse. Zusätzlich war die eindeutige Zuordnung zu den Krankheitsentitäten CF, Emphysem oder Fibrose für alle Patientenproben eine Voraussetzung für den weiteren Einschluss der Probe, ausgenommen hiervon waren die Spenderorgane von gesunden Organspendern. Aus Qualitätsgründen wurden von der anschließenden Analyse alle Proben ausgenommen, bei denen in der durchflusszytometrischen Analyse weniger als 70% lebendige Zellen und weniger als 90% Einzelzellen nachgewiesen wurden.

### **3.2.2 Restimulation der Immunzellen**

#### **3.2.2.1 Unspezifische Restimulation**

Am folgenden Tag wurden insgesamt  $1 \times 10^7$  Zellen pro Probe durch Zugabe einer Restimulationslösung aus *Phorbol 12-myristate 13-acetate* (PMA) (finale Konzentration 1/100) und Ionomycin (finale Konzentration 1/13,3) in *phosphatgepufferter Salzlösung* (PBS) über 4h bei 37°C unspezifisch restimuliert, um eine *in vitro* Zytokinproduktion zu induzieren. Diese unspezifische Restimulation aktivierte die Zytokinproduktion der Zellen unabhängig der Antigen-Spezifität und gab so einen allgemeinen Überblick über das Zytokinproduktionspotential der Zellen. Die produzierten Zytokine wurden in diesem Ansatz sezerniert und befanden sich am Ende der vierstündigen Restimulation und nach einer Zentrifugation im Überstand. Dieser wurde in Biobankröhrchen überführt und bei -80°C bis zur weiteren Analyse mittels Multiplex-Zytokinanalyse eingefroren, während das Zellpellet z.T. verworfen, z.T. für *Ribonukleinsäure* (RNA) Analysen eingefroren wurde.

#### **3.2.2.2 Protein-Transport-Inhibition**

Die restlichen Zellen, die nicht der Analyse der sezernierten Zytokine dienten, wurden ebenfalls unspezifisch mit PMA und Ionomycin restimuliert, zusätzlich wurde der Protein-Transport-Inhibitor BD GolgiPlug™ der Restimulationslösung hinzugefügt. Dies bewirkte eine intrazelluläre Retention der induzierten Zytokinexpression. Die auf diese Weise intrazellulär mit Zytokinen angereicherten Zellen wurden nach der vierstündigen Inkubation für die fluoreszenzbasierte Durchflusszytometrie aufgearbeitet.

### 3.3 Immunbiologische Methoden

#### 3.3.1 Fluoreszenzbasierte Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist ein Verfahren zur qualitativen und quantitativen Differenzierung von Zellen. Es können dabei verschiedene Zelltypen je nach Größe und Granularität unterschieden sowie ihre Expression von Oberflächenmolekülen und intrazellulären Proteinen untersucht werden. Der fluoreszenzbasierten Durchflusszytometrie liegt eine Antigen-Antikörper-Reaktion zugrunde, bei der die mit einem Fluoreszenzfarbstoff markierten Antikörper an bestimmte Zellmarker spezifisch binden. Die hier beschriebenen Zellen wurden im FACSCanto™ II Durchflusszytometer analysiert. Hierfür wurden die restimulierten Zellen als Einzelzellsuspension mit verschiedenen fluoreszenzmarkierten Antikörpern gefärbt. Für die Analyse durchliefen die Zellen in hoher Geschwindigkeit einzeln hintereinander eine Durchflusszelle, wo sie fokussierte Laser passierten. Gemessen wurden das Streulicht des Lasers sowie die Fluoreszenzintensität der verschiedenen Farbstoffe. In kurzer Zeit konnte so eine hohe Zellzahl analysiert werden.

Das Streulicht des Lasers wurde bei der Durchflusszytometrie in zwei Ebenen gemessen: die *Vorwärtsstreuung* (Forward Scatter, FSC), welches sich proportional zum Volumen der gemessenen Zelle verhält und somit die Zellgröße identifiziert, sowie die *Seitwärtsstreuung* (Side Scatter, SSC). Diese ist ein Maß für die seitliche Brechung des Lichtes und hängt von der Granularität und der intrazellulären Struktur der Zelle ab. Ergänzend wurde die durch Laser angeregte Fluoreszenzintensität der Zelle detektiert, die entsteht, wenn Proteine auf der Oberfläche der Zellen oder intrazellulär spezifisch durch fluoreszenzmarkierte Antikörper gebunden werden. Durch Verwendung verschiedenfarbiger Laser und Filter konnten Mehrfachmessungen von mehreren Antikörpern pro Zelle gleichzeitig durchgeführt werden. Die Messergebnisse wurden bereits am Messgerät durch die FACSDiva™ Software graphisch als *Dot Plot* oder Histogramm dargestellt und später mittels der Auswertesoftware FlowJo™ analysiert.

##### 3.3.1.1 Auswahl der Antikörper

Die isolierten und stimulierten Zellen wurden einer zelllinien-spezifischen Färbung unterzogen. Durch diese Färbung wurde die Expression der Zytokine IL-17A und IL-22 durch CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> sowie CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T<sub>naive</sub>, T<sub>CM</sub> und T<sub>EM</sub> gemessen. Dabei verwendeten wir insgesamt 8 Fluoreszenzfarbstoffe, die jeweils einen Zellmarker markierten. Tabelle 10 zeigt die dreiteilige Färbung mit Markierung der extrazellulären

Antikörper, einer Lebend-Totfärbung sowie der Färbung intrazellulärer Zellmarker und dem jeweils dazugehörigen Fluoreszenzfarbstoff (Tab.10). Die gleichen Proben wurden parallel mit weiteren Antikörperpanels gefärbt, die Färbungen für verschiedene andere Lymphozytenpopulationen darstellten. Die Analyse dieser Panels ist jedoch nicht Gegenstand dieser Dissertation und wird daher hier nicht weiter ausgeführt.

**Tabelle 10:** Antikörperpanel für T-Zellfärbung mit Zellmarkern und Fluoreszenzfarbstoff

	Extrazelluläre Färbung				Lebend-Totfärbung	Intrazelluläre Färbung			
<b>Fluoreszenzfarbstoff</b>	FITC	APC-Cy7	PE-Cy7	PerCP-Cy5.5	AmCyan	FITC	PE	BV421	APC
<b>Zellmarker</b>		CD3	CCR7	CD45RA	PacO	CD4	CD8	IL-17A	IL-22

Eine Verdünnung der Antikörper, um einen optimalen Färbeerfolg zu erzielen, wurde individuell in Vorversuchen titriert. Musste ein neues *Lot* bezogen werden, erfolgte eine erneute Titration, um die optimale Verdünnung aller Antikörper zu gewährleisten.

Die Zytokine IL-17A und IL-22 wurden intrazellulär markiert, um ihre Produktion durch die jeweiligen Zelltypen nach Proteintransportinhibition zu untersuchen.

Mittels des Oberflächenmarkers CD3 wurden T-Zellen identifiziert und mittels CD4 und CD8 als spezifische T-Zellmarker unterteilt. Um eine weitere Differenzierung in die einzelnen Gedächtnis-T-Zellgruppen ( $T_{naive}$ ,  $T_{CM}$ ,  $T_{EM}$ ) zu ermöglichen, wurden zusätzlich CCR7 sowie CD45RA markiert (Tab.1). Zur Selektion lebendiger Zellen wurde eine Lebend-Totfärbung mit *Pacific Orange* (PacO) durchgeführt (Tab.10).

### 3.3.1.2 Antikörperfärbung

Für die *Fluoreszenz aktivierte Zellsortierung* (FACS) wurden die Zellen in Kultur mit PMA, Ionomycin und dem Protein-Transport-Inhibitor BD GolgiPlug™ restimuliert, nach 4h Inkubation abzentrifugiert und schließlich in FACS-Puffer resuspendiert. Die Zellen wurden in drei Schritten mit verschiedenen, zelllinienspezifischen Antikörpern gefärbt.

### 3.3.1.3 Extrazelluläre Färbung

Zunächst wurden die Zellen mit 200µl FACS-Puffer gewaschen. Darauf folgte das Blockieren der humanen Fc-Rezeptoren mit der Fc-Rezeptor-Block-Lösung Human

TruStain FcX™. Diese Fc-Rezeptoren sind auf einer Vielzahl von Zellen exprimiert und können durch Fc-Rezeptor-vermittelte unspezifische Antikörperbindung eine Immunfluoreszenzfärbung verfälschen. Aus diesem Grund wurden die Fc-Rezeptoren vor Beginn des Färbeprozesses geblockt und 10min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem erneuten Waschschrift wurden 50µl der jeweiligen Antikörperlösung, bestehend aus FACS-Puffer und der benötigten Antikörperkonzentration, nach dem in Tabelle 11 dargestellten Schema (Tab.11) zu den Zellen gegeben und 15min bei 37°C inkubiert. Nach Ende der Inkubation wurde die Färbung durch Zugabe von FACS-Puffer und Zentrifugation beendet, die Überstände verworfen und die Zellen erneut mit FACS-Puffer gewaschen.

***Tabelle 11: Extrazelluläre Färbung***

	Antikörper gegen extrazelluläre Marker		
T-Zellen, Gedächtniszellen	CD3	CD45Rα	CCR7

#### **3.3.1.4 Lebend-Totfärbung**

Im zweiten Färbeschritt wurden die Zellen zunächst in PBS resuspendiert und gewaschen. Anschließend wurde in jedes Röhrchen eine Färbelösung, bestehend aus PacO und PBS, hinzugefügt. Die Interaktion dieser Färbung mit den freien Aminen der Zellen ließ eine Differenzierung zwischen lebendigen Zellen sowie abgestorbenen Zellen zu. Aufgrund des Zellmembranuntergangs der abgestorbenen Zellen kann neben den membranständigen Aminen eine Anfärbung von zuvor intrazellulären, nun frei von extern zugänglichen Aminen erfolgen, wodurch es zu einem deutlichen Anstieg der Fluoreszenzintensität bei toten Zellen kommt. Es folgten eine Inkubation für 20min bei 4°C im Dunkeln und ein erneuter Waschschrift mit PBS.

#### **3.3.1.5 Intrazelluläre Färbung**

Im dritten Schritt wurden die Zellen zunächst mit dem True-Nuclear™ Transcription Factor Buffer Set fixiert und permeabilisiert, um eine intrazelluläre Färbung zu ermöglichen. Zu jeder Probe wurden 1ml der Fixierungslösung hinzugegeben, um die Zellmembran zu stabilisieren und die zellulären Bestandteile, insbesondere die Bindung der Oberflächenantigene an die fluoreszenzmarkierten Antikörper, zu fixieren. Nach

30min Inkubation wurde der Permeabilisierungspuffer hinzugegeben, welcher die Permeabilität der Zellmembran erhöhte und diese somit für fluoreszenzmarkierte Antikörper gegen intrazelluläre Antigene durchlässig machte. Nach einer Zentrifugation bei 1200rpm für 5min bei Raumtemperatur wurden die Überstände verworfen und 50µl der jeweiligen Färbelösung aus Antikörpern und Permeabilisierungspuffer zu den Zellpellets hinzugefügt (Tab.12,13). Im Anschluss an eine 30-minütige Inkubationszeit wurde erneut Permeabilisierungspuffer hinzugefügt, die Zellsuspensionen abzentrifugiert und anschließend mit FACS-Puffer gewaschen. Die entstandenen Zellpellets wurden in 600µl FACS-Puffer resuspendiert, abgedeckt und bei 4°C bis zur Messung am FACSCanto™ II Durchflusszytometer gelagert.

**Table 12: Intrazellulär angefarbte Antikörper**

	Intrazellulär angefarbte Antikörper	
T-Zellen, Gedächtniszellen	IL-17A	IL-22

**Table 13: Intra- und extrazellulär angefarbte Antikörper**

	Intra- und extrazellulär angefarbte Antikörper	
T-Zellen, Gedächtniszellen	CD4	CD8

### 3.3.1.6 Kompensationskontrollen

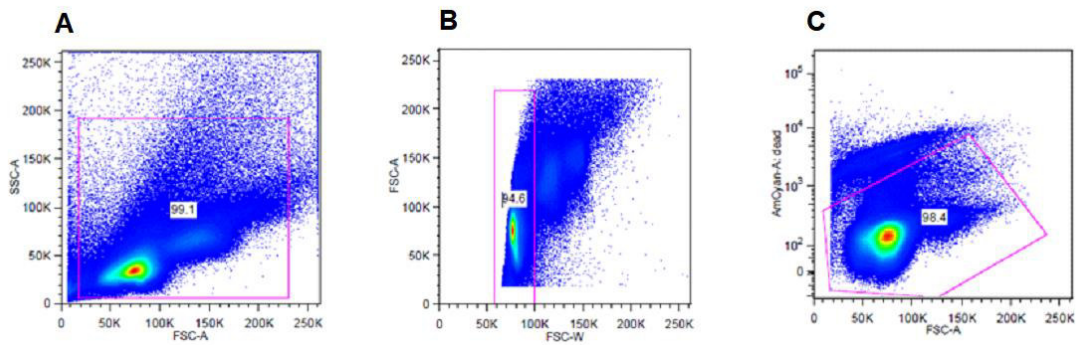
Zur Kontrolle des Färberefolges wurde zu Beginn der Arbeit für jeden Antikörper eine Einzelfarbkompensation mit OneComp eBeads™ durchgeführt. Hierbei handelt es sich um kugelförmige Partikel, die mit Antikörpern reagieren und auf diese Art gefärbt werden können. Zu einem Tropfen OneComp eBeads™ wurde eine definierte Menge des zu testenden Antikörpers hinzugefügt. Insgesamt wurden 12 Kompensationen durchgeführt. Die Beads-Lösung enthielt jeweils eine anfärbbare, positive Population sowie eine nicht-anfärbbare, negative Population. Dies resultierte in einer zweigipfligen Verteilung der Populationen in der Durchflusszytometrie. Für jeden Antikörper wurden so die jeweiligen Grenzen zwischen positiver und negativer Population für das spätere *Gating* festgelegt.

Zusätzlich wurden ungefarbte Zellen gemessen, um die FSC und SSC Einstellungen vorzunehmen, sowie Isotypkontrollen mit Isotypen-Antikörpern als Negativkontrollen, um das Ausmaß der unspezifischen Bindungen zu beurteilen.

### 3.3.1.7 Gating

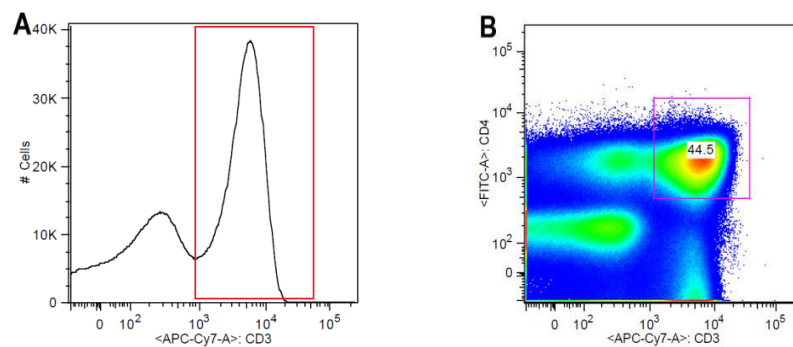
Das Durchflusszytometer zeigt die Verteilung der Fluoreszenzintensitäten als relative Verteilung. Dabei ist eine eindimensionale Darstellung eines einzelnen Parameters als Histogramm oder eine zweidimensionale Darstellung von zwei Parametern als *Dot Plot* möglich. Um eine entsprechende Zellpopulation beurteilen zu können, wird ein Bereich eingegrenzt, dessen populationspezifische Merkmale, üblicherweise die Fluoreszenzintensität, im Vergleich zu den negativen Kontrollen positiv sind. Definiert wird dies typischerweise im Vergleich zu negativen, da ungefärbten Zellen oder Zellen, die mit einem fluoreszenzmarkierten Antikörper der gleichen Subklasse und des gleichen Fluorochroms gefärbt werden, der kein Oberflächen- oder intrazelluläres Protein erkennt, das von den zu untersuchenden Zellen exprimiert wird, einer sogenannten Isotypkontrolle. Die Abgrenzung zwischen Zellen, die das zu untersuchende Protein exprimieren und denjenigen, die dies nicht tun, wird als *Gate* bezeichnet. Dieses Gate grenzt somit eine definierte Zellpopulation ein, die in weiteren Schritten hinsichtlich verschiedener Parameter untersucht werden kann.

Zunächst wurden alle gemessenen Signale nach *Forward Scatter* (FSC-A) und *Side Scatter* (SSC-A), also nach Zellgröße und Granularität, als *Dot Plot* dargestellt (Abb.1A). Das gewählte Gate markierte die Region, in der die zu untersuchenden Zellen lagen. Von diesen Zellen wurden im zweiten Gating die Zellen nach der FSC-W (*width*, Zellweite) eingegrenzt, wodurch Zellverbindungen und Zellklumpen von Einzelzellen differenziert wurden (Abb.1B). Eine weitere Auftrugung der Einzelzellen mit FSC-A und der Lebend-Totfärbung (PacO/AmCyanA *dead*) erlaubte schließlich den Ausschluss der toten Zellen aus den weiteren Analysen (Abb.1C). Dieser erste Schritt bildete die Grundlage für alle weiteren Analysen der Zellpopulationen hinsichtlich ihrer Zytokin- und Zellmarkerexpression.



**Abbildung 1:** Erster Schritt des Gatings zur Detektion von lebenden Einzelzellen anhand von Größe und Granularität (A), Weite (B) und Lebend-Tod-Färbung (C)

Für die Festlegung der Gates wurde neben den zuvor beschriebenen Kompensationskontrollen als Negativkontrollen auch die Darstellung als eindimensionales Histogramm gewählt. Dabei konnte die Verteilung der fluoreszierenden und somit Zellmarker positiven Zellen im Vergleich zu den nicht fluoreszierenden, Zellmarker negativen Zellen aus diesen Histogrammen genutzt werden, um die jeweiligen Gates festzulegen und auf die mehrdimensionale Darstellung im *Dot Plot* zu übertragen. In Abbildung 2 wird anhand des Zellmarkers CD3 ein Beispiel für dieses Verfahren demonstriert (Abb.2).

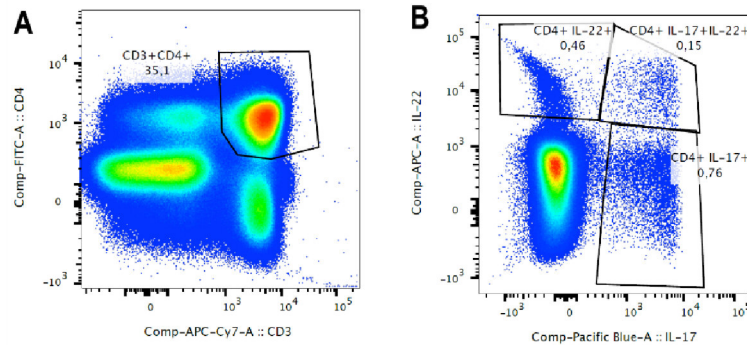


**Abbildung 2:** Festlegung der Gatinggrenzen mithilfe der Darstellung als Histogramm (A) und Übertragung dieser Grenzen auf die Darstellung als mehrdimensionaler Dot Plot (B), demonstriert anhand des Zellmarkers CD3.

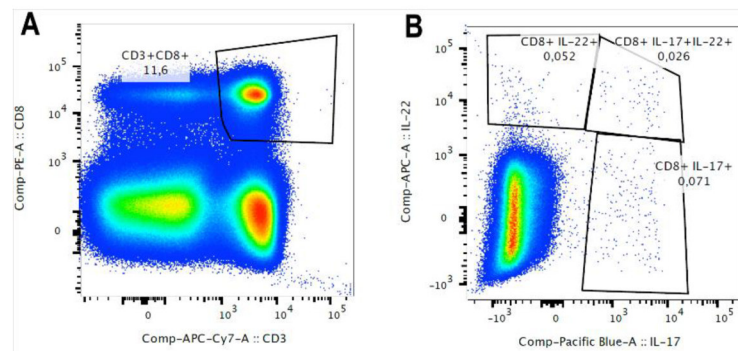
### 3.3.1.7.1 Gating der klassischen CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen

Die wie zuvor beschriebenen detektierten lebendigen Einzelzellen wurden anhand der Expression des CD3 Markers sowie der T-Zellmarker CD4 (Abb.3) und CD8 (Abb.4) weiter differenziert. Die doppeltpositiven Zellen (CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> sowie CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup>) wurden mit einem Gate markiert (Abb.3A, 4A) sowie in einem weiteren Schritt ihre

Expression von IL-17A und IL-22 dargestellt (Abb.3B, 4B). Die quantitative Bestimmung erfolgte anteilig in Prozent der IL-17A<sup>+</sup>, IL-22<sup>+</sup> oder IL-17A/IL-22<sup>+</sup> Zellen.



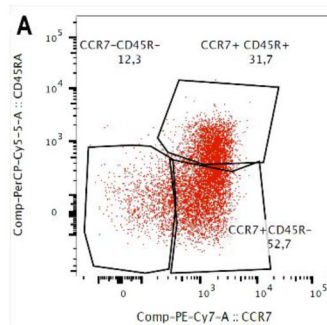
**Abbildung 3:** Gating der CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> Zellen (A) und weitere Detektion der IL-17A und IL-22 sowie der IL-17A/IL-22 koproduzierenden CD4<sup>+</sup> T-Zellen (B).



**Abbildung 4:** Gating der CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> Zellen (A) und weitere Detektion der IL-17A und IL-22 sowie der IL-17A/IL-22 koproduzierenden CD8<sup>+</sup> T-Zellen (B).

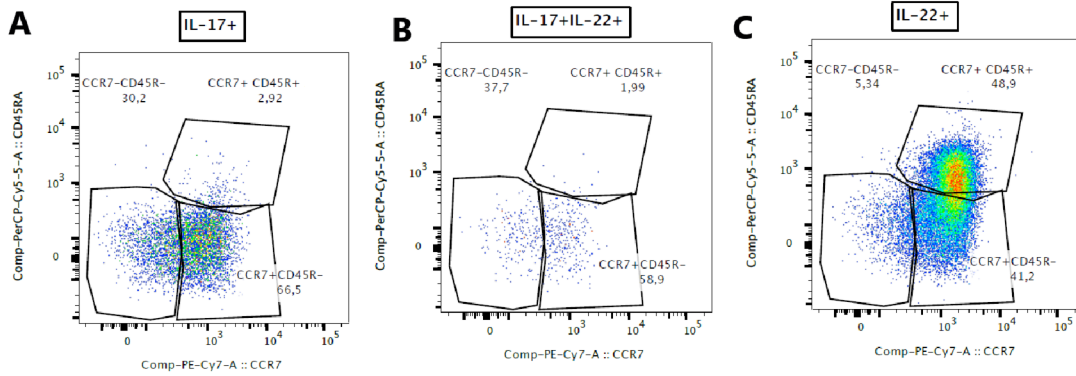
### 3.3.1.7.2 Gating der Gedächtniszellen

Aus der Gruppe der CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> Zellen erfolgte die Subtypisierung der Gedächtniszellen. Es wurde anhand der Zellmarker CD45RA und CCR7 zwischen T<sub>naive</sub> (CD45RA<sup>+</sup> CCR7<sup>+</sup>), T<sub>CM</sub> (CD45RA<sup>-</sup> CCR7<sup>+</sup>) und T<sub>EM</sub> (CD45RA<sup>-</sup> CCR7<sup>-</sup>) differenziert (Abb.5).



**Abbildung 5:** Gedächtniszell-Gating anhand der Expression von CD45RA und CCR7

Die Verteilung der einzelnen Gedächtniszelltypen wurde ergänzend innerhalb der für IL-17A<sup>+</sup> (Abb.6A), IL-22<sup>+</sup> (Abb.6C) oder IL-17A/IL-22<sup>+</sup> (Abb.6B) CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> gemessen.



**Abbildung 6:** Vergleich der Differenzierung der Gedächtnis-T-Zellen innerhalb der IL-17<sup>+</sup> (A), IL-17A/IL-22<sup>+</sup> (B) und IL-22<sup>+</sup> (C) CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen

### 3.3.1.8 Durchflusszytometrische Analyse

Die Messung erfolgte auf einem FACSCanto™ II Durchflusszytometer unter Verwendung der Software FACSDiva™. Die graphische Analyse wurde mit FlowJo™ Single Cell Analysis Software durchgeführt. Die statistische Auswertung erfolgte mit der GraphPad Prism 5™ Software. Proben mit weniger als 70% lebenden Zellen in der Auswertung wurden in der weiteren Analyse nicht berücksichtigt.

### 3.3.2 Nachweis von sezernierten Zytokinen mittels Multiplexanalyse

#### 3.3.2.1 Bio-Plex Pro™ Human T<sub>H</sub>17 Cytokine Assay

Die in den Zellüberständen enthaltenen sezernierten Zytokine wurden mit dem Bio-Plex Pro™ Human T<sub>H</sub>17 Cytokine Assay gemessen. Dabei handelt es sich um ein kommerziell erhältliches Immunoassay, welches pro Probe je 15 humane Zytokine aus dem Bereich der T<sub>H</sub>17-vermittelten Immunantwort (Tab.14) quantitativ detektieren kann.

**Tabelle 14:** Humane T<sub>H</sub>17 Zytokin Analyten der Multiplexanalyse

Analyten		
Interleukin-1β	Interleukin-17F	Interleukin-31
Interleukin-4	Interleukin-21	Interleukin-33
Interleukin-6	Interleukin-22	IFNγ
Interleukin-10	Interleukin-23	sCD40L
Interleukin-17A	Interleukin-25	TNFα

In einer 96-Loch-Platte befanden sich kovalent an magnetische Kügelchen gebundene monoklonale Antikörper gegen die 15 Analyten. Die in den Überständen enthaltenen Zytokine reagierten mit diesen Antikörpern als Antigen-Antikörper-Komplex. Durch mehrere magnetische Waschschrte wurden alle nicht gebundenen Proteine entfernt. Ein biotinylierter, sekundärer Antikörper wurde hinzugegeben und erkannte die durch Bindung entstandenen Komplexe. Durch die Zugabe des Fluoreszenzmarkers Streptavidin-Phykoerythrin wurden die Komplexe für die folgende Analyse markiert. Mittels des Bio-Plex MAGPIX™ Multiplex Reader wurde für jede Probe und jeden Analyten die *mediane Fluoreszenz Intensität* (MFI) ermittelt. Die zur MFI proportionale Konzentration (in pg/ml) konnte dann anhand zytokinspezifischer Standardreihen quantifiziert werden.

### 3.3.2.2 Standardkurven

In einer dem *Kit* beigelegten Standardlösung waren alle Analyten enthalten. Von dieser wurden insgesamt 8 Verdünnungen nach dem folgenden Schema (Tab.15) hergestellt, die der Konstruktion einer Standardkurve für jeden Analyten dienen. Zusätzlich wurde der Blank ermittelt, indem die Standardverdünnungslösung ohne Analyten gemessen wurde. Die durch das Kit festgelegten oberen und unteren Grenzwerte variierten je nach Analyten und reichten von min. 0,2 pg/ml (IL-1 $\beta$ ) bis max. 147023 pg/ml (IL-21).

**Tabelle 15:** Standardkurve der Bioplex Verdünnungsstufen

Standard	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	Blank
Verdünnung	1:1	1:4	1:16	1:64	1:256	1:1024	1:4096	1:16384	/

### 3.3.2.3 Durchführung des Bio-Plex Pro™ Human T<sub>H</sub>17 Cytokine Assays

Die Versuchsdurchführung erfolgte nach Herstellerangaben. Insgesamt wurden 45 Lymphknotenproben untersucht sowie eine doppelte Standardkurve (je 2x S1 bis S8) und zwei Blanks angelegt.

In jedes Loch der Mikrotiterplatte wurden 50 $\mu$ l der magnetischen Kügelchen gegeben und die Platte zweimalig mit dem magnetischen Waschinstrument gewaschen. Anschließend wurden je 50 $\mu$ l der Standardlösung oder der Überstände in einzelne

Löcher gegeben und die Platte eine Stunde im Dunkeln auf einem Schüttler inkubiert. Anschließend folgten zwei weitere Waschdurchläufe, um nicht gebundene Proteine zu entfernen. Nach der Zugabe von 25µl der biotinylierten, sekundären Antikörper pro Loch erfolgte eine weitere 30-minütige Inkubation und erneut zweifaches Waschen. 50µl Streptavidin-Phykoerythrin wurden hinzugegeben und nach 10min Inkubation die Platte erneut zwei Mal gewaschen. Abschließend wurde 125µl der Pufferlösung pro Loch hinzugegeben und die Lösung auf dem Schüttler resuspendiert. Die Platte wurde in den Bio-Plex MAGPIX™ Multiplex Reader gegeben und die Analyse gestartet.

### 3.3.3 Nachweis von MMPs mittels Multiplexanalyse

Mittels eines weiteren Analysekits wurde in den Überständen die Konzentration von MMPs und TIMPs untersucht. Dies erfolgte mit dem Bio-Plex Pro™ Human MMP Panel und dem Bio-Plex Pro™ Human TIMP Panel, welche dem Prinzip sowie dem Versuchsablauf des T<sub>H</sub>17 Zytokinassays entsprachen und die Überstände auf insgesamt 6 MMPs und 3 TIMPs testete (Tab.16). Der Messbereich reichte von 24pg/ml bis 179505,12pg/ml. Die Analyse erfolgte ebenfalls mit dem Bio-Plex MAGPIX™ Multiplex Reader.

**Table 16:** MMP- und TIMP-Analyten in der Multiplexanalyse

Analyten		
MMP-2	MMP-9	TIMP-1
MMP-7	MMP-10	TIMP-2
MMP-8	MMP-12	TIMP-4

### 3.3.4 Bestimmung der TNFα-, IL-1β und IL-6 Sekretion mittels ELISA

Die quantitative Bestimmung der sezernierten TNFα, IL-1β und IL-6 in den Zellkulturüberständen erfolgte zunächst in der Bioplexanalyse. Da ein Großteil der Proben in diesem Versuch oberhalb der Messgrenze der für diesen Assay verfügbaren Standardkurve lag, wurden die Proben erneut mittels *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) gemessen. Hierzu wurden die Proben 10-fach (TNFα), 20-fach (IL-6) oder 100-fach (IL-1β) in RPMI verdünnt und mit dem Human TNFα ELISA MAX™

Standard Set, dem LEGEND MAX™ Human IL-1β ELISA Kit sowie dem LEGEND MAX™ Human IL-6 ELISA Kit ausgewertet. Die Analyten wurde dabei durch monoklonale Mausantikörper gegen humane Liganden gebunden. Auf diesen Komplex wurde im Sinne eines Sandwich-ELISAs ein weiterer biotinylierter Detektionsantikörper gegen den entsprechenden humanen Liganden gegeben, wodurch ein Antikörper-Antigen-Antikörper Komplex entstand. Mittels Avidin-HR-Peroxidase und *Tetramethylbenzidin* (TMB) Substratlösung wurden diese Komplexe farbig markiert und konnten so durch eine Absorptionsmessung bei 450nm in einem Photometer gemessen werden.

#### 3.3.4.1 Durchführung der ELISAs

Am Vortag des Versuches wurden die primären Antikörper mit Beschichtungspuffer in die Mikrotiterplatte gegeben und die Lösung über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach 4-fachem Waschen mit 300µl ELISA-Waschpuffer wurde zunächst 200µl ELISA-Verdünnungslösung hinzugegeben, um unspezifische Bindungen zu blockieren. Während der einstündigen Inkubation auf dem Schüttler wurde die Standardverdünnungsreihe (7 Standards: 500pg/ml, 250pg/ml, 125pg/ml, 62,5pg/ml, 31,3pg/ml, 15,6pg/ml, 7,8pg/ml, Blank: 0pg/ml) hergestellt und die zu messenden Proben in RPMI 1:10 verdünnt. Nach der Inkubation und einem erneuten Waschschrift wurden je 100µl der Standards und der Proben in das entsprechende Loch gegeben und die Platte für 2h auf dem Schüttler inkubiert. Die folgenden Schritte verliefen wie folgt: Waschen, Zugabe von Detektionsantikörpern, 1h Inkubation, Waschen, dann Zugabe von Avidin-HRP mit 30min Inkubation, Waschen. Anschließend wurde TMP-Substratlösung hinzugegeben und die Platte 30min im Dunkeln inkubiert, bis eine blaue Färbung entstand. Die Reaktion wurde durch Zugabe von *Schwefelsäure* (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) gestoppt, wobei sich die Farbe der positiven Proben von blau zu gelb änderte. Die Platte wurde anschließend bei 450nm im Photometer gemessen und mithilfe der Gen 5 Software™ ausgewertet.

### 3.4 Statistische Methoden

Die statistische Auswertung erfolgte mittels der GraphPad Prism™ Software für Windows 10™. Statistische Signifikanz wurde durch den parameterfreien Kruskal-Wallis-Test mit anschließendem Dunn-Bonferroni-Posttest oder dem Mann-Whitney Test geprüft, je nach Anzahl der zu vergleichenden Gruppen. Die Darstellung erfolgte als Mittelwert mit Standardfehler. Es wurde ein Signifikanzniveau von 95% gewählt und das Ergebnis bei einer berechneten Fehlerwahrscheinlichkeit von  $p < 0,05$  als signifikant bewertet. Statistische Ausreißer wurden mit dem Ausreißertest nach Grubbs identifiziert und aus der Auswertung herausgenommen. Zur detaillierteren Auswertung wurden die Entitäten zusätzlich zu den Gruppen *Kontrollen* (alle Nicht-CF-Entitäten) und *Endstage* (CF, Emphysem, Fibrose) zusammengefasst. Dies ermöglichte eine genauere Betrachtung der Gemeinsamkeiten und Unterschieden zwischen den Entitäten.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Studienpopulation

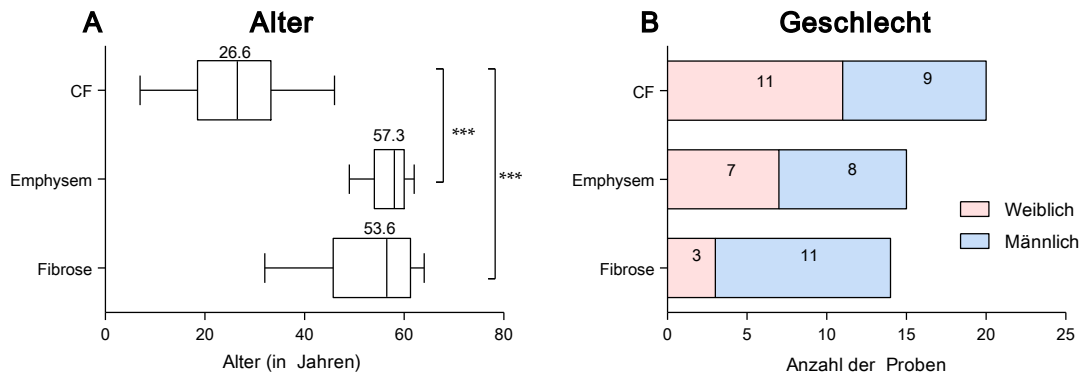
Insgesamt 65 der aufgearbeiteten Patientenproben erfüllten die Qualitätskriterien für eine weitere Analyse im FACS oder Multiplex (Kap.3.2.1.4), die sich in CF (n=20), Emphysem (n=15), Fibrose (n=14) und Spender (n=16) unterteilen ließen. Ein Überblick über die Entitäten mit Geschlechtsverteilung, durchschnittlichem Alter sowie geringstem und höchstem Alter bei Transplantation und Anzahl der Analysen von Lymphknoten oder Lungengewebe in FACS oder Multiplex zeigt Tabelle 17. Aufgrund der Anonymität der personenbezogenen Daten der Organspender konnte in dieser Gruppe bezüglich Geschlechtes und Alter keine Aussage getroffen werden.

**Tabelle 17:** Eingeschlossene Patientenproben (n) in die weitere Analyse (FACS, Bioplex) nach Krankheitsentität mit Geschlecht (m = männlich, w = weiblich), Alter bei Transplantation ( $\emptyset$ =Mittleres Alter, min=geringstes Alter, max.=höchstes Alter) und Probenart (Lymphknoten (LK), Gewebe).

Entität	n	Geschlecht		Alter (in Jahren)			Proben in Analysen			
		m	w	$\emptyset$	min.	max.	FACS		Bioplex	
							LK	Gewebe	LK	Gewebe
CF	20	9	11	26,6	7	46	11	5	13	7
Emphysem	15	8	7	57,3	49	62	5	8	7	6
Fibrose	14	11	3	53,6	32	64	8	5	10	6
Spender	16	unbekannt				5	0	15	0	

Das Patientenalter bei Transplantation variierte zwischen sieben Jahren (CF) und 64 Jahren (Fibrose). In der Altersverteilung zeigte sich ein signifikanter Unterschied ( $p < 0,001$ ) von CF (Median=26,6 Jahre) zu Emphysem (Median=57,3 Jahre) und Fibrose (Median=53,6 Jahre) (Abb.7A).

Die Geschlechterverteilung war in den Kohorten CF (w=11, m=9) und Emphysem (w=7, m=8) nahezu ausgeglichen, Fibrose zeigte eine deutliche Verschiebung zugunsten der männlichen Patienten (w=3, m=11) (Abb.7B).



**Abbildung 7:** Alters- (A) und Geschlechterverteilung (B) der Kohorten CF, Emphysem und Fibrose

Bei einigen Gewebeproben fielen in der konventionellen histologischen Untersuchung durch die Mitarbeiter der Pathologie Besonderheiten auf, die in Tabelle 18 aufgeführt werden (Tab.18). In CF wurde je eine Probe mit einem positiven Nachweis von Aspergillus sowie Candida albicans identifiziert. Strukturell wiesen drei CF-Proben Besonderheiten auf: Eine Probe präsentierte deutliche Zeichen einer aktiven Inflammation, in einer weiteren Probe konnten Epitheloidzellgranulome nachgewiesen werden und eine Probe wies eine ausgeprägte Vernarbung auf. In der Emphysemgruppe wurde eine Probe mit  $\alpha$  1-Antitrypsin-Mangel identifiziert. In Fibrose ergaben sich keine Auffälligkeiten. In den untersuchten Spendern zeigte sich in der teils mituntersuchten Trachea in fünf Proben eine aktive Tracheitis als Zeichen einer akuten Entzündung. Alle histologischen Auffälligkeiten wurden vermerkt und die jeweiligen Proben bei von der restlichen Population abweichenden Resultaten aus der weiteren Analyse herausgenommen.

**Tabelle 18:** Histologische Besonderheiten einzelner Proben innerhalb der Entitäten mit Angabe der Häufigkeit (n)

Entität	Histologische Besonderheiten	
	Nachgewiesene Pathogene	Strukturelle Auffälligkeiten
CF	Aspergillus (n=1) Candida albicans (n=1)	Infektionszeichen (n=1) Epitheloidzellgranulome (n=1) Ausgeprägte Vernarbung (n=1)
Emphysem	-	$\alpha$ 1-Antitrypsin-Mangel (n=1)
Fibrose	-	-
Spender	-	Tracheitis (n=5)

Wir verglichen jeweils die einzelnen Entitäten untereinander und gliederten die Entitäten für die weitere Analyse zusätzlich in die *Endstage* Kohorte (CF, Emphysem, Fibrose) sowie in eine Nicht-CF *Control* Kohorte (Emphysem, Fibrose, Spender) (Tab.19). Zugleich wurden Lymphknotenzellen und Lungengewebszellen verglichen.

**Table 19:** Übersicht über die verwendeten Kohorten: Endstage (CF, Emphysem, Fibrose) und Nicht-CF Kontrollen Control (Emphysem, Fibrose, Spender).

Kohorten	CF	Emphysem	Fibrose	Spender
<i>Endstage</i>	x	x	x	
<i>Control</i>		x	x	x

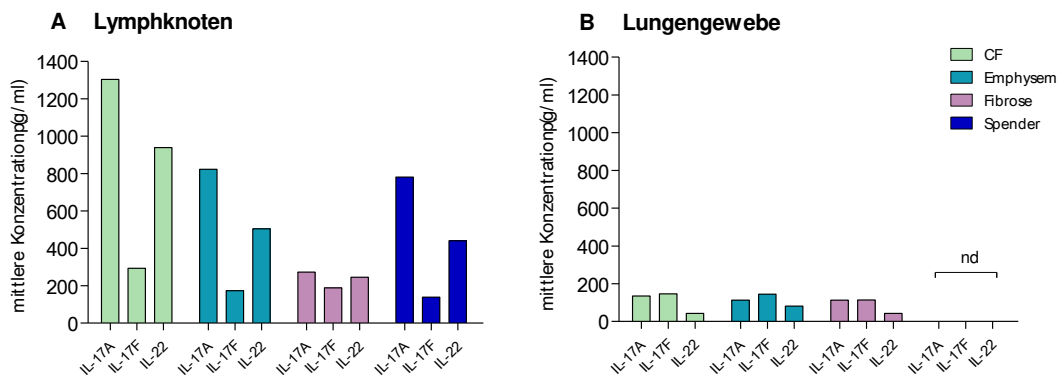
## 4.2 Messung der sezernierten IL-17A, IL-17F und IL-22 mittels Multiplex

In der Multiplexanalyse mit dem Bio-Plex Pro™ Human T<sub>H</sub>17 Cytokine Panel führten wir eine quantitative Bestimmung der am T<sub>H</sub>17 Signalweg beteiligten sezernierten Zytokine durch. Hierzu wurden die isolierten Zellen aus Lymphknoten oder Lungengewebe unspezifisch stimuliert und der Überstand hinsichtlich der sezernierten Zytokine mittels Multiplex analysiert (Kap.3.3.2).

**Tabelle 20:** Mittlere Konzentrationen in pg/ml an sezernierten IL-17A, IL-17F und IL-22 in Lymphknoten- und Lungengewebszellen der einzelnen Entitäten

Entität	Mittlere Konzentration (pg/ml)					
	Lymphknotenzellen			Lungengewebszellen		
	IL-17A	IL-17F	IL-22	IL-17A	IL-17F	IL-22
CF	1304	293	939	135	146	43
Emphysem	822	172	505	113	144	80
Fibrose	273	188	246	112	114	42
Spender	781	138	440	-	-	-

Tabelle 20 zeigt die mittlere Konzentration der sezernierten IL-17A, IL-17F und IL-22 in Lymphknoten und Lungengewebe der einzelnen Entitäten (Tab.20). Die Lymphknotenzellen von CF Patienten produzieren mit einer mittleren Konzentration von 1304pg/ml das meiste IL-17A, gefolgt von 939pg/ml IL-22 aller Kohorten (Abb.8A). IL-17F wird mit 381pg/ml in den CF-Lymphknoten dagegen nur in deutlich geringerem Ausmaß produziert, im Vergleich zu den anderen Entitäten aber ebenfalls deutlich vermehrt (Abb.8A). Die Entitäten Emphysem und Spender weisen ähnliche sezernierte Mengen der Interleukine auf mit IL-17A>IL-22>IL-17F. Die absoluten Werte liegen in diesen beiden Entitäten insgesamt jedoch nur bei etwa der Hälfte der sezernierten Interleukine in CF (Abb.8A).



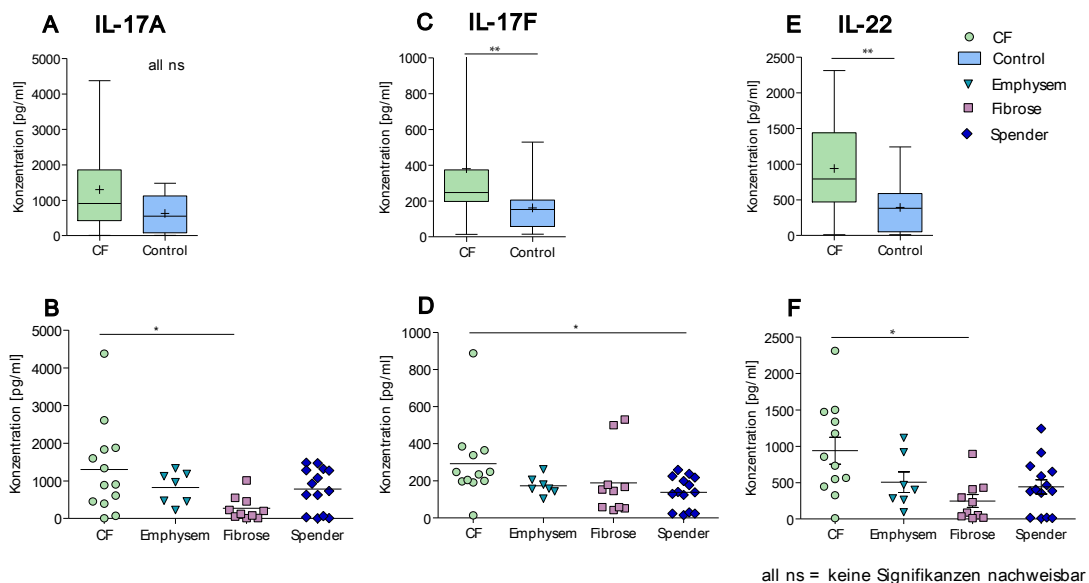
**Abbildung 8:** Mittlere Konzentrationen in pg/ml an sezernierten Interleukinen IL-17A, IL-17F und IL-22 in Lymphknoten- und Lungengewebszellen (nd =not determined)

In Lungengewebszellen wird insgesamt eine deutlich geringere Menge der drei Interleukine sezerniert, wobei IL-17F in allen drei Entitäten die höchste mittlere Konzentration zeigt, gefolgt von IL-17A, während IL-22 nur in geringer Menge sezerniert wird (Tab.20, Abb.8B). Alle drei Interleukine werden jedoch sowohl von Lymphknoten wie auch von Lungengewebszellen sezerniert, wobei zu Lungengewebe von lungengesunden Spendern keine Daten vorliegen.

#### 4.2.1 Vergleich der IL-17A, IL-17F und IL-22 Sekretion in Lymphknotenzellen

Im ersten Auswertungsschritt erfolgte die Analyse der Interleukinproduktion der Lymphknotenzellen. Hier verglichen wir die IL-17A, IL-17F und IL-22 Zytokinproduktion von CF gegen Nicht-CF Kontrollen (Abb.9A,C,E) und innerhalb der einzelnen Entitäten (Abb.9B,D,F).

##### Lymphknoten:



**Abbildung 9:** Sezernierte IL-17A (A,B), IL-17F (C,D) und IL-22 (E,F) von Lymphknoten in CF und Kontrollen (A,C,E) und innerhalb der einzelnen Entitäten (B,D,F).

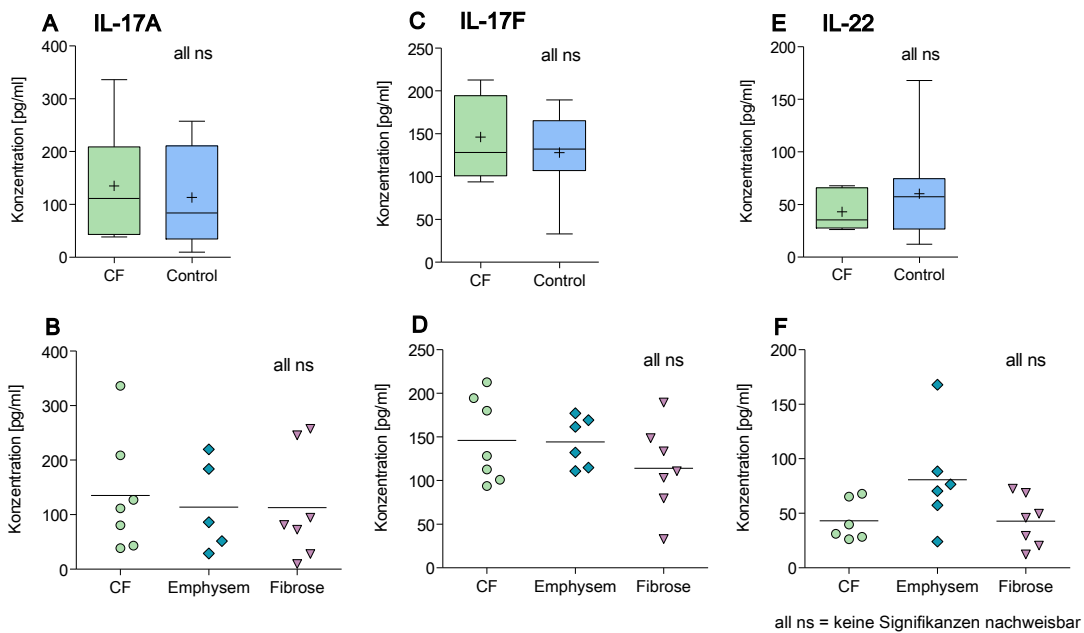
Die Lymphknotenzellen CF ergaben gegenüber den Kontrollen eine signifikant erhöhte Sekretion von IL-17F ( $p=0,003$ , Abb.9C) und IL-22 ( $p=0,003$ , Abb.9E), wohingegen die IL-17A Sekretion nicht signifikant erhöht war (Abb.9A). Im Vergleich der einzelnen Entitäten zeichnete sich in CF-Lymphknotenzellen insgesamt die im Durchschnitt höchste Konzentration an IL-17A, IL-17F und IL-22 ab bei ähnlicher Konzentration aller drei Interleukine in Emphysem und Spendern und einer verminderten Konzentration von IL-17A und IL-22 in Fibrose. Der Vergleich CF zu Fibrose erbrachte signifikant erhöhte IL-17A ( $p=0,045$ , Abb.9B) und IL-22 ( $p=0,013$ , Abb.9F) Sekretion

durch CF. Die IL-17F Sekretion war bei CF im Vergleich zu Spendern ebenfalls signifikant erhöht ( $p=0,022$ , Abb.9D).

#### 4.2.2 Vergleich der IL-17A, IL-17F und IL-22 Sekretion in Lungengewebszellen

Im nächsten Auswertungsschritt erfolgte die Analyse der Lungengewebszellen (Abb.10). Hier zeigten sich keine signifikanten Unterschiede der sezernierten Interleukine IL-17A, IL-17F und IL-22 zwischen CF und Kontrollen oder innerhalb der drei Endstage Entitäten. Die mittlere Produktion von IL-17A in CF war leicht erhöht mit ähnlichen Konzentrationen in Emphysem und Fibrose (Abb.10B), während IL-17F gleichmäßig stark in CF und Emphysem und leicht vermindert in Fibrose sezerniert wurde (Abb.10D). IL-22 erwies die höchste Konzentration in Emphysem, während CF und Fibrose vergleichbare Mengen an IL-22 sezernierten (Abb.10F).

##### Lungengewebe:



**Abbildung 10:** Sezernierte IL-17A (A,B), IL-17F (C,D) und IL-22 (E,F) von Lungenlymphozyten in CF (A,C,E) und innerhalb der einzelnen Entitäten (B,D,F).

### 4.3 Durchflusszytometrische Analyse der IL-17A und IL-22 Produktion durch CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> und CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen

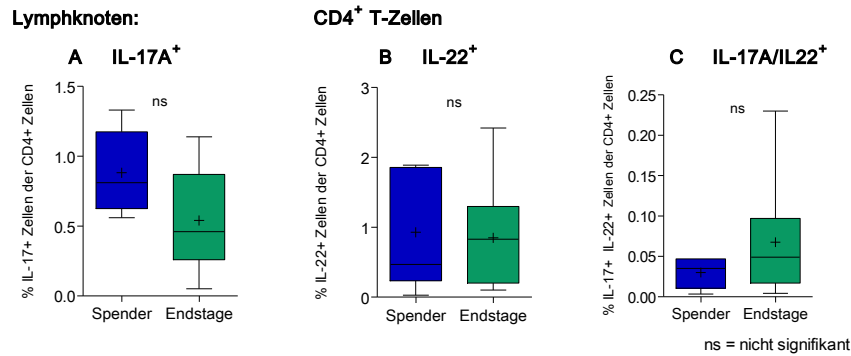
Die isolierten Zellen aus Lymphknoten und Lungengewebe wurden zur weiteren durchflusszytometrischen Analyse zunächst antigenunspezifisch stimuliert. Durch die Zugabe eines Protein-Transport-Inhibitors zu den Zellkulturen wurde die Sekretion der Interleukine nach extrazellulär blockiert. So konnten diese durch verschiedene Zellmarker und Interleukin spezifische Fluoreszenzfarbstoffe intrazellulär angefärbt werden. Anhand der Färbung der spezifischen CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> und CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> Zellmarker erfolgte die separate Quantifizierung der Interleukinproduktion innerhalb dieser Lymphozytenpopulationen. Dazu wurden zunächst die CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> oder CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> Lymphozyten identifiziert. In diesen Populationen folgte anschließend die quantitative Messung der IL-17A, IL-22 und IL-17A/IL-22 koproduzierenden Zellen anteilig in Prozent der gesamten CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> bzw. CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> Zellpopulation.

Wir verglichen die Interleukin-positiven Zellen der einzelnen Entitäten untereinander, *Endstage* gegen die Spender sowie CF gegen alle Nicht-CF *Kontrollen* (Tab.19). Zugleich wurden Lymphknotenzellen und Lungengewebszellen verglichen. Im Gewebe wurde aufgrund mangelhafter Stichprobengröße der Fibrose- und Spendergruppe nur ein Vergleich zwischen CF (n=4) und Emphysem (n=5) und keine Unterteilung in die einzelnen Kohorten durchgeführt. Es ließen sich eindeutige Signifikanzen sowie nicht-signifikante Trends erkennen, die im Folgenden näher beschrieben werden.

#### 4.3.1 IL-17A und IL-22 Produktion durch CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> Lymphozyten aus lungendrainierenden Lymphknoten und Lungengewebe

Der Vergleich der Interleukin-positiven CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> Lymphknotenzellen zwischen Spender (n=5) und Endstage (n=25) zeigte den höchsten Anteil an IL-17<sup>+</sup> Zellen in Spender (Abb.11A), vergleichbare Anteile an IL-22<sup>+</sup> (Abb.11B) und einen erhöhten Anteil an IL-17A/IL-22<sup>+</sup> in Endstage (Abb.11C), ohne Signifikanz zu erreichen. Es ließ sich ein Trend zu vermehrten IL-17A<sup>+</sup> CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>-Zellen in lungengesunden Spendern erkennen (Mittelwert Spender=0,882%, Mittelwert Endstage=0,540%) (Abb.11A). In der Analyse der IL-17A/IL-22 koproduzierenden CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen (Abb.11C) fiel eine deutlich

breitere Streuung der Endstageproben mit einigen Proben mit hoher, wenn auch im Vergleich nicht signifikant gesteigerter Koproduktion dieser Zytokine, auf (Abb.11C).

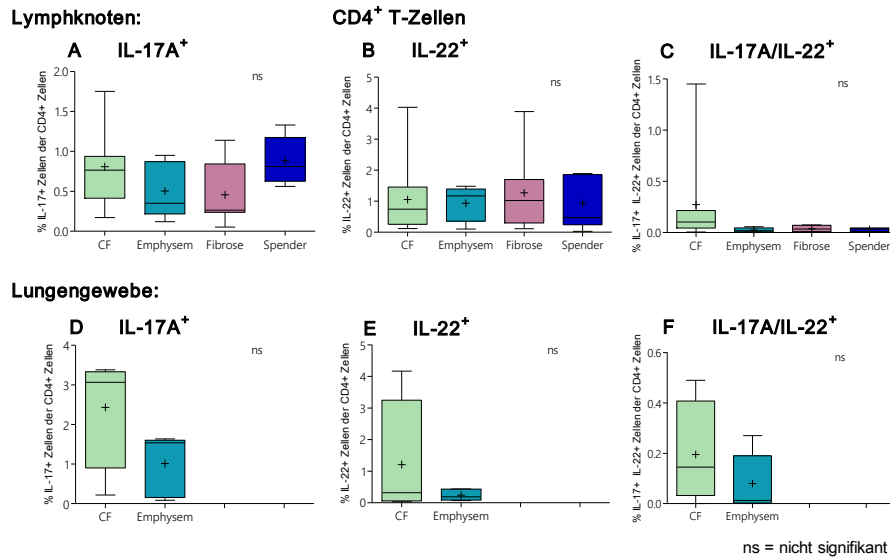


**Abbildung 11:** IL-17A<sup>+</sup> (A), IL-22<sup>+</sup> (B) und IL-17A/IL-22<sup>+</sup> (C) CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> Lymphknotenzellen im Vergleich Spender zu Endstage.

Diese Trends stellten sich ebenfalls in nicht-signifikanter Form heraus, wenn die einzelnen Entitäten getrennt voneinander im Vergleich zu den Spendern betrachtet wurden (Abb.12A-C).

In den Lymphknotenzellen (Abb.12A-C) ergaben die CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen der Spender eine erhöhte IL-17A-Produktion im Vergleich zu allen anderen Entitäten (Abb.12A), die jedoch statistisch nicht signifikant war. In den CF Proben ließ sich eine auffällig starke Streuung der IL-17A-Produktion (Abb.12A) nachweisen, die eine Differenzierung in „High Producer“ und „Low Producer“ erlaubt (Abb.16A), während Emphysem und Fibrose ähnlich niedrige Anteile an IL-17A<sup>+</sup> Zellen zeigen. Der Anteil an IL-22<sup>+</sup> Zellen war in allen vier Entitäten ähnlich, wobei sich zwei Proben als „High Producer“ in CF finden ließen (Abb.12B). Dieses Phänomen zeigte sich ebenfalls in den IL-17A/IL-22<sup>+</sup> koproduzierenden Zellen, wo insgesamt vermehrt „High Producer“ in der CF-Kohorte sichtbar wurden, während die anderen drei Entitäten einen konstant niedrigen Anteil an koproduzierenden Zellen aufwiesen (Abb.12C). Eine Signifikanz ließ sich bei der hier analysierten Anzahl der Proben nicht nachweisen (C: p=0,076, Abb.12C).

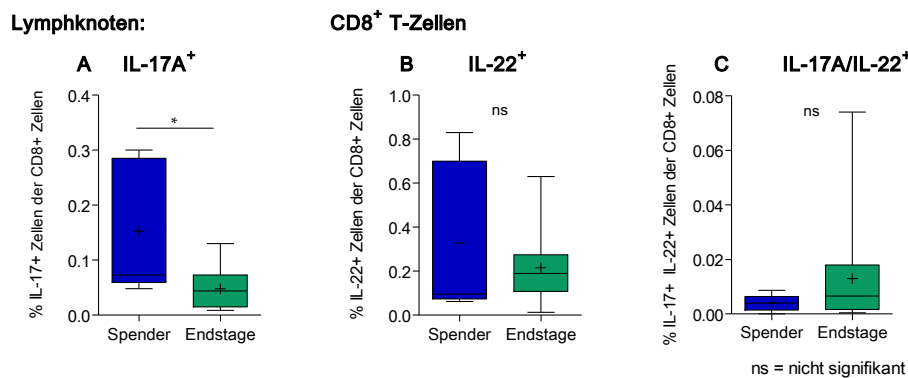
Im Gewebe zeichnete sich ein Trend zu höherer IL-17A und IL-22 sowie IL-17A/IL-22 Koproduktion durch die CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> Lungengewebszellen von CF Patienten im Vergleich zu Emphysem ab (Abb.12D-F), der sich allerdings als nicht signifikant darstellte. Ein Vergleich zu Fibrose und Spender sowie zu Endstage und Kontrollen erfolgte aufgrund zu geringer Stichprobengröße nicht.



**Abbildung 12:** IL-17A<sup>+</sup> (A,D), IL-22<sup>+</sup> (B,E) und IL-17A/IL-22<sup>+</sup> (C,F) CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> Lymphknoten- (A-C) und Lungengewebszellen (D-F) im Vergleich

#### 4.3.2 IL-17A und IL-22 Produktion durch CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> Lymphozyten aus lungendrainierenden Lymphknoten und Lungengewebe

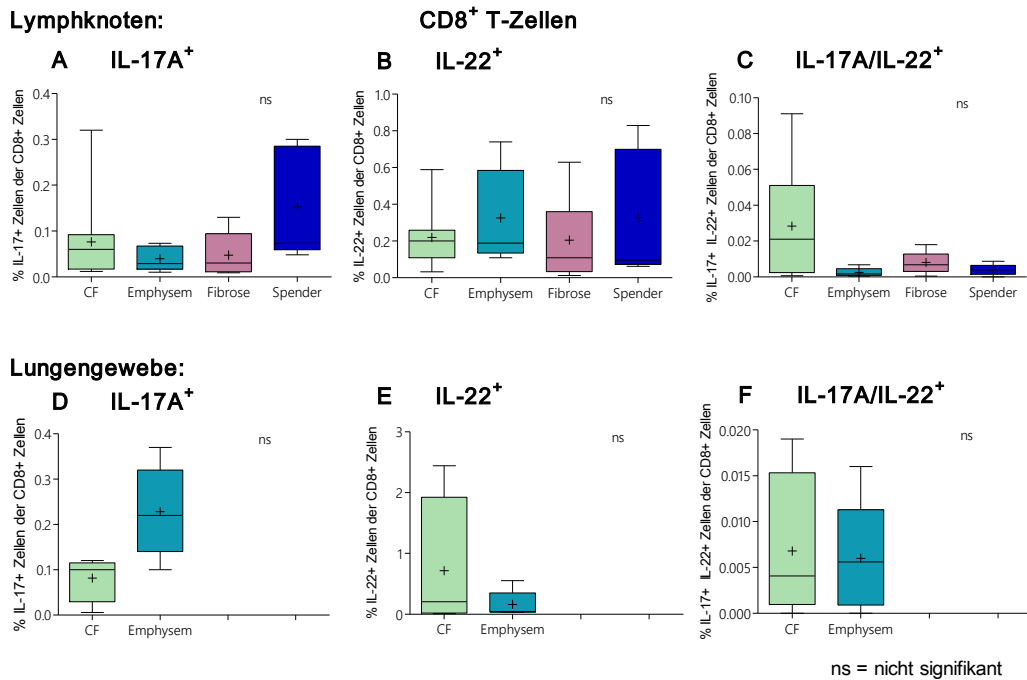
Die Spender wiesen die höchste IL-17A Produktion durch CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> Lymphknoten zellen auf, im Vergleich zur IL-17A Produktion durch Endstage war diese signifikant erhöht ( $p=0,031$ , Abb.13A). Auch der Anteil der IL-22<sup>+</sup> Zellen war in der Spenderkohorte erhöht (Abb.13B). Ähnlich wie bei den CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> Lymphknoten zellen ergaben auch die CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> Zellen in Endstage einen höheren Anteil und eine größere Streubreite der IL-17A/IL-22 koproduzierenden Zellen (Abb.13C), signifikante Unterschiede zu den Spenderlymphknoten zeichneten sich jedoch nicht ab.



**Abbildung 13:** IL-17A<sup>+</sup> (A), IL-22<sup>+</sup> (B) und IL-17A/IL-22<sup>+</sup> (C) CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> Lymphknoten zellen im Vergleich Spender zu Endstage.

Im Vergleich der einzelnen Entitäten hatten die Spenderlymphknotenzellen einen durchschnittlich höheren Anteil an IL-17A (Abb.14A) und IL-22 (Abb.14B) positiven CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> Zellen, gefolgt von CF in IL-17<sup>+</sup> und Emphysem in IL-22<sup>+</sup>. Die IL-17A/IL-22 koproduzierenden Zellen waren bei CF erhöht, während die anderen Entitäten ähnliche Anteile aufwiesen, jedoch ohne statistische Signifikanz zu erreichen (p=0,068, Abb.14C).

Im Lungengewebe zeigten sich mehr IL-17A<sup>+</sup> CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> Zellen in Emphysem als in CF (p=0,062, Abb.14D), wohingegen IL-22<sup>+</sup> in CF höher war (Abb.14E). Die Koproduktion beider Zytokine in diesen Entitäten war vergleichbar (Abb.14F). Eine Signifikanz wurde hier nicht erreicht.

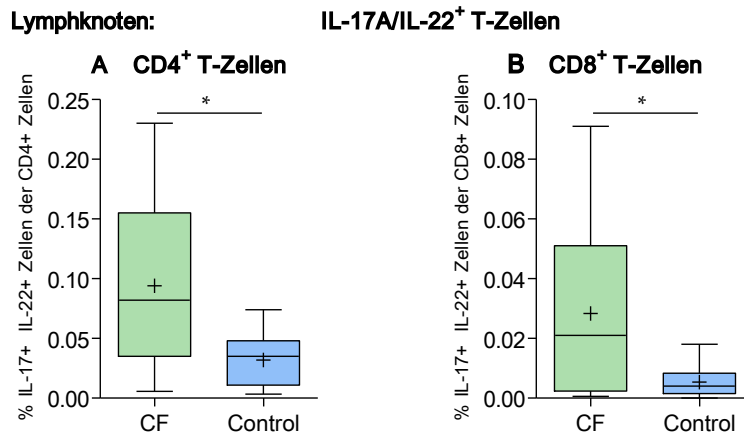


**Abbildung 14:** IL-17A<sup>+</sup> (A,D), IL-22<sup>+</sup> (B,E) und IL-17A/IL-22<sup>+</sup> (C,F) CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> Lymphknoten- (A-C) und Lungengewebszellen (D-F) im Vergleich

#### 4.3.3 IL-17A/IL-22<sup>+</sup> koproduzierende konventionelle T-Zellen in Lymphknoten bei CF

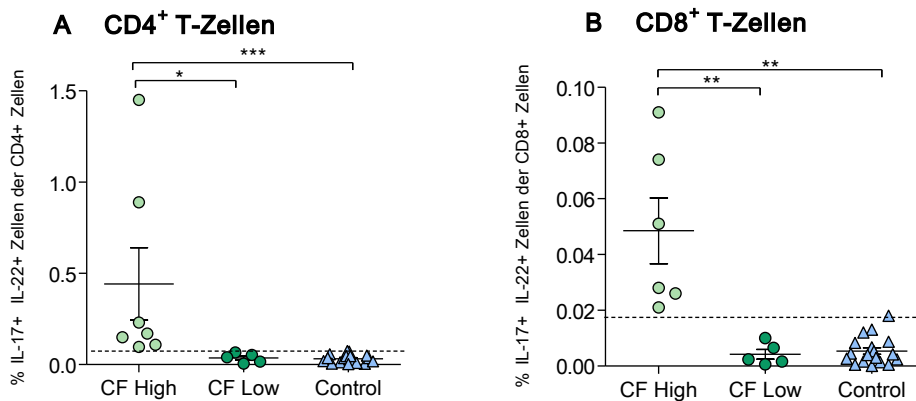
In unseren Analysen fiel ein Trend zu einer erhöhten Anzahl der IL-17A/IL-22 koproduzierenden CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> (Abb.12C) und CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> (Abb.14C) Zellen auf, welche aus Lymphknoten von CF Patienten isoliert wurden. Zur Bestätigung der Hypothese, dass CF Patienten die Zytokine IL-17A und IL-22 in höherem Maß durch konventionelle T-Zellen produzieren, wurden die Kohorten CF und Kontrollen verglichen (Abb.15). In dieser Analyse zeigte sich eine signifikant erhöhte Anzahl IL-17A/IL-22 koproduzierender T-Zellen in den CF Proben sowohl unter den CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> Zellen (p=0,017, Abb.15A) wie auch unter den CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> Zellen (p=0,0328, Abb.15B) der

Lymphknotenzellen, wohingegen die Kontrollen nur geringe Anteile doppeltpositiver Zellen aufwiesen.



**Abbildung 15:** Anteil der IL-17A/IL-22 koproduzierenden Lymphknotenzellen bei CF und in den Kontrollen. A: CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> B: CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup>.

Dabei konnten wir innerhalb der CF-Kohorte eine eindeutige Zuordnung der Proben zu „Low Producer“ (*CF low*), die einen vergleichbaren Anteil an doppeltpositiven Zellen wie die Kontrollen aufwiesen, und „High Producer“ (*CF High*) mit >0,075% IL-17A/IL-22 koproduzierenden CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen ( $p=0,003$ , Abb.16A) bzw. mit >0,018% IL-17A/IL-22 koproduzierenden CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen ( $p=0,001$ , Abb.16B) vornehmen. Diese „High Producer“ finden sich in den Kontrollen nicht.



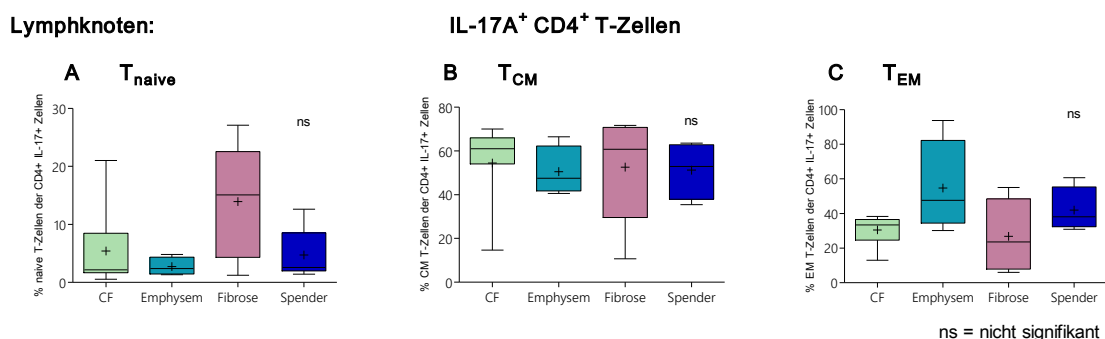
**Abbildung 16:** Aufteilung der IL-17A/IL-22 CF-Lymphknotenzellen nach „High Producer“ (*CF High*) und „Low Producer“ (*CF low*) und Vergleich mit Kontrollen (*Control*) in CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> Zellen (A) und CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> Zellen (B).

## 4.4 FACS-Analyse der CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> Gedächtnis-T-Zellen

Zum Verständnis des fehlgeleiteten Entzündungsgeschehen der Lunge erschien eine Untersuchung der verschiedenen Gedächtnis-T-Zellsubtypen in Zusammenhang mit der IL-17A und IL-22 Produktion der T-Lymphozyten sinnvoll. In dieser Arbeit erfolgte eine Quantifizierung von CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T<sub>naive</sub>, T<sub>CM</sub> und T<sub>EM</sub> innerhalb der Interleukin positiven Zellpopulationen. Für deren Darstellung wurden zunächst CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen mittels Durchflusszytometrie identifiziert. Eine anschließende Bestimmung von IL-17A<sup>+</sup>, IL-22<sup>+</sup> und doppelt positiven Zellen ergab insgesamt drei Subpopulationen, für welche die weitere Differenzierung nach Gedächtniszellstatus erfolgte. In jeder dieser Subpopulationen wurde eine Differenzierung in T<sub>naive</sub> (CD45RA<sup>+</sup> CCR7<sup>+</sup>), T<sub>CM</sub> (CD45RA<sup>-</sup> CCR7<sup>+</sup>) und T<sub>EM</sub> (CD45RA<sup>-</sup> CCR7<sup>-</sup>) anhand der entsprechenden Antikörperfärbungen durchgeführt (Kap.3.3.1).

### 4.4.1 Vergleich der Gedächtniszellen in Lymphknoten

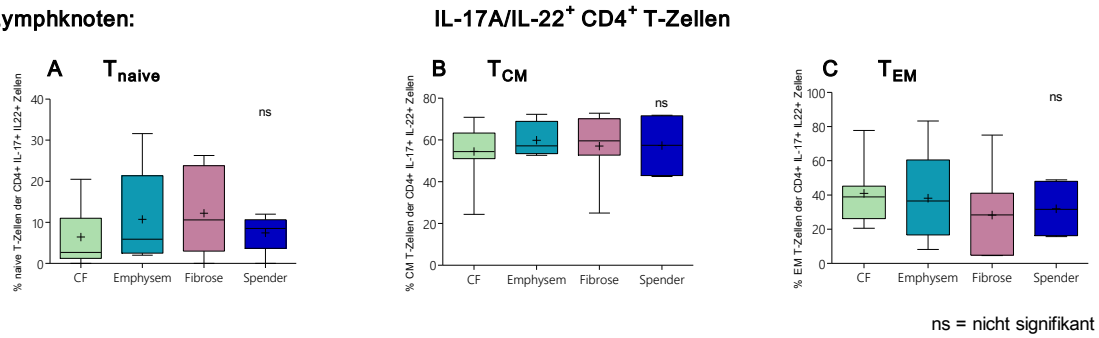
Zunächst erfolgte der quantitative Vergleich der Gedächtniszellen in den Lymphknotenproben zwischen den verschiedenen Entitäten. Die relativen Anteile der T<sub>naive</sub>, T<sub>CM</sub> und T<sub>EM</sub> innerhalb der IL-17A (Abb.17) und der IL-17A/IL-22 (Abb.18) positiven Populationen in den Lymphknoten zeigten dabei keine signifikanten Unterschiede zwischen den Entitäten. In der IL-17A<sup>+</sup> Population (Abb.17) fand sich ein erhöhter Anteil an T<sub>naive</sub> in Fibrose (Abb.17A). Der Anteil an T<sub>CM</sub> (Abb.17B) dieser Population waren in allen Entitäten ähnlich. In Emphysem konnten wir einen erhöhten Anteil an T<sub>EM</sub> (Abb.17C) nachweisen.



**Abbildung 17:** Anteile der T<sub>naive</sub> (A), T<sub>CM</sub> (B) und T<sub>EM</sub> (C) an IL-17A<sup>+</sup> Lymphknotenzellen.

Innerhalb der IL-17A/IL-22<sup>+</sup> ergaben sich für alle drei Gedächtniszelltypen insgesamt sehr ähnliche Verteilungsmuster (Abb.18A-C).

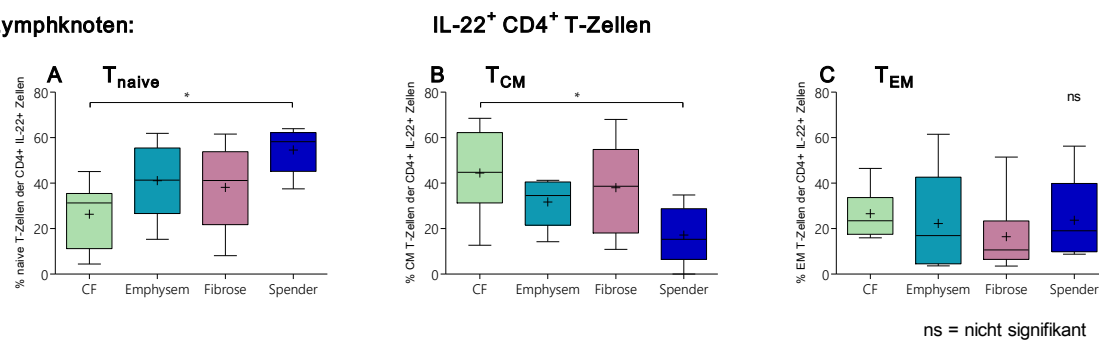
Lymphknoten:



**Abbildung 18:** Anteile der  $T_{naive}$  (A),  $T_{CM}$  (B) und  $T_{EM}$  (C) an IL-17A/IL-22<sup>+</sup> Lymphknotenzellen

Innerhalb der IL-22<sup>+</sup> Zellpopulation in den Lymphknotenproben von CF Patienten fand sich ein signifikant reduzierter Anteil von  $T_{naive}$  im Vergleich zu den Spenderlymphknoten ( $p=0,015$ , Abb.19A). Die Spender zeigten den höchsten Anteil und CF den geringsten Anteil an  $T_{naive}$  (Abb.19A). Der Anteil von  $T_{CM}$  war hingegen bei CF am höchsten und signifikant erhöht gegenüber den Spendern ( $p=0,013$ , Abb.19B).  $T_{EM}$  wies keine relevanten Unterschiede in den Anteilen zwischen den Entitäten auf (Abb.19C).

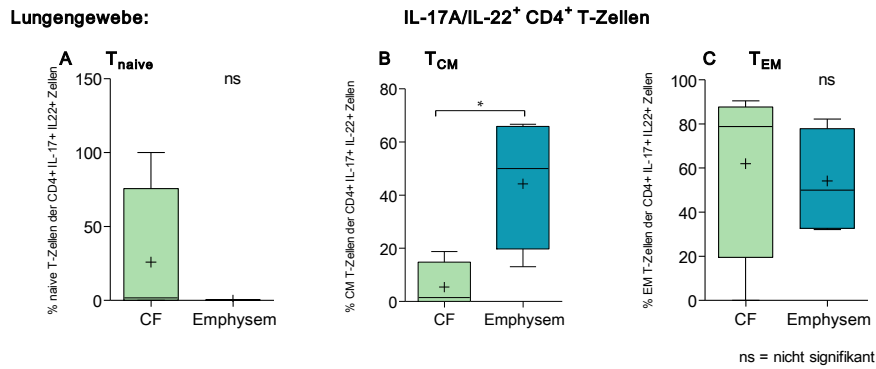
Lymphknoten:



**Abbildung 19:** Anteile der  $T_{naive}$  (A),  $T_{CM}$  (B) und  $T_{EM}$  (C) an IL-22<sup>+</sup> Lymphknotenzellen.

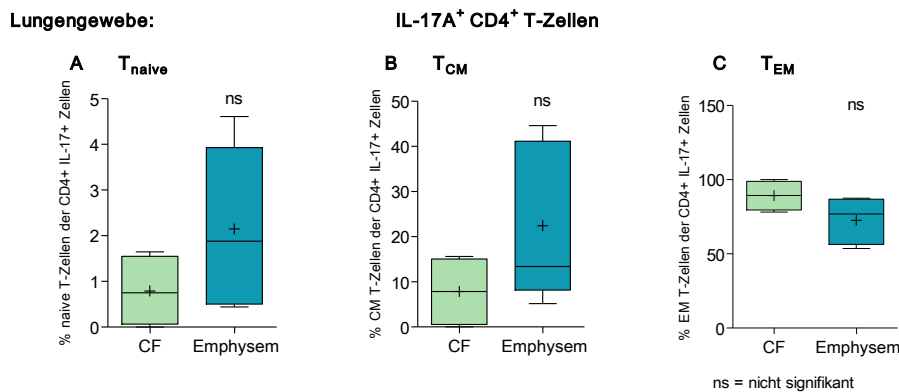
#### 4.4.2 Vergleich der Gedächtniszellen im Lungengewebe

Im Gewebe verglichen wir aufgrund mangelnder Stichprobengröße der Fibrose- und Spendergruppe nur CF und Emphysem. Hier fanden sich signifikante Differenzen in der Verteilung der Gedächtniszellpopulationen nur bei den  $T_{CM}$  der IL-17A/IL-22 koproduzierenden Population (Abb.20B). CF zeigte dabei einen verminderten Anteil an  $T_{CM}$  im Vergleich zu Emphysem ( $p=0,037$ , Abb.20B). Umgekehrt war ein Trend zu einem höheren Anteil von  $T_{naive}$  bei den Proben von CF Patienten zu verzeichnen, der allerdings statistisch nicht signifikant war (Abb.20A). Der Anteil der  $T_{EM}$  ergab keine relevanten Unterschiede (Abb.20C).

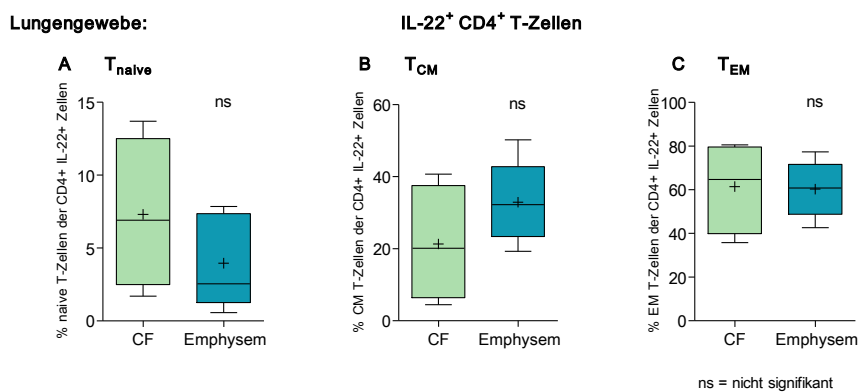


**Abbildung 20:** Anteile der  $T_{naive}$  (A),  $T_{CM}$  (B) und  $T_{EM}$  (C) an IL-17A/IL-22<sup>+</sup> Gewebezellen.

Die IL-17A<sup>+</sup> (Abb.21) und der IL-22<sup>+</sup> (Abb.22) Populationen im Lungengewebe erbrachten keine signifikanten Unterschiede in den relativen Anteilen der  $T_{naive}$ ,  $T_{CM}$  und  $T_{EM}$ . Emphysem wies erhöhte Anteile an  $T_{naive}$  (Abb.21A) und  $T_{CM}$  (Abb.21B) und einen geringeren Anteil an  $T_{EM}$  (Abb.21C) als CF in der IL-17<sup>+</sup> Population auf. In der IL-22<sup>+</sup> Population präsentierte CF höhere Anteile an  $T_{naive}$  (Abb.22A), geringere Anteile an  $T_{CM}$  (Abb.22B) und vergleichbare Anteile an  $T_{EM}$  (Abb.22C).



**Abbildung 21:** Anteile der  $T_{naive}$  (A),  $T_{CM}$  (B) und  $T_{EM}$  (C) an IL-17A<sup>+</sup> Gewebszellen.



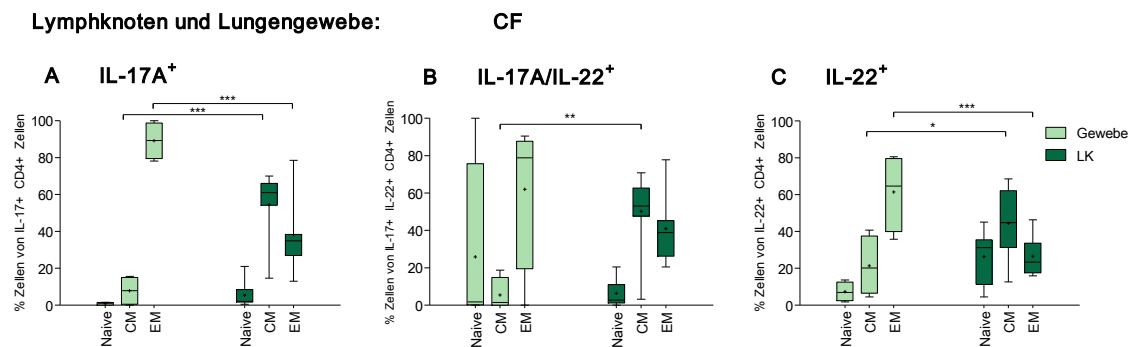
**Abbildung 22:** Anteil der  $T_{naive}$  (A),  $T_{CM}$  (B) und  $T_{EM}$  (C) an IL-22<sup>+</sup> Gewebszellen.

#### 4.4.3 Verteilung der Gedächtniszellen nach Lokalisation in Lunge oder Lymphknoten

Innerhalb der CF Kohorte fanden wir im Lungengewebe die  $T_{EM}$  als größten Anteil innerhalb der  $CD3^+ CD4^+ IL-17A^+$  (Abb.23A),  $IL-17A/IL-22^+$  (Abb.23B) und  $IL-22^+$  (Abb.23C) Zellen. Zusätzlich war ein gewisser Anteil von  $T_{CM}$  nachweisbar, aber ein nur sehr geringer Anteil  $T_{naive}$  in  $IL-17A^+$  (Abb.23A) und  $IL-22^+$  (Abb.23C). In der  $IL-17A/IL-22^+$  Population (Abb.23B) zeigte sich ein deutlich erhöhter Anteil an  $T_{naive}$  mit insgesamt größerer Varianz im Gewebe.

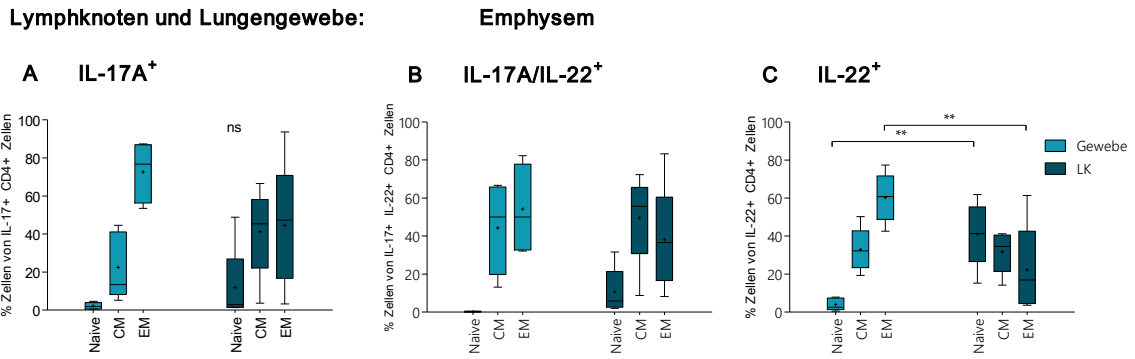
In den Lymphknotenzellen bildete  $T_{CM}$  ebenfalls den größten Anteil in allen drei Populationen, gefolgt von  $T_{EM}$  mit erneut nur wenigen  $T_{naive}$  (Abb.23A-C). Die  $T_{naive}$  waren leicht vermehrt in der  $IL-22^+$  Population zu finden (Abb.23C).

Im Vergleich zwischen Lungenlymphozyten und Lymphknotenzellen zeigten die  $IL-17A^+$  sowie die  $IL-22^+$  Population signifikant weniger  $T_{CM}$  und vermehrt  $T_{EM}$  im Lungengewebe (Abb.23A,C). In der  $IL-17A/IL-22^+$  Population war nur  $T_{CM}$  signifikant vermindert im Gewebe, der Anteil der  $T_{EM}$  war zwischen Gewebe und Lymphknoten vergleichbar (Abb.23B).



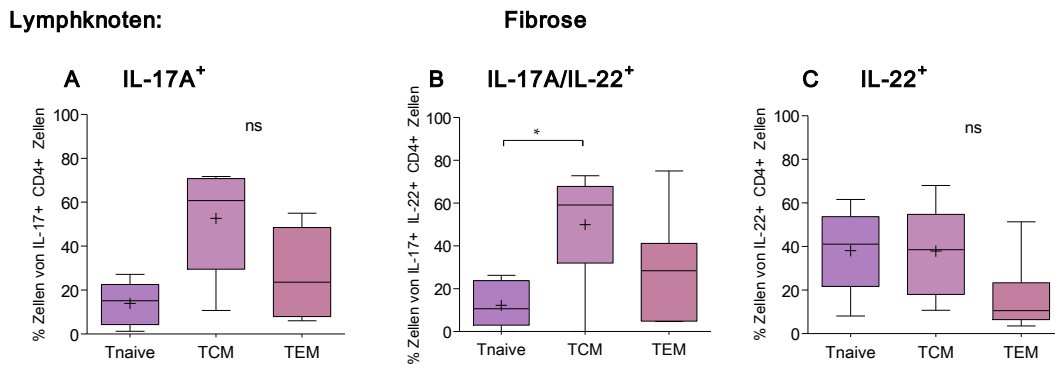
**Abbildung 23:** Anteil der  $T_{naive}$ ,  $T_{CM}$  und  $T_{EM}$  innerhalb der  $CD3^+ CD4^+ IL-17A^+$  und/oder  $IL-22^+$  Populationen in Lymphozyten aus Lymphknoten und Lungengewebe von CF-Patienten. A:  $IL-17A^+$ , B:  $IL-17A/IL-22^+$ , C:  $IL-22^+$ .

Eine analoge Auswertung der Emphysemgruppe ergab eine vergleichbare Verteilung der Gedächtniszellpopulation wie bei den CF Proben (Abb.24). Auffällig war in dieser Kohorte jedoch das Fehlen der  $T_{naive}$  unter den  $IL-17A/IL22^+$  Gewebslymphozyten im Vergleich zu CF (Abb.24B). Signifikanz wurde ausschließlich in der  $IL-22^+$  Population erreicht (Abb.24C). Hier ergaben sich ein signifikant geringerer Anteil von  $T_{naive}$  im Gewebe ( $p < 0,01$ ) sowie ein signifikant höherer Anteil von  $T_{EM}$  im Gewebe ( $p < 0,01$ ) verglichen mit den Lymphknotenzellen.



**Abbildung 24:** Anteil der  $T_{naive}$ ,  $T_{CM}$  und  $T_{EM}$  innerhalb der  $CD3^+ CD4^+ IL-17A^+$  und/oder  $IL-22^+$  Populationen in Lymphozyten aus Lymphknoten und Lungengewebe von Emphysempatienten. A:  $IL-17A^+$ , B:  $IL-17A/IL-22^+$ , C:  $IL-22^+$ .

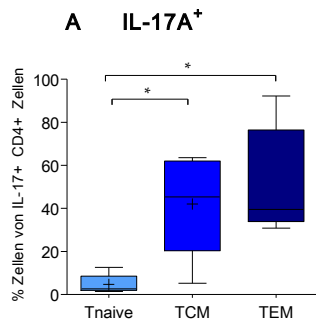
Aufgrund unzureichend großer Stichproben des Gewebes in der Fibrosegruppe erfolgte hier nur eine Analyse der Lymphknotenzellen ohne Vergleich zum Gewebe (Abb.25). Die Verteilung der Gedächtnis-T-Zellen zeigt sich ähnlich wie bei den zuvor beschriebenen Entitäten mit  $T_{CM} > T_{EM} > T_{naive}$  und einem erhöhten Anteil an  $T_{naive}$  in der  $IL-22^+ CD4^+$  Population (Abb.25).



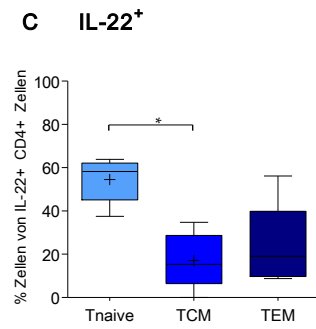
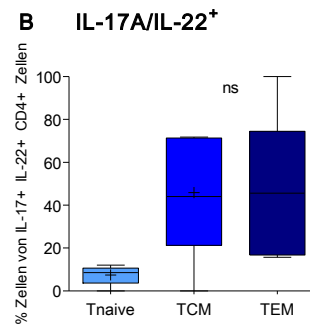
**Abbildung 25:** Anteil der  $T_{naive}$ ,  $T_{CM}$  und  $T_{EM}$  innerhalb der  $CD3^+ CD4^+ IL-17A^+$  und/oder  $IL-22^+$  Populationen in Lymphozyten aus Lymphknoten von Fibrosepatienten. A:  $IL-17A^+$ , B:  $IL-17A/IL-22^+$ , C:  $IL-22^+$ .

Beim Vergleich der drei untersuchten Krankheitsentitäten mit den Spendern fiel eine differente Verteilung auf, insbesondere hinsichtlich der Verteilung der  $T_{naive}$  (Abb.26). Während die  $IL-17A^+$  (Abb.26A) und die doppelpositiven Zellen (Abb.26B) nur einen geringen Anteil an  $T_{naive}$  aufwiesen, zeigte diese Population unter den  $IL-22^+$  Zellen einen deutlich erhöhten Anteil (Abb.26C).  $T_{CM}$  und  $T_{EM}$  hatten vergleichbare Anteile in allen drei zytokinspezifischen Populationen.

Lymphknoten:



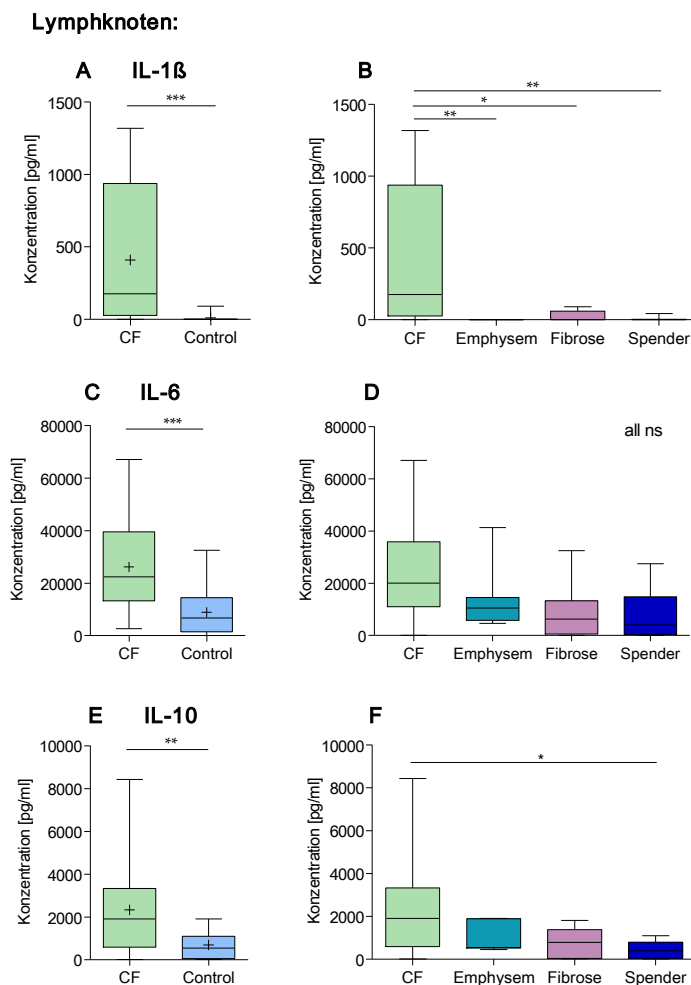
Spender



**Abbildung 26:** Anteil der  $T_{naive}$ ,  $T_{CM}$  und  $T_{EM}$  innerhalb der  $CD3^+ CD4^+ IL-17A^+$  und/oder  $IL-22^+$  Populationen in Lymphozyten aus Lymphknoten von Organspendern. A:  $IL-17A^+$ , B:  $IL-17A/IL-22^+$ , C:  $IL-22^+$ .

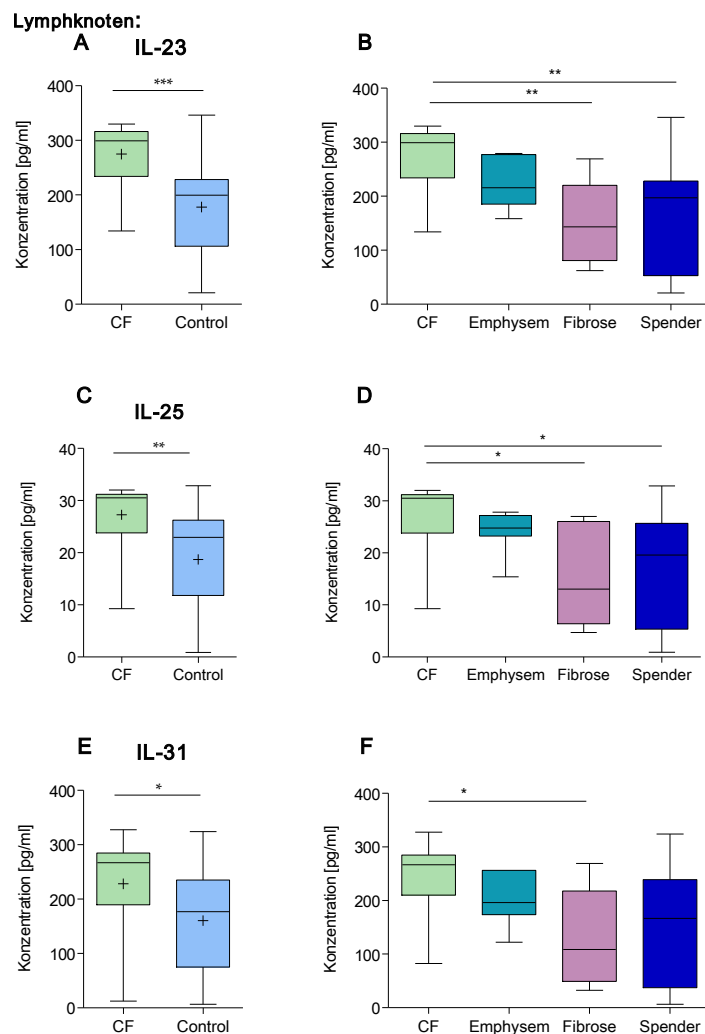
## 4.5 Multiplexanalyse weiterer Analyten des T<sub>H</sub>17 Signalwegs

Im dem verwendeten Multiplexassay des T<sub>H</sub>17 Signalwegs befanden sich neben IL-17A, IL-17F und IL-22, die bereits oben präsentiert wurden, auch weitere Zytokine, die einen Einfluss auf eine T<sub>H</sub>17-assoziierte Entzündungsreaktion nehmen, wie die Interleukine IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-6, IL-10, IL-21, IL-23, IL-25, IL-31, IL-33 sowie IFN $\gamma$ , sCD40L und TNF $\alpha$ . Auch hier verglichen wir die quantitative Sekretion der einzelnen Analyten im Hinblick auf die verschiedenen Krankheitsentitäten in Lymphknoten mittels Multiplexanalyse. Da sich TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und IL-6 oberhalb der Messgrenze des Multiplex befanden, wurde nach Verdünnung der Überstände eine erneute Messung mittels ELISA durchgeführt (Kap.3.3.4).



**Abbildung 27:** Sezernierte IL-1 $\beta$  (A,B), IL-6 (C,D) und IL-10 (E,F) von Lymphknotenzellen im Vergleich CF zu Kontrollen (A,C,E) und innerhalb der einzelnen Entitäten (B,D,F).

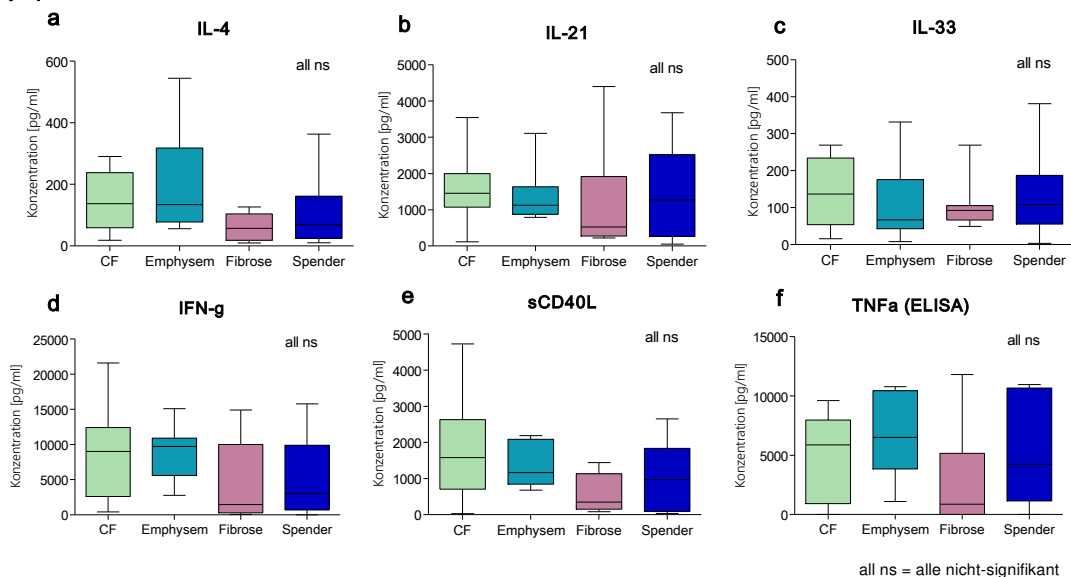
In den Lymphknotenzellen zeigte sich eine signifikant gesteigerte Sekretion der Zytokine IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, IL-23, IL-25 und IL-31 in CF (Abb.27,28). IL-1 $\beta$  erwies sich bei CF als erhöht verglichen mit Nicht-CF-Kontrollen ( $p < 0,001$ , Abb.27A). Der Vergleich der IL-1 $\beta$  Sekretion von CF zu den anderen Krankheitsentitäten ergab ebenfalls eine signifikant höhere Sekretion in CF im Vergleich zu jeder anderen Krankheitsentität (Abb.27B). Die IL-6 Produktion war bei CF im Vergleich zu allen anderen Entitäten ebenfalls erhöht mit einem Signifikanzniveau von  $p = 0,007$  in CF (Abb.27C), was sich jedoch im Vergleich zwischen CF und den anderen Entitäten nicht darstellen ließ (Abb.27D). CF zeigte weiterhin eine signifikant höhere IL-10 Produktion ( $p = 0,09$ , Abb.27E). Dies konnte auch gegenüber den Spendern im Vergleich zu CF nachgewiesen werden, nicht jedoch im Vergleich zu den anderen Krankheitsentitäten ( $p = 0,019$ , Abb.27F).



**Abbildung 28:** Sezernierte IL-23 (A,B), IL-25 (C,D) und IL-31 (E,F) von Lymphknotenzellen in CF (A,C,E) und innerhalb der einzelnen Entitäten (B,D,F).

Auch die Interleukine IL-23 ( $p=0,0004$ , Abb.28A-B), IL-25 ( $p=0,003$ , Abb.28C-D) und IL-31 ( $p=0,017$ , Abb.28E-F) wurden in CF im Vergleich zu allen anderen Entitäten vermehrt sezerniert. Im Einzelvergleich der Entitäten ergab sich für alle drei Interleukine eine signifikant stärkere Sekretion durch CF im Vergleich zu Fibrose sowie für IL-23 (Abb.28B) und IL-25 (Abb.28D) zusätzlich zu den Spendern.

#### Lymphknoten:

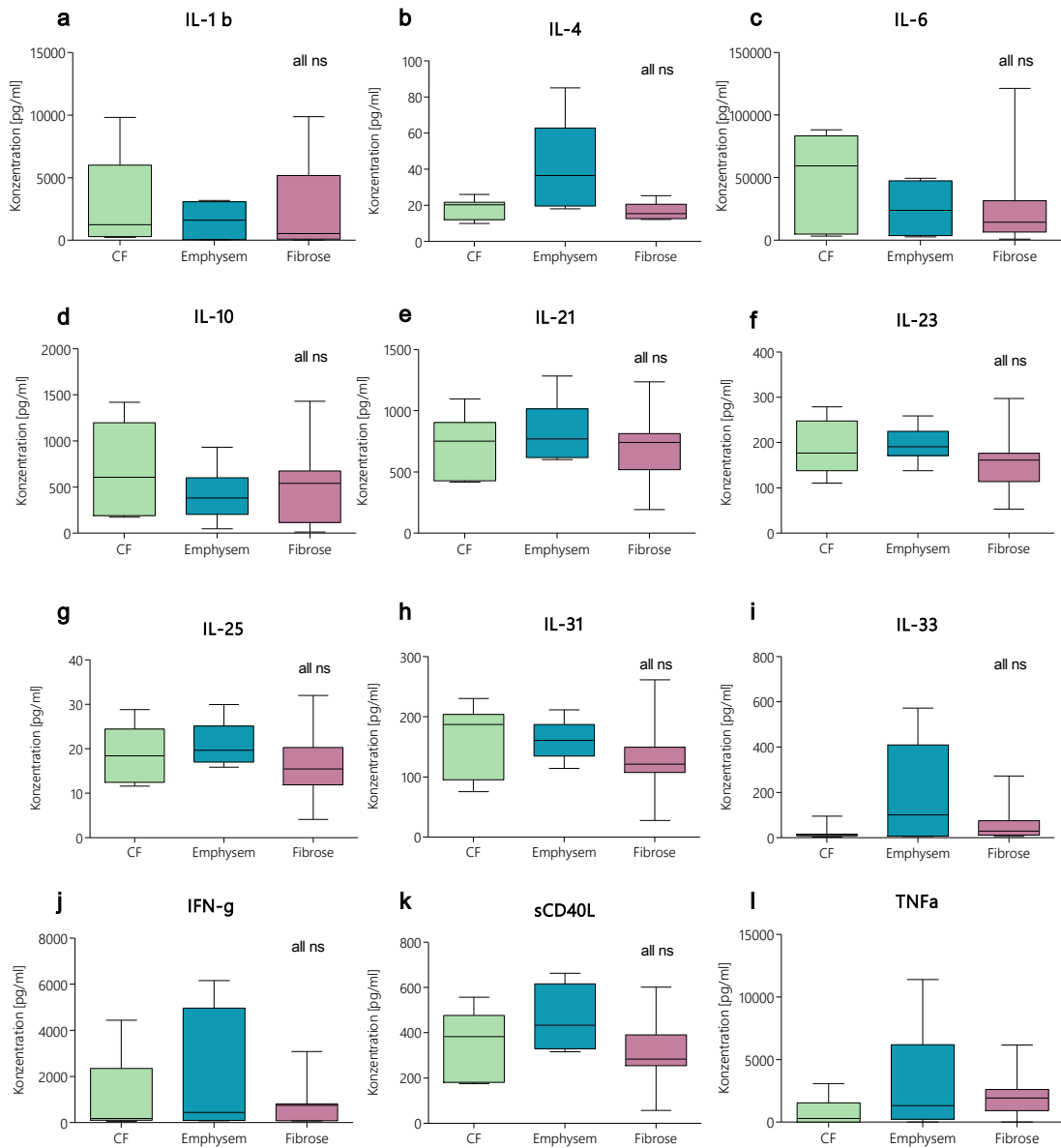


**Abbildung 29:** weitere sezernierte  $T_H17$  Zytokine von Lymphknotenzellen in CF und innerhalb der einzelnen Entitäten (a: IL-4, b: IL-21, c: IL-33, d: IFN $\gamma$ , e: sCD40L, f: TNF $\alpha$ )

Die Zytokine IL-4, IL-21, IL-33 sowie IFN $\gamma$ , sCD40L und TNF $\alpha$  zeigten keine Trends oder Signifikanzen und somit unabhängig der Krankheitsentität eine ähnliche Konzentration innerhalb der Lymphknotenzellen (Abb.29).

In der Auswertung der Lungengewebszellen (Abb.30) konnten wir die oben beschriebenen signifikanten Unterschiede nicht nachweisen. Insgesamt zeigten sich hier keine signifikanten Unterschiede der Produktion der  $T_H17$  assoziierten Zytokine zwischen den einzelnen Entitäten, wobei ein Vergleich zu lungengesunden Spendern fehlt. CF wies die durchschnittlich höchste Konzentration an IL-1 $\beta$ , IL-6 und IL-10 und die niedrigste Konzentration an IL-4, IL-33 und IFN $\gamma$  auf. Emphysem stellte die höchste Konzentration an IL-4, IL-21, IL-33, IFN $\gamma$ , sCD40L und TNF $\alpha$  und die niedrigste Konzentration an IL-1 $\beta$ , IL-6 und IL-10 dar. Fibrose ergab keine besonderen Auffälligkeiten. Eine vergleichbare Verteilung aller drei Entitäten zeigte sich in IL-21, IL-23, IL-25 und IL-31 (Abb.30).

**Lungengewebe:**



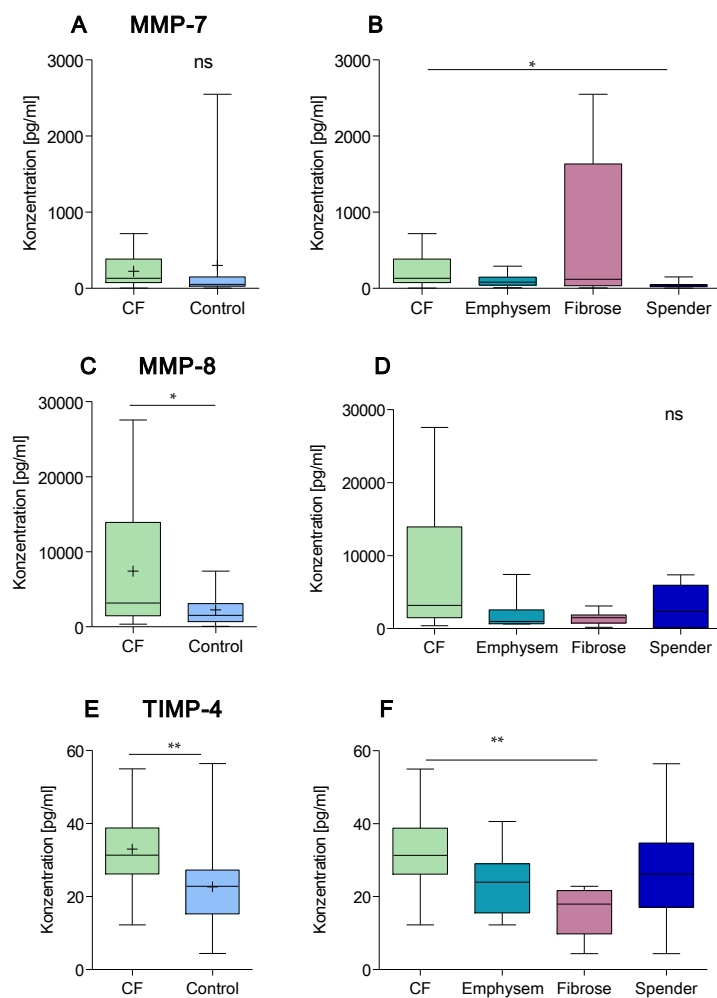
all ns = alle nicht-signifikant

**Abbildung 30:** Sezernierte  $T_H17$  Zytokine von Gewebszellen in CF, Emphysem und Fibrose (a: IL-1 $\beta$ , b: IL-4, c: IL-6, d: IL-10, e: IL-21, f: IL-23, g: IL-25, h: IL-31, i: IL-33, j: IFN $\gamma$ , k: sCD40L, l: TNF $\alpha$ )

## 4.6 Analyse der sezernierten MMPs und TIMPs in Lymphknoten

Für eine umfassende Untersuchung des chronischen Remodellings in Lungenlymphknoten bei CF ergänzten wir unsere Untersuchung um die quantitative Bestimmung von MMPs und TIMPs mit dem Bio-Plex Pro™ Human MMP Panel, das die MMP-2, MMP-7, MMP-8, MMP-9, MMP-10 und MMP-12 sowie die TIMP-1, TIMP-2 und TIMP-4 umfasste. Wie bereits in den vorhergehend dargestellten Analysen wurde zunächst ein Vergleich zwischen CF und Kontrollen und anschließend ein Vergleich zwischen den einzelnen Entitäten durchgeführt.

### Lymphknoten:



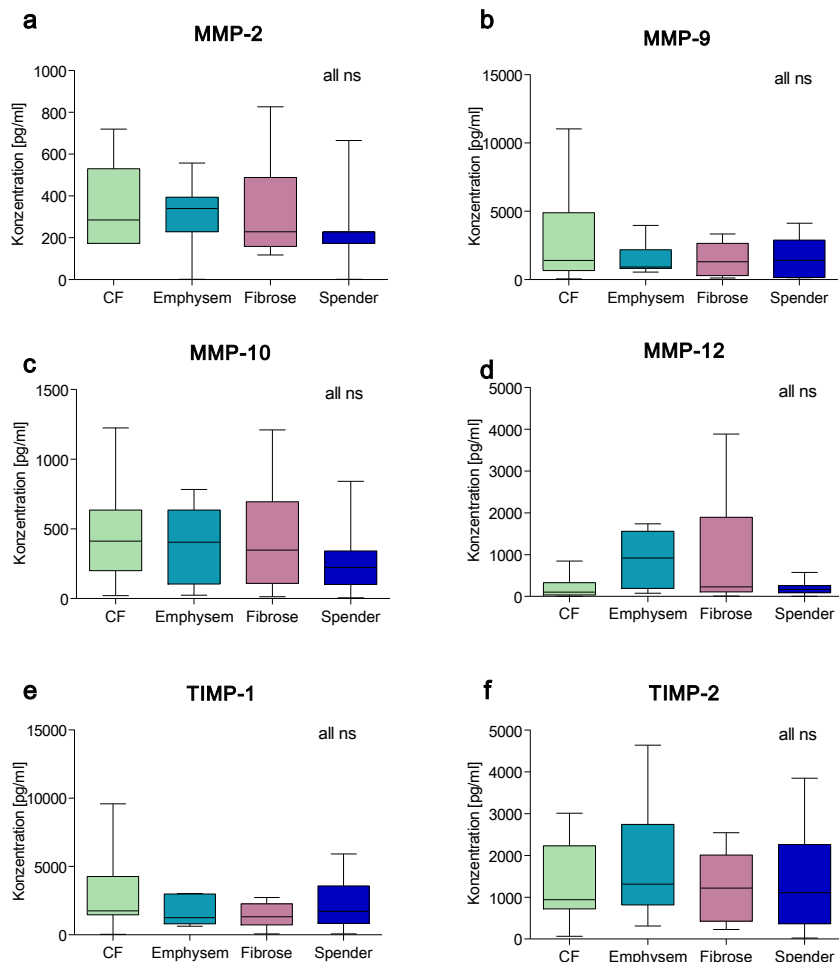
**Abbildung 31:** Sekretion von MMP-7 (A,B), MMP-8 (C,D) und TIMP-4 (E,F) von Lymphknotenzellen in CF gegenüber Kontrollen (A,C,E) und innerhalb der Entitäten (B,D,F)

Signifikante Unterschiede zwischen CF und Kontrollen zeigten sich für MMP-7, MMP-8 und TIMP-4 (Abb.31). Die Sekretion von MMP-7 war signifikant vermehrt in CF

verglichen mit Spendern ( $p=0,020$ , Abb.31B). Die höchste Konzentration von MMP-7 fand sich in Fibrose (Abb.31B). CF wies die höchste Konzentration und eine signifikant höhere Sekretion von MMP-8 auf im Vergleich zu den Kontrollen ( $p=0,027$ , Abb.31C). CF zeigte auch eine signifikant höhere Sekretion von TIMP-4 verglichen zu den Kontrollen ( $p=0,007$ , Abb.31E) und im Vergleich zu Fibrose, während die Spender eine vergleichbare Konzentration aufwiesen ( $p=0,006$ , Abb.31F).

Die weiteren MMPs und TIMPs, die in die Analyse eingeschlossen wurden, erbrachten keine signifikanten Unterschiede oder erkennbare Trends in dem Vergleich zwischen den einzelnen Entitäten. Hierzu zählten MMP-2, MMP-9, MMP-10, MMP-12 sowie TIMP-1 und TIMP-2 (Abb.32A-F).

**Lymphknoten:**



all ns = alle nicht-signifikant

**Abbildung 32:** Weitere MMPs und TIMPs im Vergleich der einzelnen Entitäten. A: MMP-2, B: MMP-9, C: MMP-10, D: MMP-12, E: TIMP-1, F: TIMP-2

## 5 Diskussion

### 5.1 Zusammenfassung

Die Interleukine 17A und 22 spielen eine wichtige Rolle in der Pathogenese der zystischen Fibrose, wie aktuelle Publikationen belegen (Kap.1.6). Diesen Untersuchungen zufolge reguliert IL-17A die Expression pro-inflammatorischer und anti-infektiöser Mediatoren v.a. durch das Lungenepithel und hebt möglicherweise die sonst protektive Funktion des IL-22 auf. Ziel dieser Arbeit war die differenzierte Identifikation von IL-17A und IL-22 produzierenden adaptiven Lymphozytenpopulationen in Lungengewebe und lungendrainierenden Lymphknoten von CF Patienten, der Vergleich zu zwei weiteren Endstage-Lungenerkrankungen (Emphysem und Fibrose) und lungengesunden Spendern sowie die Untersuchung verschiedener Effektormechanismen in vivo. Hierzu dienten die folgenden drei Hypothesen als Leitstruktur für eine detaillierte Analyse des Entzündungsgeschehens von CF-Patienten:

1. Die Sekretion von IL-17A, IL-17F und IL-22 unterscheidet sich quantitativ zwischen CF und den anderen Entitäten.
2. Die Produktion von IL-17A und/oder IL-22 erfolgt bei CF durch andere T-Zell-Subpopulationen des erworbenen Immunsystems, u.a. durch verschiedene Gedächtnis-T-Zellen.
3. Die Effektormechanismen einer Immunabwehr, insbesondere die Sekretion weiterer Zytokine des  $T_H17$  Signalweges, und die Produktion von MMPs und TIMPs variiert zwischen CF und den anderen Entitäten.

Im Folgenden werden zunächst die Methoden hinsichtlich ihrer Stärken und Schwächen und im zweiten Teil die Ergebnisse im Einzelnen diskutiert.

### 5.2 Diskussion der Methoden

Als Patientenmaterial wurden bronchiale und tracheale (Spender) Lymphknoten sowie Lungengewebe aus Lungenexplantaten von Patienten verwendet. Wir untersuchten die drei häufigsten Krankheitsentitäten, die zur Lungentransplantation führen: Zystische Fibrose (CF), pulmonales Emphysem und pulmonale Fibrose, sowie Lymphknoten von Spenderlungen. Die Aufarbeitung der Zellen begann mit der Isolierung der Lymphozyten aus Lymphknoten und Lungengewebe. Insgesamt 65 der aufgearbeiteten Patientenproben erfüllten die Qualitätskriterien für eine weitere Analyse im FACS oder Multiplex, d.h. die isolierte Zellzahl war ausreichend für die gewünschte

Analyse, die Zellen konnten kontaminationsfrei kultiviert werden und in der Durchflusszytometrie erreichten sie einen prozentualen Anteil von min. 70% lebendiger Zellen und 90% Einzelzellen (Kap.3.2.1.4). Für die durchflusszytometrische Analyse erfolgte eine unspezifische Stimulation inklusive Protein-Transport-Inhibition und anschließend eine dreistufige Färbung mittels Zellmarker-spezifischen fluoreszierenden Antikörpern. Gleichzeitig wurden weitere isolierte Zellen unabhängig ihrer Zugehörigkeit zu einer bestimmten Subpopulation unspezifisch stimuliert und zur Sekretion von Zytokinen in die Zellüberstände angeregt, worin mittels Multiplexanalyse die T<sub>H</sub>17 assoziierten Zytokine sowie MMPs und TIMPs analysiert wurden.

### **5.2.1 Stärken und Schwächen der Probengewinnung und Patientenmaterialien**

Insgesamt zeichnet sich unsere Arbeit durch eine große Stichprobenmenge von humanem Gewebe aus. Die Probenzahl erreichte schließlich Werte, die es uns ermöglichten, die zu Beginn als Nicht-CF zusammengefassten Kontrollen für einige Analysen in die drei Kontrollgruppen Emphysem, Fibrose und Spender aufzuteilen. Einzelne weitere aufgearbeitete Proben seltener transplantationspflichtiger Krankheitsentitäten konnten aufgrund der hohen Probenzahl aus der Gesamtanalyse herausgenommen werden, sodass wir vier homogene Kohorten erhielten.

Die Grenzen dieser Arbeit in Hinblick auf die Materialien und Methoden lagen dennoch in der schwierigen Verfügbarkeit von humanen Proben und deren hoher Heterogenität. Letztere versuchten wir durch verschiedene Kontrollschritte in der Analyse möglichst gering zu halten, was jedoch nur bedingt gelang. Aus Gründen des Datenschutzes konnten wir leider nicht auf klinischen Daten zu den einzelnen Patienten zurückgreifen, daher fehlen in der Auswertung beispielsweise Informationen zu möglichen antientzündlichen Therapien wie Steroide, die sich direkt auf die von uns untersuchten Zellpopulationen auswirken und somit unsere Ergebnisse verändern konnten. Durch die Korrelation zu diesen sensiblen klinischen Daten wäre es u.U. gelungen, die Heterogenität der Proben zu reduzieren. Umgekehrt hätten wir voraussichtlich noch weitere Proben ausschließen müssen bzw. hätten durch weitere Gruppeneinteilungen die Stichprobengröße noch weiter reduziert, wodurch die Auswertbarkeit nicht einfacher geworden wäre.

Die geringe Stichprobengröße, hohe Heterogenität und fehlende Verfügbarkeit betraf in besonderem Maß die „lungengesunden“ Kontrollpersonen, bei denen es sich um Proben von Lungenspendern handelte. Da eine Materialgewinnung von gesunden Patienten sowohl aus ethischen als auch aus rein praktischen Gründen nicht möglich

war, mussten wir auf Organspender als weitestgehend lungengesunde Probenlieferanten zurückgreifen. Diese hatten zum Zeitpunkt der Organentnahme allerdings bereits einen letalen Prozess durchgemacht, was sich möglicherweise auf die Zellantworten auswirken könnte. Von den Organspendern konnten außerdem anstelle von bronchialen Lymphknoten nur paratracheale Lymphknoten gewonnen werden. Paratracheale Lymphknoten stellen eine übergeordnete Lymphknotenstation im lymphatischen Abfluss der Lunge dar und liegen im Gegensatz zu den hilären, intrapulmonalen Lymphknoten bereits extrapulmonal im Mediastinum (Schirren, et al., 2019). Somit könnten inflammatorische Prozesse des Mediastinums, wie z.B. eine Tracheitis, das Entzündungsgeschehen dieser Lymphknoten beeinflussen. Aufgrund des teils retrograden Lymphabflusses der lungendrainierenden Lymphknotenstationen (Schirren, et al., 2019), wäre eine Entzündungsreaktion jedoch in einem solchen Fall auch in den hilären (bronchopulmonalen) Lymphknoten zu erwarten. Daher wurden Proben mit bekannter Tracheitis (n=1) aus der Analyse rausgenommen. Weitere inflammatorisch bedeutsame Unterschiede dieser unterschiedlichen Lokalisation sind bisher nicht bekannt, wodurch uns der Vergleich beider Lokalisationen möglich erscheint. Das Lungengewebe, welches als Transplantat bestimmt war, konnte verständlicherweise nicht für unsere Studien genutzt werden. Die Vergleichbarkeit dieser Proben mit den verschiedenen Krankheitsentitäten ist daher nur bedingt möglich, insbesondere auch aufgrund der hier aus Datenschutzgründen vollständig fehlenden weiteren biometrische Angaben wie Alter oder Geschlecht.

Auffällig war in den Vergleichen, dass die Kontrollgruppen Emphysem und Fibrose im Vergleich zu CF in Hinblick auf die von uns durchgeführten Analysen eher inhomogene Krankheitsgruppen bildeten. Möglicherweise ist dies auf das höhere Lebensalter bei der Transplantation zurückzuführen (Abb.7A), wodurch altersabhängige Einflüsse die Entzündungsprozesse und das Immunsystem der Lunge beeinflussen. Insgesamt variierte das Patientenalter bei Transplantation zwischen sieben Jahren (CF) und 64 Jahren (Fibrose), wobei sich CF-Patienten ( $\bar{x}$  26,6 Jahre) einer Transplantation zwischen der ersten und vierten Lebensdekade und Emphysem-Patienten ( $\bar{x}$  57,3 Jahre) und Fibrose-Patienten ( $\bar{x}$  53,6 Jahre) dagegen zwischen der vierten und sechsten Lebensdekade (Abb.7A). Auch zeigte die Geschlechterverteilung der Fibroseproben eine deutliche Verschiebung zugunsten der männlichen Patienten (Abb.7B). In den Kohorten CF und Emphysem war die Geschlechterverteilung ausgeglichen (Abb.7B). Eine bestmögliche Strukturgleichheit, wie sie in wissenschaftlichen Kohorten gewünscht ist, konnte daher nicht erreicht werden und birgt die Gefahr von Bias.

Da die Aufarbeitung, insbesondere des Lungengewebes, z.T. nicht genügend Zellen erbrachte, um aus einer Probe alle Analysen durchzuführen, variieren die Stichprobengrößen der einzelnen Parameter, die wir analysierten. In einigen Fällen ergaben sich nach der Aufarbeitung insgesamt nicht genügend lebendige Zellen, sodass gesamte Proben aus der Analyse rausgenommen wurden, um die Ergebnisse nicht durch zu geringe Gesamtzellzahlen zu verfälschen. Dadurch wurden insbesondere die Stichproben des Lungengewebes vergleichsweise klein. Die Fibrosegruppe war von dieser Limitation in besonderem Maß betroffen und entfiel z.B. für den Vergleich im Lungengewebe vollständig, sodass Rückschlüsse auf die Gesamtpopulation nur bedingt möglich waren und der Vergleich sicher ein Bias aufweist.

Durch die enge Zusammenarbeit mit der Pathologie der MHH konnten wir unsere Analysen mit dem histopathologischen Befund der Kollegen korrelieren. Durch diese Korrelation zwischen Zytokinproduktion, Zellverteilung und histopathologischen Zusammenhängen konnten wir Aussagen und Vermutungen zu verschiedenen Krankheitseinflüssen treffen, die sich in den verschiedenen Analysen nachvollziehen ließen. Wir nutzten diese Möglichkeit zudem, um auffällige Proben sekundär aus den Analysen auszuschließen. So konnten wir durch diesen Ansatz vier CF-Patienten identifizieren, die sich als „High Cytokine-Producer“ in der Mehrzahl der Analysen darstellten. Außerdem zeigte eine Spenderprobe eines Lungendonors eine deutlich vermehrte Zytokinproduktion, die histologisch mit einer starken Entzündungsreaktion korrelierte, weshalb diese Probe nicht als „lungengesund“ angesehen werden konnte und daher aus der gesamten weiteren Analyse herausgenommen wurde.

### **5.2.2 Stärken und Schwächen der Probenaufarbeitung**

Durch die gute interdisziplinäre Zusammenarbeit an der MHH konnte die Aufarbeitung der Proben nur wenige Stunden nach chirurgischer Entnahme und Aufarbeitung durch die Pathologie erfolgen, sodass die Vitalität der Zellen zum größten Teil erhalten werden konnte. Dies zeigte sich auch in einer geringen Anzahl der aufgrund unzureichender Viabilität ausgeschlossenen Proben. Ab einem Anteil von weniger als 70% lebender Zellen in der Durchflusszytometrie, identifiziert durch eine Lebend-Tod-Färbung mit PacO, und weniger als 90% Einzelzellen (Kap.3.2.1.4) erfolgte der sekundäre Ausschluss der Probe aus den Analysen, wodurch ein gewisser Qualitätsstandard innerhalb der Proben etabliert und die Homogenität erhöht werden konnte.

Mögliche Störfaktoren der Probenaufarbeitung waren die Aufteilung der Aufarbeitung auf mehrere Personen sowie die Stimulation und die Färbung an zwei aufeinander folgenden Tagen, was aufgrund der zeitintensiven Arbeitsschritte nicht zu umgehen war. Durch letzteres nahmen wir ein mögliches Zellsterben während der Kultivierung der Zellen über Nacht in Kauf, welches schließlich in der FACS-Analyse am Folgetag detektiert werden konnte und bei betroffenen Proben zum sekundären Ausschluss führte.

Die Aufarbeitung des Lungengewebes gestaltete sich je nach Entität teils schwierig. Insbesondere das fibrotisch veränderte Gewebe unserer Fibrose-Patienten war vergleichsweise schwer aufzuarbeiten, wodurch die insgesamt isolierte Zellmenge dieser Proben häufig gering war. Auffällig waren bei einigen Lymphknoten außerdem sichtbare schwarze Verfärbungen bei Fibrose- und Emphysem-Patienten als möglicher Hinweis auf einen Nikotinabusus, der jedoch nicht mit klinischen Daten (Datenschutz) hinterlegt wurde. Patienten mit fortgeschrittenen Lungenerkrankungen, wie CF, Fibrose oder Emphysem, weisen häufig eine chronisch bakterielle oder mykotische Besiedlung der Lunge auf, weshalb die mehrstündige Kultivierung der Einzelzellsuspensionen, die für die Stimulation einer messbaren Zytokinproduktion benötigt wird, nur unter Zugabe hoher Konzentrationen von antimykotischen und antibakteriellen Zusätzen möglich war. Wir können einen Effekt dieser Zusätze auf die Zytokinproduktion nicht ausschließen. Ebenso wenig lagen uns detaillierte Daten zu patientenspezifischen bakteriellen oder mykotischen Infektionen und Besiedlungen vor, so dass wir keine Rückschlüsse ziehen können, ob bestimmte Infektionen die Zytokinproduktion spezifisch veränderten.

Ein weiterer Schwachpunkt im Hinblick auf die Extrapolation unserer Daten auf die Situation im Patienten besteht in der Auswahl der Stimulationsbedingungen. Die Stimulation der Zellen erfolgte unspezifisch mit PMA und Ionomycin (Kap.3.2.2) zwei pharmakologischen Agentien, d.h. die Zellen wurden maximal stimuliert, die gesamte ihnen mögliche Zytokinproduktion zu zeigen. Eine spezifische Stimulation durch z.B. bestimmte bakterielle oder mykotische Bestandteile, wie sie in vivo im Milieu der Lunge und in der Anwesenheit verschiedener Keime zu finden wäre, konnte damit nicht nachgeahmt werden.

### **5.2.3 Stärken und Schwächen der Datenanalyse**

Unsere Datenanalyse zeichnet sich durch den Vergleich und die daraus mögliche Korrelation des Entzündungsgeschehens in Lymphknoten- und Lungengewebe jedes einzelnen Patienten sowie die Kombination der zellspezifischen FACS- und

zytokinspezifischen Bioplexdaten aus. Hierdurch konnte ein umfassender Überblick über Charakteristika des Entzündungsgeschehens im Hinblick auf verschiedene Zytokine, Zelltypen und ihrer Lokalisationen erlangt werden. Gleichzeitig wurde zusätzliches Material für RNA Isolierung gewonnen und extrahiert, diese Ergebnisse sind aufgrund des großen Gesamtumfangs jedoch nicht in dieser Arbeit aufgeführt. Die Identifikation der Zytokinproduktion insgesamt sowie die Aufteilung nach Zellpopulationen in Lymphknoten und Lungengeweben bieten einen umfassenden Erkenntnisgewinn, der über den häufig durchgeführten Nachweis in leicht zu gewinnenden Materialien wie Blut oder Sputum, weit hinausgeht und die Besonderheit der spezifischen Zuordnung von Zytokinproduktion zu gewebspezifischen Zellpopulationen ermöglicht.

Schwächen der Analyse unserer Arbeit ergeben sich erneut aus der schwierigen Materialgewinnung und der dadurch begrenzten verfügbaren Zellzahl. Zusätzlich ergaben sich weitere Aspekte, die bei der Beurteilung der Analysen berücksichtigt werden müssen: In der Bioplex-Analyse wurde der Überstand aller isolierten Zellen und nicht ausschließlich der T-Lymphozyten gemessen (Kap.3.3.2). Somit ist in diesen Analysen eine Zuordnung der Produktion zu einzelnen Zellpopulationen nicht möglich. Dies ermöglichte zwar die ebenfalls durchgeführte durchflusszytometrische Analyse der Zytokinproduktion durch spezifische Zellpopulationen, allerdings beschränkt sich diese ausschließlich auf prozentuelle Anteile einer vorher definierten Subpopulation in bestimmten Gates, eine Aussage zu absoluten Werten ist nicht möglich.

Chan et al. führten 2013 eine vom Studiendesign ähnliche Untersuchung durch, in der sie 18 CF-Lymphknoten- und Lungengewebsproben, davon 10 mit nachgewiesener *Pseudomonas aeruginosa* Infektion, mit 10 Nicht-Bronchiektatischen Kontrollen bezüglich der Expression von IL-17A verglichen (Chan, et al., 2013). Die Proben wurden mit *Pseudomonas*, *Aspergillus* oder *Candida* Antigenen restimuliert und für 5-7 Tage kultiviert. Neben der Immunfluoreszenz in situ und einer Analyse der RNA wurden ebenfalls ein Multiplex von Zytokinen in den Zellüberständen und eine durchflusszytometrische Analyse mit den Markern CD3, CD4, CD45RA, IL-17A und IL-22 durchgeführt. Die Kontrollgruppe in dieser Arbeit ist mit 10 Patienten vergleichsweise klein und sehr heterogen. Vergleicht man beide Arbeiten, so zeichnet sich unsere Untersuchung insbesondere durch die größeren Kontrollgruppen, die Differenzierung in einzelne Entitäten innerhalb der Nicht-CF-Proben sowie die umfangreichere Analyse der verschiedenen Zellen im FACS aus, wodurch unsere Ergebnisse die vorherige Arbeit um wichtige Erkenntnisse ergänzen kann. Die antigenspezifische Stimulation in der Vergleichsstudie bietet jedoch den Vorteil, dass das Antigenmilieu der Lunge besser

nachempfunden wurde und durch histologische Immunfluoreszenzanalysen auch Aussagen zur Lokalisation von IL-17<sup>+</sup> Zellen getroffen wurde.

In weitergehenden Untersuchungen im Anschluss an diese Arbeit sollten aufgrund der obigen Limitationen insbesondere das Antigenmilieu der Lunge lebens echter simuliert werden, um dadurch spezifischere Aussagen über die Zytokinproduktion in vivo treffen zu können. Hierfür wäre die antigenspezifische Stimulation der Zellen mit *Pseudomonas aeruginosa* oder *Aspergillus fumigatus* möglich, wie sie durch unsere Arbeitsgruppe bereits begonnen wurde. Außerdem bedarf es insbesondere hinsichtlich des Lungengewebes deutlich größerer Stichprobenmengen und weiterer Vergleichsentitäten, um einen höheren Grad an reproduzierbaren und validen Ergebnissen zu erzielen.

### 5.3 Diskussion der Ergebnisse

Wir konnten durch unsere Untersuchungen eine Vielzahl an Vergleichen und Aussagen zur Verteilung der Zytokin-produzierenden Zellpopulationen, der verschiedenen Gedächtniszellen und dem T<sub>H</sub>17 assoziierten Zytokinmilieu in CF, Emphysem, Fibrose und Spendern ziehen. Unsere Analysen beschränken sich dabei auf rein quantitative Aussagen, die funktionellen Zusammenhänge und Reaktionen in vivo konnten bedingt durch unser Studiendesign nicht hinreichend ermittelt werden. Außerdem beschränkt sich unsere Analyse auf eine unspezifische Stimulation der Zellen zur Produktion von Zytokinen und weicht damit vom antigenspezifischen Milieu der Lunge ab, weshalb eine Extrapolation auf die in vivo Situation nur bedingt möglich ist.

Die folgenden Fragestellungen dienten unserer Zielsetzung und sollen näher diskutiert werden:

1. Welche Zytokine sezernieren die Lymphozyten von verschiedenen Krankheitsentitäten und wo ist diese Sekretion lokalisiert?
2. Welche Zellen sezernieren Interleukin 17A, 17F und 22?
3. Zeigen sich Unterschiede in den Gedächtniszellen, die IL-17A und IL-22 sezernieren?
4. Wie unterscheiden sich Effektormechanismen der Immunabwehr, insbesondere die Sekretion weiterer Zytokine des T<sub>H</sub>17 Signalweges, und die Produktion von MMPs und TIMPs zwischen CF und den anderen Entitäten?

In Anlehnung an diese vier Fragestellungen wird zunächst die quantitative Sekretion von IL-17A, IL-17F und IL-22 mittels Bioplex diskutiert, gefolgt von der durchflusszytometrisch gemessenen Verteilung und Beteiligung der einzelnen T-Zell-Subpopulationen und der verschiedenen Gedächtniszellen an der Zytokinproduktion. Anschließend werden die weiteren Effektormechanismen sowie die Beteiligung von MMPs und TIMPs diskutiert.

### 5.3.1 CF-Patientenproben zeigen eine vermehrte Sekretion von IL-17A, IL-17F und IL-22 in lungendrainierenden Lymphknoten

In zahlreichen entzündlichen Lungenerkrankungen spielt IL-17A eine wichtige Rolle. Eine gesteigerte Sekretion dieses Interleukins durch lungendrainierende Lymphknoten in CF im Vergleich zu Nicht-CF Patienten nach Stimulation mit Concanavalin A konnten Aujla et al. bereits zeigen (Aujla, et al., 2008). Chan et al. wiesen in einer vergleichbaren Arbeit, die die IL-17A Produktion in humanen Lymphknoten und Lungengewebe bei CF und Nicht-CF Patienten nach Stimulation mit *Pseudomonas aeruginosa*, *Aspergillus* Spezies und *Candida* Spezies untersuchte, ebenfalls einen starken IL-17A Phänotyp in lungendrainierenden Lymphknoten nach (Chan, et al., 2013).

Die  $T_H17$  als IL-17A Produzenten wurden außerdem bereits mit pulmonaler Exazerbation und Neutrophilie in CF in Verbindung gebracht. Dubin et al. zeigten, dass CF Patienten mit aktiver *Pseudomonas aeruginosa* Infektion erhöhte Level von  $T_H17$  assoziierten Zytokinen im Sputum aufwiesen. (Dubin, et al., 2007)

Aufgrund dieser Daten führten wir eine quantitative Bestimmung der am  $T_H17$  Signalweg beteiligten und von Lymphknoten- und Lungengewebszellen sezernierten Zytokinen mittels Multiplexanalyse durch (Kap.3.3.2). Zunächst sollen die Interleukine IL-17A, IL-17F und IL-22 in den einzelnen Entitäten diskutiert werden.

In Lymphknoten zeigte sich entitätsunabhängig die Sekretion aller drei Interleukine (Tab.20, Kap.4.2), wobei die Konzentration von IL-17A in allen vier Gruppen am größten war, gefolgt von IL-22 und nur einem geringen Anteil an IL-17F (Abb.8A, Kap.4.2). Im Lungengewebe wurde eine deutlich geringere Konzentration aller drei Interleukine gemessen, hier dominierte die Sekretion von IL-17F vor IL-17A und IL-22 (Abb.8B, Kap.4.2).

Die deutlich erhöhte Konzentration von IL-17A und IL-22 in lungendrainierenden Lymphknoten im Vergleich zum Lungengewebe lässt einen größeren prozentualen Anteil verschiedener IL-17A produzierender Zellen, wie den  $T_H17$ ,  $\gamma\delta$  T-Zellen, iNKT und ILC3s, in den Lymphknoten vermuten. In einem murinen Model mit chronischer *Pseudomonas aeruginosa* Atemwegsinfektion zeigten Bayes et al. eine starke Migration und Expansion von ILC3s in lungendrainierende Lymphknoten, während im Lungengewebe nur wenige ILC3s nachgewiesen wurden. Im Lungengewebe der Mäuse wurde IL-17A vorwiegend durch  $CD4^+$   $T_H17$  und  $\gamma\delta$  T Zellen produziert. (Bayes, et al., 2016)

Der erhöhte Anteil an ILC3s könnte für die vermehrte IL-17A und IL-22 Sekretion der Lymphknoten verantwortlich sein. Die Analyse dieser Akteure ist in unserem Projekt ebenfalls erfolgt, übersteigt jedoch den Rahmen dieser Arbeit und wurde bereits in einer anderen Publikation veröffentlicht (Hagner, et al., 2020). In dieser Arbeit konnte auch im tierexperimentellen Ansatz mit *Scnn1b-Tg* und *Scnn1b-Tg* *IL-17A<sup>-/-</sup>* Mäusen eine wichtige Rolle von IL-17A in der CF Lungenerkrankung nachgewiesen werden. *Scnn1b-Tg* Mäuse bilden eine dem CF Phänotypen ähnliche Lungenerkrankung mit gesteigerter Neutrophilenrekrutierung, pulmonaler Inflammation und strukturellem Lungenschaden aus, welche bei *IL-17<sup>-/-</sup>* Mäusen in geringerer Ausprägung auftraten. (Hagner, et al., 2020)

IL-17F ist ein Interleukin der IL-17 Familie und spielt ebenfalls eine wichtige Rolle in der Entzündungsreaktion, bspw. durch die Induktion proinflammatorischer Zytokine und Chemokine. Die Expression, Funktion, Regulation und Signalübertragung überschneiden sich dabei in großen Teilen mit IL-17A. IL-17F mRNA konnte mit aktivierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen, T<sub>H</sub>17 und  $\gamma\delta$  T-Zellen sowie, im Gegensatz zu IL-17A, auch mit aktivierten Monozyten, Basophilen und Mastzellen assoziiert werden. (Chang, et al., 2009) Diese zusätzlichen Akteure, die vorwiegend im Lungengewebe zu finden sind, könnten erklären, weshalb die IL-17F Konzentration im Vergleich zu IL-17A im Lungengewebe erhöht ist. Die genaue Funktion von IL-17F als inflammatorisches Zytokin in CF bedarf weiterer Untersuchungen.

Der Vergleich innerhalb der Entitäten zeigte in CF Lymphknoten eine etwa auf das zweifach gesteigerte mittlere IL-17A, IL-17F und IL-22 Konzentration im Vergleich zu Spendern (Abb.8, Kap.4.2). Emphysem- und Spenderlymphknoten wiesen hingegen sehr ähnliche mittlere Konzentration wie Spenderlymphknoten auf. Dies lässt vermuten, dass in CF eine vorwiegend T<sub>H</sub>17 vermittelte chronische Entzündungsreaktion der Lunge besteht. In Emphysem- und Fibrosepatienten scheint dieser Akteur eine untergeordnete Rolle zu spielen. Frühere Studien konnten diesen starken T<sub>H</sub>17 Phänotypen in CF Patienten besonders während pulmonaler Exazerbation ebenfalls belegen. So beobachteten Dubin et al. 2007 erhöhte IL-17A und IL-17F Konzentrationen in Bronchoalveolärer Lavage von CF Patienten während einer Exazerbation. Insbesondere die chronische Besiedlung mit *Pseudomonas aeruginosa* wurde als Ursache der IL-17 Erhöhung angesehen, da die Konzentration dieser Zytokine in der BAL nach 20 Tagen antibiotischer Therapie auf das Niveau von Nicht-CF Patienten absank. (Dubin, et al., 2007)

In CF resultiert die Unfähigkeit zur Beseitigung einer *Pseudomonas aeruginosa* Infektion, die durch Abnormitäten im ASL und der Zilienfunktion bedingt ist, in einer persistierenden Aktivierung von Entzündungssignalwegen, die eine chronische IL-17A Produktion und damit die Entwicklung des T<sub>H</sub>17 Phänotyps bewirken. Trotz chronischer Neutrophilenaktivierung wird keine effektive Elimination der Erreger erreicht, wodurch weiteres Neutrophilenrekrutment sowie eine chronische Entzündungsreaktion gefördert werden. (Dubin, et al., 2011) Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe konnten die wichtige Rolle von IL-17A für die Neutrophilie in den Atemwegen in einem Mausmodell der CF-Lungenerkrankung kürzlich belegen (Hagner, et al., 2020).

In unserer Analyse konnten wir in zwei CF-Lymphknotenproben deutlich erhöhte IL-17A Konzentrationen nachweisen (Abb.9B), was die Vermutung nahelegt, dass in diesen Proben bestimmte Voraussetzungen, wie bspw. eine floride Infektion mit *Pseudomonas aeruginosa* oder anderen extrazellulären Bakterien, zur deutlich vermehrten Produktion von IL-17A geführt haben könnte. Dies würde die Hypothese von Dubin et al., die die chronische *Pseudomonas aeruginosa* Infektion als Ursache einer erhöhten IL-17A Antwort in CF sieht, bestärken. Ein *Pseudomonas* Nachweis erfolgte zum Zeitpunkt der Transplantation bei fast allen CF-Patienten, jedoch können wir aufgrund der Limitierung des Zugriffs auf klinische Patientendaten keine Aussagen über eine Chronizität der *Pseudomonas* Besiedlung treffen. Der reine Nachweis von *Pseudomonas aeruginosa* erklärt daher nicht die in diesen zwei Proben deutlich erhöhte IL-17A Konzentration. Insgesamt erreicht die IL-17A Sekretion im Vergleich CF zu Spendern (Abb.9A) kein Signifikanzniveau. Untersuchungen in einem Mausmodell der CF-Lungenerkrankung deuten jedoch an, dass die Aktivierung des IL-17 Signalweges bei CF unabhängig von chronischer bakterieller Besiedlung erfolgt, denn die in dieser Arbeit untersuchten Mäuse waren jung und nicht chronisch besiedelt (Hagner, et al., 2020). Betrachtet man die Verteilung in den einzelnen Entitäten, fällt auf, dass einige CF-Lymphknotenproben eine vergleichbare Sekretion von IL-17A und IL-22 haben wie die anderen Entitäten. Dies lässt eine Unterteilung in „Low“ und „High Producer“ zu. Neben einer möglichen *Pseudomonas aeruginosa* Besiedlung und akuter pulmonaler Exazerbation sind die genauen Pathomechanismen, die zu dieser Unterteilung führen, jedoch bislang unklar und bedürfen weiterer Untersuchungen.

Bei CF-Patienten wird, am ehesten durch die chronisch bakterielle Besiedlung, die diese Patienten ausnahmslos aufweisen, durch die Aktivierung des T<sub>H</sub>17 Signalweg in Lymphknoten ebenfalls der an diesen gekoppelte IL-22 Signalweg aktiviert. IL-22

fördert die epitheliale Proliferation und Reparatur des Gewebes nach Verletzungen und verhindert dadurch eine bakterielle Besiedlung. Die Steigerung des IL-22 Signalwegs können wir anhand der erhöhten mittleren IL-22 Konzentration in CF Lymphknoten nachvollziehen (Abb.8A). Aujla et al. konnten zeigen, dass humane bronchiale Epithelzellen durch die Expression des IL-22 Rezeptors und durch die Sekretion von IL-22 Gene der körpereigenen Wirtsabwehr induzieren und somit wichtige Effektormoleküle in der Abwehr von gramnegativen Bakterien in der Lunge darstellen. Sowohl IL-17A wie auch IL-22 regulieren die Produktion von G-CSF und CXC Chemokinen in der Lunge, wohingegen nur IL-22 die Proliferation des Lungenepithels steigert und dadurch eine Steigerung der transepithelialen Resistenz gegenüber Verletzungen bewirkt. (Aujla, et al., 2008)

Inwiefern dieses Reaktionsmuster in CF mit einer erhöhten Reparaturkapazität assoziiert ist, muss jedoch durch funktionelle Untersuchungen adressiert werden.

In den Lungengewebszellen hingegen zeigten sich in unseren Untersuchungen keine signifikanten Unterschiede der sezernierten Interleukine IL-17A, IL-17F und IL-22 zwischen den Entitäten (Abb.10, Kap.4.2). Die Lungengewebslymphozyten wiesen im Gegenteil in allen drei untersuchten Entitäten ein ähnliches Verteilungsmuster ohne auffällige Unterschiede in der Sekretion von IL-17A, IL-17F und IL-22 auf. Aufgrund der Limitierungen der Probengewinnung fehlt hier der Vergleich zu lungengesunden Spendern. Möglicherweise sind diese Interleukine im Vergleich zu Lungengesunden in allen drei Entitäten erhöht. Deutliche Unterschiede zwischen den drei endgradigen Lungenerkrankungen sehen wir, im Gegensatz zu der Analyse der Lymphknotenzellen, im Lungengewebe jedoch nicht. Somit ist die Hypothese, dass die Sekretion in allen drei Entitäten erhöht ist, eher unwahrscheinlich. Es lassen sich nur bedingt Aussagen über die absolute Bedeutung dieser drei Interleukine im Vergleich zwischen Lungenerkrankten und Gesunden im Gewebe treffen. Wir hätten hier ebenfalls eine vermehrte Produktion insbesondere von IL-17A in CF als Zeichen einer aktiven  $T_H17$ -Reaktion erwartet, da bspw. in BAL-Untersuchungen von CF Patienten diese Erhöhung von IL-17A beobachtet wurde (Dubin, et al., 2007). Unsere Analyse bestätigt jedoch die Ergebnisse von Chan et al., die eine vermehrte IL-17A Sekretion ebenfalls nur in lungendrainierenden Lymphknoten in CF, nicht aber im Lungengewebe selbst beobachteten (Chan, et al., 2013). Die Autoren vermuteten hier einen direkten Zusammenhang zur bakteriellen Kolonisation des Lungengewebes, einer damit verbundenen Aktivierung von  $T_H1$  und  $T_H2$  und dadurch bedingt eine Herabregulation des  $T_H17$  Signalwegs im Lungengewebe.

Die Diskrepanz zwischen einer in lungendrainierenden Lymphknoten gesteigerten T<sub>H</sub>17 Antwort und der gleichzeitigen Herabregulation des T<sub>H</sub>17 Signalwegs im Lungengewebe, wie diese Hypothese vermuten ließe, lässt sich bisher jedoch nicht erklären. Hier bedarf es weitere Untersuchungen, die die Pathomechanismen der IL-17A Aktivierung in den unterschiedlichen Geweben näher untersuchen.

Mögliche Gründe für die insgesamt verminderte Sekretion von IL-17A, IL-17F und IL-22 im Lungengewebe im Gegensatz zu den Lymphknoten könnten in der untersuchten Zellpopulation liegen. Die Kultivierung der Zellen für die Analyse im Multiplex erfolgte populationsunabhängig, somit könnte einer der Gründe in der größeren Zellheterogenität mit geringerem T-Zellanteil oder anderen IL-17A produzierenden Lymphozytenpopulationen liegen. Aus diesem Grund bedarf es der Analyse Interleukin positiver Lymphozyten in klar definierten Zellpopulation, die wir in der durchflusszytometrischen Messung durchgeführt haben.

### **5.3.1.2 Die Sekretion von T<sub>H</sub>17 Zytokinen in Fibroselymphknoten ist vermindert**

Neben der auffällig gesteigerten IL-17A und IL-22 Sekretion in CF-Lymphknoten fiel insbesondere die im Vergleich zu den Spendern deutlich verminderte Produktion dieser Zytokine bei Fibrosepatienten auf (Abb.8A). Während die Emphysepatienten insgesamt mit der Spenderkohorte vergleichbare mittlere Konzentrationen der Interleukine zeigten, war diese in Fibrose um mehr als die Hälfte der jeweiligen Konzentrationen in Spendern reduziert (Abb.8A). Diese Unterschiede zeigten sich nur in Lymphknotenzellen, im Lungengewebe sahen wir ein überwiegend homogenes Bild in allen vier Entitäten (Abb.8B).

Diese Beobachtung widerspricht bisherigen Studien über die Bedeutung von IL-17A in Fibrose. Todd et al. nutzten Bleomycin im Mausmodell, welches durch eine pulmonale Inflammationsreaktion zur Lungenfibrose führt, und untersuchten die Bedeutung von IL-17A in diesem Modell. Eine Steigerung dieses pro-inflammatorischen Zytokins konnte gezeigt werden. Außerdem führte die exogene Gabe von IL-17A in vivo zur Induzierung einer Lungenfibrose. In Patienten mit *idiopathischer pulmonaler Fibrose* (IPF) zeigt sich ebenfalls eine Hochregulierung von IL-17A. (Todd, et al., 2012)

Eine mögliche Erklärung für die von uns beobachtete verminderte Sekretion von IL-17A in Lymphknoten bei Fibrose könnte in der simultanen Aktivierung des T<sub>H</sub>2 Signalwegs liegen. Interleukin-4, welches als T<sub>H</sub>2 Zytokin die Proliferation von Fibroblasten und die Produktion von Extrazellulärer Matrix in vitro stimuliert, wurde in Bleomycin Modellen ebenfalls vermehrt nachgewiesen. Dieses Zytokin induziert bei

Überexpression in vivo ebenfalls eine Fibrosebildung. Der fibrotische Umbau wird insbesondere durch  $T_H1$  und  $T_H2$  Zytokine vermittelt. (Todd, et al., 2012)

Diese Aktivierung von  $T_H2$  kann die  $T_H17$  Antwort unterdrücken (Song, et al., 2016) und eine mögliche Erklärung für die verminderte IL-17A Sekretion in Fibroselymphknoten in unserer Analyse bieten. Dies betrifft ebenfalls die Sekretion des  $T_H17$  Zytokins IL-22. Da IL-22 wichtige Funktionen in der Reparatur des Gewebes nach Verletzung oder Infektion übernimmt, lässt die verminderte Sekretion möglicherweise auf reduzierte Reparaturmechanismen bei Fibrosepatienten rückschließen, was durch funktionelle Untersuchungen weitergehend untersucht werden müsste.

Die Emphysempatienten wiesen insgesamt mit der Spenderkohorte vergleichbare mittlere Konzentrationen der sezernierten Interleukine IL-17, IL-17F und IL-22 in den Lymphknoten auf (Abb.8A). Im Lungengewebe unterschieden sie sich nur wenig von den anderen beiden Lungenerkrankungen, auffällig war hier die gesteigerte mittlere IL-22 Konzentration (80pg/ml), die um etwa das Zweifache zu CF (43pg/ml) und Fibrose (42pg/ml) gesteigert war (Abb.8B). Dies lässt die Hypothese zu, dass eine  $T_H17$  vermittelte Entzündung in Emphysem nur eine untergeordnete Rolle spielt.

Jedoch zeigen aktuelle Studien, dass IL-17A im Sputum von COPD Patienten nachweisbar ist und die Höhe mit dem Grad der Atemwegobstruktion korreliert. Die Kombination von IL-17A und IL-22 kann zur Induktion von MMPs führen, welche eine Rolle in der Pathophysiologie des Emphysems spielen. Chen et al. zeigten, dass Zigarettenrauch die  $T_H17$  Antwort stimuliert und IL-17RA<sup>-/-</sup> Mäuse auch nach sechsmonatiger Exposition von Zigarettenrauch kein Emphysem entwickelten. Dies ist in der fehlenden Induktion von CCL2 und MMP-12 begründet. Durch RNA Sequenzierung von bronchialem Epithel konnten die Forscher außerdem zeigen, dass IL-17A und IL-22 MMP-3 und -12 induzieren können. (Chen, et al., 2011)

In unseren Analysen können wir die Rolle dieser  $T_H17$  Antwort in fortgeschrittenen Emphysempatienten nicht nachvollziehen, jedoch muss bedacht werden, dass insbesondere im Lungengewebe, im dem wir Veränderungen dieser Sekretion erwarten würden, kein Vergleich zu Lungengesunden möglich war. Die gesteigerte IL-22 Produktion gegenüber CF und Fibrose lässt auf gesteigerte Reparaturmechanismen des Gewebes rückschließen, die jedoch aufgrund des Erkrankungsbildes nicht wirksam sein dürften. Dies wäre ein Ansatzpunkt für weitere Untersuchungen zur Funktion von IL-22 im Emphysem in vivo.

### **5.3.2 Die Produktion von IL-17A und IL-22 durch CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> und CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Vergleich**

Um die Frage, welche Zellen der angeborenen Immunabwehr IL-17A und IL-22 produzieren, zu beantworten und Vergleiche zwischen den Entitäten ziehen zu können, erfolgte die durchflusszytometrische Analyse der klassischen CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> und CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen hinsichtlich der Expression von IL-17A, IL-22 und einer Koproduktion beider Interleukine.

#### **5.3.2.1 Lungengesunde und einzelne CF-Proben weisen die höchsten Anteile IL-17A positiver Lymphozyten in den Lymphknotenproben auf**

Innerhalb der CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> und der CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen untersuchten wir den Anteil von IL-17A<sup>+</sup> Zellen. Auch in dieser Analyse verglichen wir endständige Lungenerkrankungen (Endstage) mit Spendern. Hierzu ist anzumerken, dass die Proben von Patienten mit Endstage Lungenerkrankungen insgesamt, wenn auch nicht signifikant, weniger IL-17A<sup>+</sup> Zellen innerhalb der CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> Lymphozyten in Lymphknoten aufwiesen als lungengesunde Spender (Abb.11A). Im Vergleich der einzelnen Entitäten zeigten alle drei Endstage-Entitäten ebenfalls insgesamt weniger IL-17A<sup>+</sup> Zellen, wobei in CF eine breite Streuung mit einzelnen hochproduzierenden Proben auffiel (Abb.12A). Die Probe mit dem höchsten Anteil an IL-17A<sup>+</sup> Zellen innerhalb der CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> Subpopulation zeigte sich in CF Lymphknoten, wobei hier auch Proben mit deutlich geringerer IL-17A Produktion innerhalb der CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> Subpopulation zu finden waren verglichen mit den Spendern (Abb.12A).

Vergleichbare Ergebnisse fanden sich in der Subpopulation der CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> Lymphknotenzellen, wobei hier in Endstage sogar ein signifikant verminderter Anteil an IL-17A<sup>+</sup> T-Zellen im Vergleich zu Spendern zu finden war (Abb.13A). Innerhalb der CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen zeigte sich mit Ausnahme von einem Ausreißer nach oben in CF ansonsten ein homogenes Verteilungsmuster innerhalb der drei Endstage-Entitäten (Abb.14A).

Diese Ergebnisse lassen die Schlussfolgerung zu, dass in Emphysem und Fibrose die Produktion von IL-17A in Lymphknoten eher herunterreguliert ist, wohingegen CF eine heterogene Verteilung mit teils hochregulierter IL-17A Produktion und teils verminderter Produktion aufweist. Dies lässt eine Unterteilung in CF in „High Producer“ und durch „Low Producer“ zu, wie sie auch in IL-17A/IL-22 koproduzierenden Lymphknotenzellen zu finden ist und in Kapitel 5.4.2.3 diskutiert wird.

Im Gewebe erfolgte nur der Vergleich zwischen CF und Emphysem. In CF wiesen drei von vier Proben eine deutlich erhöhte IL-17A Produktion innerhalb der CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> Zellen auf, nur eine Probe zeigte einen niedrigen Anteil (Abb.12D). Es ließ sich ein Trend zur vermehrten IL-17A Produktion in CF erkennen, der aufgrund geringer Stichprobengröße bisher keine Signifikanz erreichte. Innerhalb der CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> Zellen zeigte sich die IL-17A Produktion in CF im Vergleich zu Emphysem deutlich vermindert (Abb.14D), wobei in vier von fünf Proben der Emphysempatienten ein erhöhter Anteil IL-17A positiver Zellen innerhalb der Subpopulation der CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen nachweisbar war. Für aussagekräftigere anschließende Untersuchungen ist eine größere Stichprobenmenge notwendig, außerdem wäre ein Vergleich zu den Spendern, die in den Lymphknoten mehr IL-17A<sup>+</sup> in CF als in Emphysem aufwiesen, sehr aufschlussreich. Insgesamt lässt sich aber trotz geringer Stichprobengröße in CF ein Trend zu vermehrter IL-17A Produktion innerhalb der CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellsubpopulation im Gewebe nachvollziehen, wohingegen die CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> Zellen im CF-Gewebe weniger an der IL-17A Produktion beteiligt scheinen als in Emphysemgewebe. Ursächlich kommt die bei CF stärkere Kolonisation mit extrazellulären Bakterien in Frage, die anstelle der zytotoxischen CD8<sup>+</sup> Aktivität vor allem eine CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Helferzell-Aktivität erfordert.

Bei Patienten mit schwerem Lungenemphysem zeigt sich eine Kolonisation der Lunge mit vorwiegend gramnegativen Bakterien, *Haemophilus influenzae*, *Streptokokkus pneumoniae* und *Staphylokokkus aureus*. In dieser Patientengruppe lässt sich nur sehr selten eine Besiedlung mit *Pseudomonas aeruginosa* beobachten. Eine Assoziation der bakteriellen Besiedlung zu einer schlechteren Lungenfunktion konnte bisher nicht nachgewiesen werden. (Trudzinski, et al., 2018)

Anders verhält es sich bei CF-Patienten: Die Kolonisation erfolgt altersabhängig zunächst mit *Staph. aureus* und *Haemophilus Influenza*, später vor allem mit *Pseudomonas aeruginosa*, *Staph. aureus* und MRSA. Zusätzlich spielen *Aspergillus species* eine wichtige Rolle, sowie mit zunehmendem Alter auch *Achromobacter xylosoxidans*, *Stenotrophomas maltophilia* and *Burkholderia cepacia complex*. Eine Besiedlung durch diese Pathogene ist i.d.R. mit einer deutlichen Verschlechterung der Lungenfunktion in Form einer Exazerbation oder einer chronischen Infektion assoziiert. (Ratjen, et al., 2015)

Insbesondere die Verschlechterung der Lungenfunktion bei CF durch eine Kolonisation mit oben aufgeführten Erregern lässt auf eine starke Entzündungsreaktion schließen. Diese Reaktion steht in Zusammenhang zur T<sub>H</sub>17 Aktivierung (Dubin, et al., 2007) Vermutlich werden die „High Producer“ eine floride Infektion mit einem T<sub>H</sub>17

assoziierten Pathogen aufweisen und daher im Vergleich zu Emphysepatienten eine vermehrte IL-17A Produktion durch die CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen zeigen. Neben den in dieser Arbeit identifizierten CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen sind jedoch auch weitere Zellen an der IL-17A Produktion beteiligt, die in dieser Arbeit nicht weiter aufgeführt werden (Hagner, et al., 2020), (Bayes, et al., 2016). Funktionell ist dabei zu erwähnen, dass die IL-17A Produktion durch Zellen der adaptiven Immunität in einem Mausmodell der CF-Lungenerkrankung eine zentrale Rolle für die Zerstörung des Gewebes spielt (Hagner, et al., 2020), so dass dieser Signalweg möglicherweise bei Patienten, die eine deutlich erhöhte Produktion aufweisen, einen therapeutischen Angriffspunkt darstellen könnte.

### **5.3.2.2 Alle Entitäten haben vergleichbare Anteile an IL-22<sup>+</sup> T-Lymphozyten**

Die IL-22 Produktion innerhalb der CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> (Abb.11B) und CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> (Abb.13B) Lymphozytensubpopulationen aus den lungendrainierenden Lymphknoten wies keine wesentlichen Unterschiede zwischen Endstage und Spendern auf. Innerhalb der CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> (Abb.12B) und CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> (Abb.14B) Subpopulationen zeigten alle vier Entitäten eine ähnliche IL-22 Produktion abgesehen von zwei Ausreißern i.S. von zwei „High Producer“ in CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen in CF und einem „High Producer“ in Emphysem (Abb.12B). CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> (Abb.12E) und CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> (Abb.14E) Gewebslymphozyten zeigten ebenfalls vergleichbare Anteile von IL-22 produzierenden Zellen in CF und Emphysem, wobei ebenfalls jeweils eine Probe als „High Producer“ in CF bezeichnet werden kann. Auch in dieser Analyse war die Stichprobe des Gewebes zu gering für ausdrucksstarke Signifikanzen oder Trends und es fehlte aufgrund der mangelnden Verfügbarkeit der Vergleich zu lungengesunden Spendern.

### **5.3.2.3 „High Producer“ in CF weisen deutlich vermehrt IL-17A/IL-22 koproduzierende CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> und CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten in Lymphknoten auf**

Die Subpopulation der IL-17A/IL-22 koproduzierenden Zellen innerhalb der CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> (Abb.11C) und CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> (Abb.13C) T-Zellen in Lymphknoten zeigte bei den Endstageproben eine hohe Streuung im Vergleich zu den Spenderproben und keine signifikanten Unterschiede auf, ebenso wie der Untervergleich nach Aufteilung nach Entitäten keine Signifikanz ergab. Es ließen sich allerdings erneut zwei Lymphknotenproben (Abb.12C) und eine Gewebeprobe (Abb.12F) von CF-Patienten identifizieren, die deutlich erhöhte Anteile an IL-17A/IL-22<sup>+</sup> Zellen innerhalb der CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> Subpopulation aufwies. Innerhalb der CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen zeigten sogar sechs CF-Proben deutlich erhöhte Anteile an IL-17A/IL-22 koproduzierenden Zellen in

Lymphknoten (Abb.14C). Im Gewebe konnten wir innerhalb CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> Lymphknotenzellen keine relevanten Unterschiede der Anteile an IL-17A/IL-22 koproduzierender Zellen zwischen CF und Emphysem sehen, insbesondere keine „High Producer“ in CF (Abb.14F).

Zur weiteren Untersuchung der doppeltpositiven Zellen erfolgte ein Gesamtvergleich von Proben von CF-Patienten zu Nicht-CF-Kontrollen (Kap.4.3.3). Hier zeigte sich sowohl innerhalb der CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> (Abb.15A) als auch CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> (Abb.15B) Subpopulation ein signifikant erhöhter Anteil doppeltpositiver Zellen. Die einzelne Betrachtung der Proben ließ eine Unterteilung in „High Producer“ und „Low Producer“ zu, wobei hochsignifikante Unterschiede der „High Producer“ gegenüber „Low Producer“ und Nicht-CF-Kontrollen bestand (Abb.16). Innerhalb der CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T Zellen waren fünf von insgesamt zehn Lymphknoten-Proben (Abb.16A), innerhalb der CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T Zellen sechs von elf Proben „High Producer“ (Abb.16B), d.h. in beiden Gruppen bildete die Gruppe der „High Producer“ etwa die Hälfte der Proben. Im Gewebe zeigte sich eine solche Unterteilung in „High“ und „Low Producer“ zwischen den beiden verfügbaren Gruppen CF und Emphysem jedoch nicht (Abb.12F, Abb.14F).

Eine mögliche Ursache könnte in der unterschiedlichen Kolonisation der Lungen liegen, wodurch in Anwesenheit einer Besiedelung mit extrazellulären Pathogenen, wie *Pseudomonas aeruginosa*, die IL-17A Produktion hochreguliert wird, während andere lokale Faktoren die IL-17A Reaktion durch CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen eher hemmen könnten. Chan et al. untersuchten zuvor die IL-17A Produktion in humanen Lymphknoten und Lungengewebe bei CF und Nicht-CF Patienten nach Stimulation mit *Pseudomonas aeruginosa*, *Aspergillus* Spezies und *Candida* Spezies und konnte ebenfalls vermehrt IL-17A/IL-22 koproduzierende T-Zellen in CF nachweisen (Chan, et al., 2013). Dieses Erkenntnis können wir durch die Unterteilung in „High“ und „Low Producer“ und eine Differenzierung zwischen CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> ergänzen. Mögliche Ursachen liegen in der unterschiedlichen bakteriellen Kolonisation, wie oben bereits beschrieben, und möglicherweise einem individuellen IL-17A Phänotyp, wobei es denkbar erscheint, dass die von Kushwah et al. beschriebene Prädisposition von T<sub>naive</sub> zur Differenzierung in T<sub>H</sub>17 Zellen in CF von weiteren individuellen Faktoren abhängt (Kushwah, et al., 2013). Hier bedarf es weitere Untersuchungen, die die Funktion der IL-17A Reaktion in CF in vivo weiter aufklären und diese möglichen Faktoren genauer klassifizieren. Außerdem wäre eine gezielte Korrelation zwischen klinischen Daten und Ergebnissen der durchflusszytometrischen Analyse wünschenswert, die aus Datenschutzgründen jedoch in dieser Arbeit nicht umfassend möglich war. Das Verständnis dieser unterschiedlichen

T<sub>H</sub>17 Aktivität wird langfristig dabei helfen können, die Entzündungsprozesse der Lunge bei CF zu verstehen.

### 5.3.3 IL-17A und/oder IL-22 sezernierende Gedächtniszellpopulationen im Vergleich

T-Lymphozyten können durch Aktivierung des adaptiven Immunsystems eine langanhaltende Immunität gegen spezifische Erreger in Form von Gedächtniszellen ausbilden, die bei erneutem Antigenkontakt schnell und spezifisch agieren und eine erneute Infektion mit einem vorbekannten Erreger verhindern können. Nach Aktivierung der T<sub>naive</sub> in den lymphatischen Organen erfolgt die Ausbildung von T-Effektorzellen und Gedächtnis-T-Zellen, die CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> oder CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> sein können und in weitere Subtypen unterteilt werden. (Murphy, et al., 2018)

Diese Subtypen der Gedächtnis-T-Zellen, die durch die fehlende Expression des Oberflächenmarkers *CD45-Rezeptor- $\alpha$*  (CD45RA) von T<sub>naive</sub> abgegrenzt werden, können anhand der Expression des für Lymphknoten spezifischen *CC-Chemokine-Rezeptors 7* (CCR7) in weitere Subtypen differenziert werden. T<sub>naive</sub> (CD45RA<sup>+</sup> CCR7<sup>+</sup>) exprimieren den CCR7 einheitlich als Zeichen für ihre Lokalisation in lymphoiden Geweben. Gedächtnis-T-Zellen können anhand dieses Markers in CD45RA<sup>-</sup> CCR7<sup>+</sup> *zentrale Gedächtnis-T-Zellen* (T<sub>CM</sub>), die vorwiegend in Lymphknoten wirken, und CD45RA<sup>-</sup> CCR7<sup>-</sup> *Effektor-Gedächtnis-T-Zellen* (T<sub>EM</sub>), die in multiple periphere Gewebe migrieren, unterteilt werden. (Farber, et al., 2014)

Zum detaillierten Verständnis der chronischen Entzündungsreaktion in CF erschien eine Analyse dieser langanhaltenden Immunität und ihres Zusammenhangs zur T<sub>H</sub>17-vermittelten Immunantwort naheliegend. Im peripheren Blut von gesunden Individuen produzieren die meisten Gedächtnis-T-Zellen *Interferon  $\gamma$*  (IFN $\gamma$ ), IL-2 und *Tumornekrosefaktor- $\alpha$*  (TNF $\alpha$ ) nach Stimulation, wohingegen nur ein geringer Anteil der CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> Gedächtnis-T-Zellen IL-4, IL-10 oder IL-17A produziert (Farber, et al., 2014). Diese IL-17A und IL-22 produzierenden Gedächtnis-T-Zellen sind für unsere Analyse besonders interessant, da bei CF eine vermehrte Bildung von T<sub>H</sub>17 aus T<sub>naive</sub> beobachtet werden konnte. Kushwah et al. wiesen dabei in ihren Versuchen eine angeborene Prädisposition von T<sub>naive</sub> in CF Patienten und CFTR<sup>-/-</sup> Mäusen zur Differenzierung zu T<sub>H</sub>17 Zellen nach (Kushwah, et al., 2013). Da die Ausbildung eines zellulären Immungedächtnisses den individuellen Krankheitsverlauf langfristig stark beeinflussen kann, untersuchten wir diese IL-17A, IL-22 und koproduzierende CD4<sup>+</sup> Zellen bzgl. ihrer Zugehörigkeit zu den verschiedenen Gedächtniszelltypen.

Durch die FACS Analyse konnte die Differenzierung der Subtypen anhand der oben beschriebenen Oberflächenantigene erfolgen. Hierfür wurde zunächst ein Gating auf CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten vorgenommen und diese anschließend in die jeweils zytokinpositiven Populationen unterteilt. Innerhalb dieser IL-17A<sup>+</sup>, IL-22<sup>+</sup> oder IL-17<sup>+</sup>/IL-22<sup>+</sup> Zellpopulationen verglichen wir die Anteile an T<sub>naive</sub>, T<sub>CM</sub> und T<sub>EM</sub> zwischen den Entitäten (Kap.4.4), zunächst in Lymphknoten und anschließend im Lungengewebe.

In Lungenlymphknoten (Kap.4.4.1) sahen wir innerhalb der IL-17A<sup>+</sup> (Abb.17) und IL-17A/IL-22<sup>+</sup> (Abb.18) Subpopulationen der CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T Zellen eine ähnliche Verteilung der Gedächtniszellen zwischen den einzelnen Krankheitsentitäten und den Spendern. Auffällig war hier in der IL-17<sup>+</sup> Population ein erhöhter Anteil an T<sub>naive</sub> in Fibrose (Abb.17A) und ein erhöhter Anteil an T<sub>EM</sub> in Emphysem (Abb.17C), die jedoch kein Signifikanzniveau erreichten.

In der IL-22<sup>+</sup> Subpopulation sahen wir zwischen CF und Spendern signifikante Unterschiede der Gedächtniszellverteilung (Abb.19). Hier ließen sich weniger T<sub>naive</sub> (Abb.19A) und mehr T<sub>CM</sub> (Abb.19C) innerhalb der IL-22 produzierenden Zellen in CF finden. Möglicherweise entsteht diese Verteilungsdifferenz durch die höhere Menge der Antigenkontakte, da CF-Patienten durch die gestörten angeborenen Abwehrmechanismen im Endstadium ihrer Lungenerkrankung nahezu ausnahmslos chronisch mit Bakterien besiedelt sind und dadurch mehr Antigenkontakt haben. Somit kommt es folglich zur vermehrten Ausbildung von T<sub>CM</sub>, was eine relative Reduktion der T<sub>naive</sub> bedingt. Da sich dieses Phänomen jedoch nur in der IL-22 positiven Population zeigt, scheinen hier wesentliche Unterschiede zu T<sub>naive</sub> und T<sub>CM</sub> von IL-17A produzierenden T-Zellen zu liegen. In der aktuellen Literatur lassen sich aktuell keine vergleichbaren Daten finden, sodass sich die Diskussion der Rolle der unterschiedlichen Gedächtnis-T-Zellen in Zusammenhang mit IL-17A und IL-22 schwierig gestaltet. Die Unterschiede zwischen IL-17A und IL-22 produzierenden Lymphozytenpopulationen und der Verteilung der Gedächtniszellen, insbesondere der Ausbildung von T<sub>CM</sub>, erfordert weitere Untersuchungen zur Funktion von IL-22 produzierenden T-Zellen und ihrer Rolle im Entzündungsgeschehen.

Im Gewebe erfolgte der Vergleich aufgrund der geringen Probenzahl von Lungengewebe bei Fibrose und mangelnder Gewebsproben von Spendern ausschließlich zwischen CF- und Emphysempatienten (Kap.4.4.2). Es ergaben sich innerhalb der IL-17A<sup>+</sup> und IL-22<sup>+</sup> Populationen nur marginale Unterschiede in der Verteilung der Gedächtniszellen zwischen den beiden Entitäten. Lediglich innerhalb der IL-17A/IL-22<sup>+</sup> Population, die in Lymphknoten keine Unterschiede zeigte, fanden sich in

den CF-Gewebeproben mehr  $T_{naive}$  und weniger  $T_{CM}$  als in den Emphysemgewebeproben. Hier könnte die Ursache in dem unterschiedlich hohen Alter bei Transplantation liegen, da  $T_{naive}$  im Alter abnehmen (Farber, et al., 2014) und die Emphysempatienten ein deutlich höheres Lebensalter bei Transplantation aufwiesen (Tab.17). Dies lässt sich möglicherweise durch rein physiologische Prozesse erklären. Zum Zeitpunkt der Geburt finden sich aufgrund des mangelnden Antigenkontakts ausschließlich  $T_{naive}$  im peripheren Blut. Durch Antigenkontakt in den ersten zwei Lebensdekaden wird das immunologische Gedächtnis ausgebildet, sodass zum Ende der zweiten Dekade Gedächtnis-T-Zellen bis zu 35% der T-Zellen im peripheren Blut ausmachen mit einer daraufhin folgenden langen Phase der Homöostase. (Farber, et al., 2014) Das mittlere Alter der Emphysempatienten bei Transplantation lag bei 57,3 Jahren, sodass im Vergleich zu den CF Patienten mit einem mittleren Transplantationsalter von 26,6 Jahren der Anteil der  $T_{naive}$  geringer und der bereits gebildeten  $T_{CM}$  erwartungsgemäß erhöht sein müsste.

Dies erklärt jedoch nicht, weshalb diese unterschiedliche Verteilung nur in den doppeltpositiven Populationen zu finden waren, während die  $IL-17A^+$  und  $IL-22^+$  Populationen sich nicht wesentlich unterschieden. Ein Trend zu höherer  $IL-17A/IL-22^+$  Koproduktion innerhalb der  $CD3^+ CD4^+$  Zellen in CF Lymphknoten, wie wir sie bereits in der Untersuchung der  $CD3^+ CD4^+$  und  $CD8^+$  T-Zellen in Form von „High Producer“ beobachteten (Kap.5.3.2.3), könnte hier eine Rolle spielen. Es scheint, dass diese Zellen insbesondere in Form von  $T_{naive}$  und vermutlich auch den hier nicht weiter untersuchten Effektor-T-Zellen vorkommen.

Im peripheren Blut von gesunden Individuen produzieren die meisten Gedächtnis-T-Zellen *Interferon  $\gamma$*  (IFN $\gamma$ ), IL-2 und *Tumornekrosefaktor-alpha* (TNF $\alpha$ ) nach Stimulation, wohingegen nur ein geringer Anteil der  $CD3^+ CD4^+$  Gedächtnis-T-Zellen IL-4, IL-10 oder IL-17A produziert. (Farber, et al., 2014)  $T_{naive}$  zeigen bei CF jedoch eine Prädisposition zur Differenzierung zu  $T_H17$  Zellen, wie Kushwah et al. 2013 sowohl in CF Patienten wie auch in  $CFTR^{-/-}$  Mäusen nachweisen konnten. Die Autoren identifizierten einen intrinsischen Defekt in CF T-Zellen, welche unabhängig des jeweils herrschenden Zytokinmilieus in CF-Lungengewebe die verstärkte  $T_H17$  Antwort bedingen könnten. Nach Antikörperstimulation der  $T_{naive}$ , welche die T-Zell-Rezeptor-Aktivierung triggerte, zeigten  $CFTR^{-/-}$  Mäuse einen Anteil von 25-30%  $T_{naive}$ , die eine Differenzierung in  $T_H17$  unterliefen, während in  $CFTR^{+/+}$  Mäusen nur ein Anteil von 16% diese Differenzierung durchliefen. (Kushwah, et al., 2013) Da unsere Arbeit ausschließlich quantitative Messungen und Beschreibungen umfasst, bedarf es zur

Funktionsanalyse dieser Zellen und ihrer Rolle in vivo weiteren Untersuchungen, insbesondere zur Zytokinproduktion der  $T_{naive}$  und  $T_{CM}$  in CF und anderen Lungenerkrankungen.

Insgesamt lassen unsere Ergebnisse die Schlussfolgerung zu, dass sich die drei endgradigen Lungenerkrankungen Emphysem, Fibrose und CF sowie die gesunden Kontrollen bezüglich der Ausbildung einer  $T_H17$  assoziierten Gedächtniszellimmunität nicht wesentlich unterscheiden. Inwiefern eine ggf. verminderte oder verstärkte zelluläre Immunität den Krankheitsverlauf beeinflussen kann, bedarf weiterer Untersuchungen.

### **5.3.3.1 Verteilung der IL-17A und/oder IL-22 sezernierenden Gedächtnis-T-Zellen nach Lokalisation im Lungengewebe und in Lymphknoten**

Die Lokalisationen Lymphknoten und Lungengewebe unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Bedeutung für das Immunsystem und der T-Zell-Reifung. Während die Lymphknoten als lymphatisches Organ primär Ort der T-Zellentwicklung und -reifung sind, ist das Lungengewebe ein Ort mit direktem Antigenkontakt und somit Ziel bei der Migration der reifen T-Zellen aus den lymphatischen Organen. Nach Aktivierung der  $T_{naive}$  in den lymphatischen Organen erfolgt die Ausbildung von T-Effektorzellen und Gedächtnis-T-Zellen, welche in verschiedene Zielgewebe, wie die Lunge, migrieren. (Farber, et al., 2014)  $T_H17$  Zellen dienen primär als Effektorzellen und sind somit v.a. in Geweben mit direktem Antigenkontakt wie der Lunge zu erwarten, gleichzeitig können wir sie jedoch auch in Lymphknoten nachweisen. Die Verteilung des zellulären Gedächtnisses in Form der verschiedenen Gedächtnis-T-Zellen innerhalb der Krankheitsentitäten erschien uns daher für das Verständnis der Gedächtniszellimmunität und einer möglichen Korrelation zum Krankheitsverlauf interessant.

Wir verglichen daher die Verteilung der einzelnen  $T_H17$  assoziierten Gedächtniszellen in den Interleukin-positiven Populationen von  $CD3^+ CD4^+$  T-Zellen zwischen Lungengewebe und Lymphknoten (Abb.23, Tab.21).

Im Lungengewebe dominieren in den beiden untersuchten Entitäten CF und Emphysem wie erwartet die  $T_{EM}$  als Zeichen der direkten Effektorfunktion des Zielgewebes (Tab.21). Die  $T_{naive}$  stellen den geringsten Anteil der T-Zellen im Lungengewebe dar. Auch dieses Ergebnis lässt sich mit der primären Lokalisation der  $T_{naive}$  in lymphatischen Organen als Ort der T-Zellreifung einfach erklären. Eine Auffälligkeit stellte sich in der Gedächtniszellverteilung in der doppelpositiven Population bei CF dar.  $T_{EM}$  bildeten hier ebenfalls den größten Anteil, dann folgten jedoch die  $T_{naive}$  und nur ein geringerer Teil an  $T_{CM}$ . Möglicherweise spiegelt dies die von

Kushwah et al. beschriebene Prädisposition von  $T_{naive}$  zur Differenzierung in  $T_H17$  Zellen wider (Kushwah, et al., 2013), die zu einem erhöhten Anteil an  $T_{naive}$  im peripheren Gewebe führen könnte. Da die Daten diesbezüglich aber keine weiteren Anhaltspunkte liefern, ist diese Theorie rein spekulativ.

**Table 21:** Verteilung der Gedächtnis-T-Zellen innerhalb der zytokinpositiven Lymphozytenpopulationen – Vergleich Lungengewebe und Lymphknoten, (+) geringer Anteil, ++ mittlerer Anteil, +++ höchster Anteil

Zytokinproduktion	Lungengewebe			Lymphknoten		
	$T_{naive}$	$T_{CM}$	$T_{EM}$	$T_{naive}$	$T_{CM}$	$T_{EM}$
<b>CF</b>						
IL-17 <sup>+</sup>	(+)	++	+++	(+)	+++	++
IL-17 <sup>+</sup> /IL-22 <sup>+</sup>	++	(+)	+++	(+)	+++	++
IL-22 <sup>+</sup>	(+)	++	+++	++	+++	(+)
<b>Emphysem</b>						
IL-17 <sup>+</sup>	(+)	++	+++	(+)	++	+++
IL-17 <sup>+</sup> /IL-22 <sup>+</sup>	(+)	++	+++	(+)	+++	++
IL-22 <sup>+</sup>	(+)	++	+++	+++	++	+
<b>Fibrose</b>						
IL-17 <sup>+</sup>				(+)	+++	++
IL-17 <sup>+</sup> /IL-22 <sup>+</sup>				(+)	+++	++
IL-22 <sup>+</sup>				+++	++	+
<b>Spender</b>						
IL-17 <sup>+</sup>				(+)	+++	++
IL-17 <sup>+</sup> /IL-22 <sup>+</sup>				(+)	++	+++
IL-22 <sup>+</sup>				+++	++	+

In den Lymphknoten ergab sich innerhalb der vier Populationen in allen Entitäten ein überwiegend ähnliches Verteilungsmuster mit  $T_{CM} > T_{EM} > T_{naive}$  (Tab.21). Auch diese Verteilung lässt sich durch die primäre Lokalisation der  $T_{CM}$  als zentrale Gedächtniszellen im lymphatischen Gewebe, also den Lymphknoten, erklären, wohingegen die  $T_{EM}$  ihre Effektorfunktion vorwiegend nach Migration ins Zielgewebe erfüllen. (Farber, et al., 2014) Auffällig ist die Verteilung in den IL-22<sup>+</sup> Zellen in Lymphknoten. Hier zeigten sich in Emphysem, Fibrose und Spender  $T_{naive} > T_{CM} > T_{EM}$  (Tab.21). Der erstaunlich hohe Anteil an IL-22<sup>+</sup>  $T_{naive}$  könnte durch eine fehlende Aktivierung dieser Zellen bedingt sein, da der Antigenkontakt mit  $T_H17$  assoziierten Pathogenen stets die Aktivierung von IL-17A bedingt. Die Funktion dieser Zellen, die IL-22, jedoch kein IL-17A produzieren, könnte in der antiinflammatorischen und protektiven Funktion des IL-22 liegen. Bisher sind solche Zellen jedoch nicht weiter beschrieben. Unseren Ergebnissen zufolge liegen diese Zellen

vorwiegend als  $T_{naive}$  vor. Bei CF sind innerhalb der IL-22<sup>+</sup> Population erstaunlicherweise nicht die  $T_{naive}$  die größte Gruppe, sondern die  $T_{CM}$ . Möglicherweise zeigt dies eine in CF vorhandene Funktion dieser IL-22<sup>+</sup> Zellen im Rahmen der Ausbildung des Zellgedächtnisses, welche weiter untersucht werden sollte.

Insgesamt hatten die Endstage-Entitäten sowie die Spender in der Verteilung der Gedächtniszellen innerhalb der Interleukin-positiven Populationen ähnliche Muster ohne wesentliche Unterschiede. Dies unterstreicht die pathophysiologischen Ähnlichkeiten der drei Entitäten CF, Emphysem und Fibrose und verwirft damit die Hypothese, eine unterschiedliche Ausprägung und Verteilung des zellulären Gedächtnisses könne eine Ursache für die variablen Verläufe der Endstage-Lungenerkrankungen darstellen.

### **5.3.4 Effektormechanismen der Immunabwehr zeigen eindeutige Unterschiede zwischen CF und anderen Entitäten**

Zur gezielten Abwehr von Krankheitserregern benötigen aktivierte Immunzellen erregerspezifische Effektormechanismen, also eine Kombination verschiedener zellulärer und humoraler Mechanismen, die zusammenwirken und so eine erfolgreiche Elimination der Erreger bewirken können (Murphy, et al., 2018). Zur Untersuchung dieser Effektormechanismen und dem Vergleich zwischen den Entitäten untersuchten wir die Sekretion verschiedener, am T<sub>H</sub>17 Signalweg beteiligter Zytokine. In der Bioplexanalyse, die wir durchführten, um diese Effektormechanismen zu charakterisieren, zeigte sich eine gesteigerte Expression verschiedener proinflammatorischer (IL-1 $\beta$ ), T<sub>H</sub>17 induzierender (IL-6, IL-23) und Inflammation begrenzender (IL-10) Zytokine (Kap.4.5, Abb.27,28).

#### **5.3.4.1 Der T<sub>H</sub>17 Signalweg, repräsentiert durch T<sub>H</sub>17 assoziierte Zytokine, ist in CF hochreguliert.**

Wir konnten in unserer Multiplexanalyse aus den Überständen der Lungenlymphknotenzellen neben IL-17A und IL-22 auch weitere signifikant erhöhte Zytokine in den CF-Proben nachweisen, die maßgeblich am T<sub>H</sub>17 Signalweg beteiligt und damit auch von großer funktioneller Bedeutung für die chronisch pulmonale Inflammation bei CF sind. Hierzu zählten IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10 und IL-23, welche in unseren Analysen hochsignifikante Unterschiede zwischen CF und den anderen Entitäten zeigten. Im Folgenden sollen diese Zytokine im Detail diskutiert werden.

#### **5.3.4.2 Übermäßige, dabei ineffiziente IL-1 $\beta$ -Produktion in CF als mögliches therapeutisches Ziel**

IL-1 $\beta$  ist ein Interleukin, das primär mit akuter und chronischer Inflammation assoziiert ist und eine wichtige Rolle in zahlreichen autoinflammatorischen Erkrankungen spielt. Der IL-1 Rezeptor besitzt eine TOLL-IL-1-Rezeptor Domäne und ist daher in der Lage, vergleichbar mit den Toll-Like Rezeptoren des innate Immunsystems, auf mikrobielle Produkte und Viren zu reagieren. (Dinarello, 2011) In unserer Analyse zeigte sich IL-1 $\beta$  in CF im Vergleich zu jeder anderen Entität deutlich erhöht (Abb.27A,B).

Reiniger et al. zeigten 2007, dass eine rasche Sekretion von IL-1 $\beta$  durch Bronchialepithelzellen als Reaktion auf die Infektion mit *Pseudomonas aeruginosa* in CFTR-defizitären oder  $\Delta$ F508-CFTR Mäusen im Vergleich zu CFTR-Wildtyp Mäusen

ausblieb (Reiniger, et al., 2007). Hieraus könnte eine ineffektive Immunantwort auf *Pseudomonas aeruginosa* resultieren, die zur chronischen *Pseudomonas*-Besiedlung der Lunge beitragen könnte, die mit einer Abnahme der Lungenfunktion assoziiert wurde und somit maßgebend für die Prognose bei CF ist (Levy, et al., 2009). Im Mausmodell mit *Pseudomonas*pneumonie zeigten IL-1R<sup>-/-</sup> Mäusen mit intaktem CFTR hingegen eine verbesserte Clearance von *Pseudomonas* aus der Lunge im Vergleich zu Wildtypmäusen (Schultz, et al., 2002), was darauf hinweist, dass die proinflammatorischen Effekte des IL-1-Signalwegs in diesem Zusammenhang die *Pseudomonas*-Clearance negativ beeinflussen können.

Unsere Ergebnisse können die Hypothese eines fehlgeleiteten, übermäßigen, möglicherweise aber ineffektiven IL-1 $\beta$  Signalwegs stützen. Unsere Ergebnisse lassen sich dahingehend interpretieren, dass bei CF-Patienten die proinflammatorische Wirkung des IL-1 $\beta$  das chronische Entzündungsgeschehen in der Lunge aufrechterhält, gleichzeitig aber die Elimination von *Pseudomonas* durch eine frühe Sekretion von IL-1 $\beta$  nach Kolonisation durch den Defekt im CFTR-Gen verhindert wird. IL-1 $\beta$  dient bereits als therapeutischer Angriffspunkt für eine antiinflammatorische Therapie zahlreicher autoimmuner Erkrankungen. Eine Antagonisierung von IL-1 $\beta$  kann bei diesen autoinflammatorischen Erkrankungen eine effektive Minderung der Erkrankungsschwere erwirken. (Levy, et al., 2009) Nach unseren Ergebnissen scheint eine solche IL-1 $\beta$  Antagonisierung aufgrund der quantitativ deutlich vermehrten Sekretion auch bei CF eine mögliche Therapieoption zur Regulierung der chronischen Inflammation zu sein.

Einen wesentlichen Trigger der chronischen Entzündungsreaktion der Lunge bei CF stellt die Rekrutierung neutrophiler Granulozyten dar. Diese kann einerseits als direkte Zytokinantwort auf eine IL-17A Ausschüttung, aber auch IL-1 Rezeptor vermittelt erfolgen. Fritzsching et al. zeigten 2015 im Mausmodell eine Assoziation von hypoxisch bedingtem Zellsterben, wie es bei CF durch die Obstruktion der Atemwege als Folge der verminderten Mukoziliären Clearance beobachtet wird, und einer IL-1 Rezeptor vermittelten Neutrophilienrekrutierung. Hier wurde insbesondere eine fehlende Neutrophilienrekrutierung bei IL-1R<sup>-/-</sup> Mäusen sowie ein protektiver Effekt einer IL-1R antagonistischen Therapie mit Anakinra auf neutrophile Inflammation und Emphysembildung beobachtet. In der gleichen Studie wurde Lungengewebe von CF- und COPD-Patienten sowie gesunden Kontrollen auf eine epitheliale Nekrose hin untersucht. Der Anteil an nekrotischem Atemwegsepithel bei CF Patienten war hierbei

deutlich erhöht und korrelierte mit der Mukusobstruktion in CF und COPD. (Fritzsching, et al., 2015)

Iannitti et al. zeigten bereits positive Effekte einer Therapie mit Anakinra bei CFTR<sup>-/-</sup> Mäusen nach Infektion mit *P. aeruginosa* oder *Aspergillus*. In beiden Versuchsgruppen konnte eine Verbesserung des Überlebens sowie eine Verminderung der bakteriellen Besiedlung, der Neutrophilenrekrutierung und der Lungenschädigung im Vergleich zu nicht behandelten Mäusen nachgewiesen werden (Iannitti, et al., 2016).

Klinische Studien, um den Einsatz von IL-1 $\beta$  Antagonisten bei CF besser evaluieren zu können, wären daher ein möglicher Ansatz, um die überschießende Entzündungsreaktion bei der CF-Lungenerkrankung zu regulieren.

#### **5.3.4.3 Vermehrte IL-6 und IL-23 Sekretion als Induktoren für eine T<sub>H</sub>17 assoziierte Inflammation**

Die Festlegung von CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen auf bestimmte Effektorzelllinien erfolgt in lymphatischen Geweben und unterliegt einer ständigen Regulierung in Infektionsherden. Die Festlegung auf die T<sub>H</sub>17 Zelllinie erfolgt durch Signale von IL-6 und *Transforming Growth Factor  $\beta$*  (TGF- $\beta$ ) und benötigt die Stimulation durch IL-23, wodurch die Aktivität und Proliferation der T<sub>H</sub>17 stimuliert wird. Viele IL-17A abhängige in vivo Reaktionen werden daher in Abwesenheit von IL-23 ausgesetzt. (Murphy, et al., 2018) In der frühen Prägung der T<sub>naive</sub> führt die Stimulation mit IL-6 zu einer Aktivierung von T<sub>H</sub>17 zelllinienspezifischen Genen und somit zur Ausbildung von T<sub>H</sub>17. Im Mausmodell zeigten IL-6<sup>-/-</sup> Mäuse sogar die Unfähigkeit zur Ausbildung von einigen T<sub>H</sub>17-assoziierten autoimmunen Erkrankungen, sodass IL-6 als Therapie Target bestimmter entzündlicher Erkrankungen dient. (Gaffen, et al., 2014)

IL-23 trägt eine große Bedeutung in der Pathogenese autoimmunologischer Prozesse, insbesondere reagieren auf IL-23 zahlreiche innate Immunzellen, wie  $\gamma\delta$  T-Zellen, natürliche Killerzellen oder ILCs. Eine Stimulation von T<sub>H</sub>17 mit IL-1 $\beta$  und IL-23 induziert eine lokale Gewebsentzündung durch Ausschüttung von IL-17A, IL-22, IL-10, IFN $\gamma$  und GM-CSF. Während eine Stimulation der T<sub>H</sub>17 mit dem eher protektiv wirkenden IL-6 die mukosale Abwehr sowie die Integrität der Schleimhautbarriere fördert und eine immunpathogenetische Antwort begrenzt, führt die Stimulation mit IL-23 zu der Entwicklung einer chronischen Inflammation im Gewebe, der Formation von Granulomen und der Ausbildung von Autoimmunität. (Gaffen, et al., 2014)

In unserer Analyse sahen wir eine Erhöhung von IL-6 in CF im Vergleich zu den Kontrollen, zwischen den einzelnen Entitäten zeigte sich kein signifikanter Unterschied

(Abb.27C,D). IL-23 war in CF erhöht gegenüber den Kontrollen, Fibrose und Spendern (Abb.28A,B). Dies lässt darauf schließen, dass CF eine T<sub>H</sub>17 assoziierte Erkrankung darstellt und die Dysregulation der T<sub>H</sub>17 zelllinienspezifischen Zytokine einen Beitrag zur chronischen Inflammation darstellt. Auch der T<sub>H</sub>17 Signalweg könnte demnach ein sinnvolles therapeutisches Ziel darstellen. Hier bedarf es allerdings zunächst weiterer Forschung zur Funktion und klinischen Relevanz dieser Dysbalance.

#### **5.3.4.4 Vermehrte oder ineffiziente IL-10-Produktion zur Unterbindung der Entzündungsreaktion in CF**

IL-10 ist essentiell für die Aufrechterhaltung der Integrität und Homöostase von epitheliale Gewebe, indem es die angeborene Immunantwort zur Begrenzung von Gewebsschäden durch virale oder bakterielle Infektion hemmt und gleichzeitig die Reparatur des Gewebes nach Inflammation erleichtert. IL-10 kann eine übermäßige Entzündungsreaktion unterbinden und stellt somit ein protektives, antiinflammatorisches Zytokin dar. (Ouyang, et al., 2011) Das durch regulatorische T-Zellen gebildete IL-10 unterdrückt die T<sub>H</sub>17 Reaktionen und die Produktion proinflammatorischer Zytokine wie IL-23 in einer späten Phase der Immunantwort (Murphy, et al., 2018).

Bergin et. al. konnten 2013 in bronchoalveolärer Lavage (BAL) von CF-Patienten und Non-CF-Bronchiektase-Patienten erhöhte IL-10-Level im Vergleich mit gesunden Kontrollen nachweisen (Bergin, et al., 2013). Armstrong et. al. untersuchten ebenfalls in BAL Proben von Kindern mit CF die Annahme, dass eine verminderte IL-10 Expression für die chronische Entzündungsreaktion in CF verantwortlich ist. Hierzu wurden BAL-Proben von jungen CF Patienten mit und ohne chronische Infektion der Lunge verglichen. Die IL-10 Level waren in beiden Gruppen im Vergleich zu einer Kontrollgruppe entgegen der Hypothese jedoch signifikant erhöht, was die Autoren als Zeichen für eine abnormale Immunantwort der Lunge gedeutet haben. Die erhöhten IL-10 Level resultieren dabei womöglich nicht durch den Primärdefekt des CFTR Kanals, sondern durch eine Dysregulation der Immunantwort. (Armstrong, et al., 2005)

In unserer Analyse zeigte sich eine erhöhte IL-10 Sekretion durch lungendrainierende Lymphknoten in CF insbesondere im Vergleich zu den Spendern (Abb.27E,F). Dies bestätigt die BAL-Ergebnisse von Bergin und Armstrong und zeigt möglicherweise einen Versuch der Immunantwort, die übermäßig gesteigerte Inflammation zu begrenzen. Die erhöhte Konzentration könnte auch ein Hinweis auf eine ineffiziente IL-10 Wirkung darstellen, die durch eine Dysregulation der Immunantwort

entsteht. Hier bedarf es ebenfalls weiterer Untersuchungen, insbesondere zur Funktion dieses Zytokins in CF.

### **5.3.5 Chronisches Remodelling mit erhöhter MMP-7, MMP-8 und TIMP-4 Konzentration als Hinweis für eine Dysbalance in CF-Lymphknoten**

Eine der Hauptursachen für die erhöhte Morbidität und Mortalität stellt das progressive *Airway Remodelling*, also die strukturelle Umbildung der Atemwege, in CF dar. Durch eine vermehrte freie proteolytische Aktivität durch sezernierte Serin-Proteasen (z.B. Elastase) und *Matrix-Metalloproteinasen* (MMPs) durch Neutrophile und Makrophagen wird das Lungengewebe dauerhaft geschädigt. MMPs übernehmen dabei eine wichtige Rolle bei zahlreichen Prozessen der Homöostase unter physiologischen Bedingungen sowie unter Inflammation eine Zunahme der proteolytischen Aktivität und eines Remodelling. Gegenspieler zu diesem Prozess bilden spezifische Inhibitoren der MMPs, wie die *Tissue Inhibitors of Metalloproteinases* (TIMPs), die eine antiproteolytische und somit protektive Wirkung auf das Gewebe ausüben. Mit höherem Lebensalter und im fortgeschrittenen CF-Krankheitsverlauf steigt die proteolytische Aktivität der MMPs, die antiproteolytische Kapazität der Atemwege wird überschritten und es kommt zur chronisch progressiven Destruktion des Lungenparenchyms. (Gaggar, et al., 2011)

Eine Erhöhung verschiedener MMPs konnte bereits im Atemwegsepithel, Sputum und Serum bei CF nachgewiesen werden, u.a. die MMP-7 in Atemwegsepithelien (Dunsmore, et al., 1998) sowie die MMP-8 im Sputum und Serum (Ratjen, et al., 2002) von CF-Patienten. Vergleichbar mit anderen chronischen pulmonalen Erkrankungen wird auch bei CF eine Dysbalance zwischen proteolytischer MMP-Aktivität und protektiver TIMP-Aktivität erwartet, genauere Untersuchungen stehen hier bisher noch aus (Gaggar, et al., 2011).

In der Gesamtheit der gemessenen MMPs und TIMPs in den Überständen von lungendrainierenden Lymphknotenzellen ließ sich eine quantitative Erhöhung der Konzentration von MMP-7, MMP-8 und TIMP-4 in CF im Vergleich zu Kontrollen (MMP-8, TIMP-4) und Spendern (MMP-7) nachweisen (Abb.31). Alle weiteren Analyten (MMP-2, MMP-9, MMP-10, MMP-12, TIMP-1, TIMP-2, Abb.32) waren im Vergleich der Entitäten unauffällig und werden daher in dieser Diskussion nicht näher berücksichtigt.

MMP-7 stellt die kleinste Matrix-Metalloproteinase dar, besitzt aber eine breite Substratspezifität und kann dadurch die Spaltung zahlreicher Matrixbestandteile katalysieren (Gaggar, et al., 2011). Die Erhöhung von MMP-7 in den CF-Proben im

Vergleich zu Spenderproben zeigt, dass die chronische Inflammation und Neutrophilenrekrutierung bei CF in der Lunge auch in den Lungenlymphknoten zu einer erhöhten proteolytischen Aktivität durch MMP-7 führt (Abb.31B). Dunsmore et al. haben bereits in ihren Untersuchungen gezeigt, dass die MMP-7 Expression im Atemwegsepithel bei CF erhöht ist, eine Sekretion sowohl apikal als auch basal erfolgt und diese eine essentielle Rolle im Remodelling spielt (Dunsmore, et al., 1998). Diese Erhöhung konnten wir nun auch in Lymphknotenzellen nachweisen.

Die MMP-8 wird als Kollagenase insbesondere von Neutrophilen sezerniert und dient der Spaltung von Typ I-III Kollagen (Gaggar, et al., 2011). In unserer Analyse sahen wir MMP-8 bei CF im Vergleich zu den Kontrollen erhöht, insbesondere einige CF Proben konnten wir als „High Producer“ identifizieren (Abb.31C). Ratjen et al. wiesen zuvor eine erhöhte Expression und Aktivität von MMP-8 im Atemwegssekret sowie im Serum von CF Patienten nach, wobei die Serumkonzentration mit der individuellen Lungenfunktion des Patienten negativ korrelierte (Ratjen, et al., 2002). Dies lässt die Hypothese zu, dass die „High Producer“ in CF in unserer Analyse ebenfalls eine schlechtere Lungenfunktion aufweisen als der Rest der Kohorte. Dies könnte bspw. durch eine floride Infektion zu erklären sein, lässt sich aus Datenschutzrechtlichen Gründen aber leider nicht nachvollziehen.

Der TIMP-4 stellt einen spezifischen MMP-Inhibitor mit 1:1 Bindung dar. Es wurde zuvor eine Imbalance zwischen MMPs und TIMPs in einer Vielzahl pulmonaler Erkrankungen wie COPD oder Asthma beschrieben. (Gaggar, et al., 2011) In unserer Analyse zeigte sich TIMP-4 bei CF erhöht gegenüber den Kontrollen, insbesondere zu Fibrose (Abb.31E,F). Die Fibrosegruppe wies dabei insgesamt eine vermehrte MMP-7 und eine verminderte TIMP-4-Konzentration in den Lungenlymphknoten im Vergleich zu allen anderen Entitäten auf (Abb.31B,F). Dies könnte ein Hinweis auf eine ausgeprägte MMP/TIMP-Dysbalance als Zeichen für pulmonales Remodelling im Rahmen der pulmonalen Fibrose sein und war somit durchaus zu erwarten. Im Gegensatz dazu ist die TIMP-4 Konzentration in CF nicht vermindert, sondern sogar erhöht (Abb.31F). Dies könnte auf eine mögliche Kompensation der MMP-Überexpression und somit vermehrter TIMP Sekretion hindeuten. Es könnte auch auf das geringere Patientenalter in der CF-Kohorte zurückzuführen sein (Tab.17), da mit zunehmendem Lebensalter die proteolytische Aktivität durch die MMPs zunimmt und die antiproteolytische Kapazität durch z.B. TIMPs der Atemwege nachlässt (Gaggar, et al., 2011). Eine weitere Erklärung für die erhöhte TIMP-4 Konzentration könnte eine Lösung des TIMP-4 aus einer TIMP-

MMP-Komplexbildung sein, wodurch die freie Konzentration des TIMP-4 erhöht ist, die inhibitorische Funktion jedoch wie zu erwarten vermindert wäre.

Unsere Analyse kann aktuelle Forschungsergebnisse bezüglich der vermehrten Konzentration von MMPs bei CF Patienten bestätigen und diese durch die Erkenntnis der Expression in lungendrainierenden Lymphknotenzellen *in vivo* ergänzen, was insbesondere durch den hohen Aufwand der Materialgewinnung eine Besonderheit darstellt. Eine Aussage bezüglich der Funktion und Aktivität ist durch unsere rein quantitative Messung jedoch nicht möglich. Eine ergänzende Untersuchung der MMP und TIMP Konzentration aus den Lungengewebszellen wäre zur weiteren Deskription wünschenswert. Außerdem stehen genauere Untersuchungen bezüglich der Funktion und der Rolle der MMPs im chronischen Entzündungsprozess *in vivo* in CF-Patienten aus, um diese als mögliche Therapie Targets besser evaluieren zu können.

## 5.4 Gesamtausblick

Diese Arbeit trägt dazu bei, T<sub>H</sub>17-assoziierte Entzündungsprozesse der Lunge bei CF genauer zu charakterisieren. Langfristig können unsere Erkenntnisse helfen, neue Therapieansatzpunkte zu finden. Das detaillierte Verständnis des T<sub>H</sub>17 und des IL-17A Signalwegs ist dabei notwendig, um eine mögliche direkte oder indirekte Anti-IL-17A Therapie zur Prävention inflammationsbedingter Lungenschädigung zu evaluieren. Ergänzend hierzu bedarf es sowohl der genaueren Identifikation von IL-17A und IL-22 produzierenden unkonventionellen Lymphozytenpopulationen wie ILCs als auch ein umfassenderes Verständnis des komplexen Zytokinnetzwerkes der Lunge, wie sie durch unsere Arbeitsgruppe derzeit erfolgen. Außerdem sind weitere Untersuchungen zur Rolle der IL-17A/IL-22<sup>+</sup> Gedächtnis-T-Zellen ausstehend. Weiterhin bedarf es Untersuchungen zu funktionellen Effekten der hier beschriebenen Zellen, um gezielte Aussagen treffen zu können. Die hier vorliegende Arbeit beschränkt sich auf die Untersuchung des T<sub>H</sub>17 Signalwegs im Endstadium von CF, weshalb keine Aussagen zur Rolle von IL-17A im Frühstadium der Erkrankung möglich sind. Sollte der T<sub>H</sub>17 Signalweg als therapeutisches Ziel in Betracht gezogen werden, bleibt die Frage, inwiefern diese Mechanismen schon im frühen Krankheitsverlauf von Bedeutung sind.

## 6 Zusammenfassung

Aktuelle Publikationen zeigen, dass die Interleukine 17A und 22 eine wichtige Rolle in der Pathogenese der zystischen Fibrose (CF) spielen. Diesen Untersuchungen zufolge reguliert IL-17A die Expression pro-inflammatorischer Mediatoren und hebt möglicherweise die sonst protektive Funktion des IL-22 auf. Ziel dieser Arbeit war die genaue Identifizierung und Charakterisierung der IL-17A und IL-22 produzierenden T-Lymphozytenpopulationen bei CF-Patienten.

Als Material verwendeten wir hiläre Lymphknoten sowie Lungengewebe aus Lungenexplantaten von CF-, Emphysem- und Fibrose-Patienten, sowie paratracheale Lymphknoten von Organspendern. Die isolierten Zellen wurden einer durchflusszytometrischen Analyse der IL-17A und IL-22 produzierenden Populationen unterzogen. Wir differenzierten dabei konventionelle CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen sowie Effektor-Gedächtnis-T-Zellen (T<sub>EM</sub>), zentrale Gedächtnis-T-Zellen (T<sub>CM</sub>) und naive T-Zellen (T<sub>naive</sub>). Ergänzend wurden die Zellen unspezifisch stimuliert zum Nachweis von Zytokin- und MMP-Expression mittels Bioplexanalyse.

Unsere Analyse zeigte eine gesteigerte Sekretion von IL-17A, IL-17F und IL-22 durch Lymphknotenzellen von CF-Patienten. Signifikante Unterschiede in der Zusammensetzung der Gedächtnis-T-Zellen ergaben sich für die Subpopulation der IL-17A/IL-22<sup>+</sup> T<sub>naive</sub> im CF-Lungengewebe. Die Bioplexanalyse zeigte außerdem die gesteigerte Expression verschiedener proinflammatorischer (IL-1 $\beta$ , IL-31), T<sub>H</sub>17 induzierender (IL-6, IL-23) und Inflammation begrenzender (IL-10, IL-25) Zytokine sowie die vermehrte Sekretion von MMP-7 und 8 und TIMP-4 in den Proben der CF-Patienten.

Unsere Ergebnisse identifizierten verschiedene konventionelle Lymphozytenpopulationen als Produzenten von IL-17A und IL-22 bei CF. Darüber hinaus konnten wir bereits publizierte Daten zum vermehrten Auftreten von T<sub>H</sub>17 Lymphozyten bei CF bestätigen. Unsere Erkenntnisse werden helfen, das lokale Zytokinnetzwerk bei CF genauer aufzuklären und die Interaktion von IL-17A und IL-22 bei Entzündung und Regenerationsprozessen in der Lunge detaillierter zu verstehen.

## 7 Anhang

### 7.1 Literaturverzeichnis

**Armstrong, D.S., et al. 2005.** Lower airway inflammation in infants with cystic fibrosis detected by newborn screening. *Pediatr Pulmonol.* 40, 2005, 6.

**Aujla, S. J., et al. 2008.** IL-22 mediates mucosal host defense against Gram-negative bacterial pneumonia. *Nat Med.* März 2008, Bd. 14, 3, S. 275-281.

**Bayes, H.K., Ritchie, N.D. und Evans, T.J. 2016.** Interleukin-17 Is Required for Control of Chronic Lung Infection Caused by *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun.* . 2016, 84 (12).

**Bergin, D.A., et al. 2013.** Airway inflammatory markers in individuals with cystic fibrosis and non-cystic fibrosis bronchiectasis. *J Inflamm Res.* 2013, 6.

**Cantin, A. M., et al. 2015.** Inflammation in cystic fibrosis lung disease: Pathogenesis and therapy. *Journal of Cystic Fibrosis.* 2015, Bd. 14, S. 419-430.

**Chan, Y. R., Chen, K. und Duncan, S. R. 2013.** Patients with cystic fibrosis have inducible IL-17+ IL-22+ memory cells in lung draining lymphnodes. *J Allergy Clin Immunol.* 2013, 131, S. 1117-1129.

**Chang, S.H. und Dong, C. 2009.** IL-17F: regulation, signaling and function in inflammation. *Cytokine.* 2009, 46(1).

**Chen, K., et al. 2011.** IL-17RA is required for CCL2 expression, macrophage recruitment, and emphysema in response to cigarette smoke. *PLoS One.* 2011, 6(5).

**Di Salvo, E., et al. 2018.** IL-33/IL-31 Axis: A Potential Inflammatory Pathway. *Mediators Inflamm.* 2018, März.

**Di Stefano, A., et al. 2009.** T helper type 17-related cytokine expression is increased in the bronchial mucosa of stable chronic obstructive pulmonary disease patients. *Clin Exp Immunol.* 2009, Bd. 157, S. 316-324.

**Dinarello, C. A. 2011.** Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases. *Blood.* Apr 7, 2011, Bd. 117(14), S. 3720-3732.

**Dubin, P. J. und Kolls, J. K. 2011.** IL-17 in Cystic Fibrosis: More Than Just Th17 Cells. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine.* 2011, 184, S. 155-157.

—. 2007. IL-23 mediates inflammatory responses to mucoid *Pseudomonas aeruginosa* lung infection in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* Februar 2007, Bd. 292, 2, S. 519-528.

- Dubin, P.J., McAllister, F. und J.K.Kolls. 2007.** Is cystic fibrosis a TH17 disease? *Inflammation Research*. 2007, Bd. 56, S. 221-227.
- Dunsmore, S.E., et al. 1998.** Matrilysin expression and function in airway epithelium. *J Clin Invest*. 102(7), 1998, S. 1321–1331.
- Elborn, J. S. 2016.** Cystic fibrosis. *The Lancet*. Vol. 388, 2016.
- Elizur, A., Cannon, C. L. und Ferkol, T. W. 2008.** Airway inflammation in Cystic Fibrosis. *CHEST*. Februar 2008, 133, S. 489-495.
- Farber, D. L., Yudanin, N. A. und Restifo, N. P. 2014.** Human memory T cells: generation, compartmentalization and homeostasis. *Nature Immunology*. Januar 2014, Bd. 14, S. 24-33.
- Fritzsching, B., et al. 2015.** Hypoxic epithelial necrosis triggers neutrophilic inflammation via IL-1 receptor signaling in cystic fibrosis lung disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 15. Apr 2015, 191(8).
- Gaffen, S. L., et al. 2014.** IL-23-IL-17 immune axis: Discovery, Mechanistic Understanding, and Clinical Testing. *Nat Rev Immunol*. 14 (9), 2014, S. 585-600.
- Gaggar, A., et al. 2011.** The role of matrix metalloproteases in cystic fibrosis lung disease. *Eur Respir J*. September 2011, Bd. 38, 3, S. 721-727.
- Gaspar, M.C., et al. 2013.** Pseudomonas aeruginosa infection in cystic fibrosis lung disease and new perspectives of treatment: a review. *Eur J Clin Microbial Infect Dis*. 2013, 32, S. 1231-1252.
- Hagner, M., et al. 2020.** IL-17A from innate and adaptive lymphocytes contributes to inflammation and damage in cystic fibrosis lung disease. *Eur Respir J*. Dec 10, 2020.
- Iannitti, R.G., et al. 2016.** IL-1 receptor antagonist ameliorates inflammasome-dependent inflammation in murine and human Cystic Fibrosis. *Nat. Commun*. 7:10791, 2016.
- Iannitti, R.G., et al. 2013.** Th17/Treg imbalance in murine cystic fibrosis is linked to indoleamine 2,3-dioxygenase deficiency but corrected by kynurenines. *Am J Respir Crit Care Med*. 187, 2013, S. 609-620.
- Kolls, J. K., McCray, P. B. und Chan, Y. R. 2008.** Cytokine-mediated regulation of antimicrobial proteins. *Nature Immunology*. November 2008, Bd. 8, 11, S. 829-835.
- Kushwah, R., Gagnon, S. und Swezey, N. B. 2013.** Intrinsic predisposition of naive cystic fibrosis T cells to differentiate towards a Th17 phenotype. *Respiratory Research*. 2013, Bd. 14, 138.

- Levy, H., et al. 2009.** IL1B polymorphisms modulate cystic fibrosis lung disease. *Pediatric pulmonology*. 44(6), 2009, S. 580–593.
- Mosmann, T. R., et al. 1986.** Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol*. April 1986, 136 (7), S. 2348-2357.
- Murphy, K. und Weaver, C. 2018.** *Janeway Immunology*. s.l. : W. W. Norton & Company, 2018.
- Ouyang, W., et al. 2011.** Regulation and functions of the IL-10 family of cytokines in inflammation and disease. *Annu Rev Immunol*. 29, 2011, S. 71-109.
- Ratjen, F, et al. 2002.** Matrix metalloproteases in BAL fluid of patients with cystic fibrosis and their modulation by treatment with dornase alpha. *Thorax*. 57(11), 2002, S. 930–934.
- Ratjen, F., et al. 2015.** Cystic Fibrosis. *Nat Rev Dis Primers*. 2015, 1.
- Reiniger, N., et al. 2007.** Resistance to Pseudomonas aeruginosa Chronic Lung Infection Requires Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator-Modulated Interleukin-1 (IL-1) Release and Signaling through the IL-1 Receptor. *INFECTION AND IMMUNITY*. April 2007, Bd. 75 (4), S. 1598-1608.
- Richeldi, L., et al. 2003.** Corticosteroids for idiopathic pulmonary fibrosis. *Cochrane Database Syst Rev*. 2003.
- Rosen, B. H., et al. 2018.** Infection Is Not Required for Mucoinflammatory Lung Disease in CFTR-Knockout Ferrets. *Am J Respir Crit Care Med*. Mai 2018, 197 (10).
- Schirren, M., et al. 2019.** Thoracic lymphatic system - principles, characteristics and advice for the practice. *Chirurg*. 2019, 90, S. 957-965.
- Schultz, M.J., et al. 2002.** Role of interleukin-1 in the pulmonary immune response during Pseudomonas aeruginosa pneumonia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. Feb, 2002, 282 (2).
- Song, X., et al. 2016.** The roles and functional mechanisms of interleukin-17 family cytokines in mucosal immunity. *Cell Mol Immunol*. 13 (4), 2016, S. 418-431.
- Tan, H., et al. 2011.** The Th17 pathway in Cystic Fibrosis Lung Disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2011, 184, S. 252-258.
- Taraseviciene-Stewart, L. und Voelkel, N.F. 2008.** Molecular pathogenesis of emphysema. *J Clin Invest*. Feb 1, 2008, 118(2), S. 394–402.

**Taraseviciene-Stewart, L., et al. 2005.** An animal model of autoimmune emphysema. *Am J Respir Crit Care Med.* Apr 1, 2005, Bd. 171 (7), S. 734-742.

**Todd, N. W., Luzina, I. G. und Atamas, S. P. . 2012.** Molecular and cellular mechanisms of pulmonary fibrosis. *Fibrogenesis & tissue repair.* 5(1), 2012.

**Trudzinski, F.C., et al. 2018.** Microbiological airway colonization in COPD patients with severe emphysema undergoing endoscopic lung volume reduction. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis.* 2018, 13, S. 29-35.

**Vankeerberghen, A., Cupens, H. und Cassiman, J. 2002.** The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator an intriguing protein with pleiotropic functions. *Journal of Cystic Fibrosis.* 2002, 1, S. 13-29.

**Wilson, M.S., et al. 2010.** Bleomycin and IL-1beta-mediated pulmonary fibrosis is IL-17A dependant. *J Exp Med.* 2010, 207, S. 535-552.

## 7.2 Glossar

### 7.2.1 Anglizismen

<b>Begriff</b>	<b>Bedeutung</b>
<i>Airway Remodelling</i>	strukturelle Umbildung der Atemwege
<i>Airway Surface Liquid</i>	Atemwege auskleidende Flüssigkeit
<i>Assay</i>	Untersuchung
<i>Cluster of Differentiation</i>	Gruppen immunphänotypischer Oberflächenmerkmale von Zellen
<i>Conductance Transmembrane Regulator</i>	Transmembranöser Ionenleitregulator
<i>Control</i>	Kontrolle
<i>Dead</i>	Tod
<i>Dot Plot</i>	Punktauftragung
<i>Endstage</i>	Lungenerkrankungen im Endstadium
<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>	enzymgekoppelter Immunadsorptionstest
<i>Forward scatter</i>	Vorwärtstreulicht
<i>Gate</i>	Tor
<i>Gating</i>	Festlegung bestimmter Zellgates
<i>High Producer</i>	Probe mit erhöhter Produktion
<i>Horseradish Peroxidase</i>	Meerrettich Peroxidase
<i>Kit</i>	Baukasten
<i>Lot</i>	Charge
<i>Low-Producer</i>	Probe mit verminderter Produktion
<i>Major Histocompatibility Complex (MHC)</i>	Haupthistokompatibilitätskomplex
<i>mukoziliäre Clearance</i>	Säuberung der Atemwege
<i>Revolutions per Minute (rpm)</i>	Umdrehungen pro Minute
<i>Side Scatter</i>	Seitwärtsstreulicht
<i>Target</i>	Angriffspunkt
<i>Tissue Inhibitor of Metalloproteinases</i>	Matrix-Metalloproteinasen-Gewebsinhibitor
<i>Toll-Like</i>	Toll-ähnlich
<i>Transforming Growth Factor <math>\beta</math></i>	transformierendes Wachstumshormon $\beta$
<i>width</i>	Weite

## 7.2.2 Einheiten

### Basiseinheiten

Name	Zeichen
Celsius	C
Gramm	g
Liter	l
Meter	m
Minute	min
Mol	M
Sekunde	s
Stunde	h

### Metrische Präfixe

Vorsatz	Zeichen	Faktor
Piko	p	$10^{-12}$
Nano	n	$10^{-9}$
Mikro	$\mu$	$10^{-6}$
Milli	m	$10^{-3}$
Zenti	c	$10^{-2}$
Dezi	d	$10^{-1}$
Kilo	k	$10^3$

### 7.3 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich Allen meinen großen Dank aussprechen, die mich bei der Erschaffung dieser Arbeit unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt meiner Betreuerin PD Dr. Anna-Maria Dittrich und meiner Co-Betreuerin Dr. Melanie Albrecht für die hervorragende Betreuung, Unterstützung und Inspiration während der gesamten Arbeit und darüber hinaus. Danke, dass ihr mich gefördert und gefordert habt und mir so meinen Weg in die Forschung aufgezeigt habt.

Außerdem danke ich meinen Kolleginnen der Arbeitsgruppe „Entzündliche Lungenerkrankungen im Kindesalter“ der MHH, allen voran Sahar Pourebrahim und Julia Camargo Neumann. Ihr habt unsere gemeinsame Zeit im Labor zu einer wunderbaren Erfahrung gemacht, die ich so schnell nicht vergessen werde.

Ein großer Dank gilt meinen Freunden und Kommilitonen, die mir mit Unterstützung und Rat Beiseite standen und für eine wunderbare Zeit während des Studiums und der Promotion beigetragen haben.

Abschließend möchte ich mich bei meiner Familie und Max bedanken, die mich jederzeit unterstützten, motivieren und immer hinter mir stehen. Danke, dass ihr immer an mich glaubt.

## 7.4 Veröffentlichungen

**Albrecht, M.; Pallenberg, S. et al. 2016.** Expression of IL-17A and IL-22 by innate lymphoid cells from lymph node tissue from CF patients. Conference Paper, Journal of Cystic Fibrosis 15(1)

**Albrecht, M.; Olawaseun, D.I.; Pallenberg, S. et al. 2018.** IL-17A producing lymphocytes in end stage lung disease. *European Respiratory Journal* . 2018, 52.

**Pallenberg, S. 2016.** Identifikation und Charakterisierung von IL-17 und IL-22 produzierenden Lymphozytenpopulationen bei CF-Patienten, *Abstract. Atemwegs und Lungenerkrankungen* 42/2, Februar 2016, S.45

**Pallenberg, S. 2016.** Identifikation und Charakterisierung von IL-17 und IL-22 produzierenden Lymphozytenpopulationen bei CF-Patienten, *Vortrag*. 38. Jahrestagung der Gesellschaft für pädiatrische Pneumologie, März 2016

**Pallenberg, S. 2017.** Identification and characterization of IL-17A and IL-22 producing lymphocytes in CF lung disease, *Vortrag, Abstract und Poster*. 11. Cystic Fibrosis European Young Investigators Meeting, Februar 2017

## 7.6 Eidesstattliche Erklärung nach § 2 Abs. 2 Nrn. 6 und 7

Ich erkläre, dass ich die der Medizinischen Hochschule Hannover zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel „Identifikation und Charakterisierung von IL-17 und IL-22 produzierenden Lymphozyten in Lungengewebe und bronchialen Lymphknoten bei CF-Patienten im Vergleich zu anderen terminalen Lungenerkrankungen“ in der Klinik für pädiatrische Pneumologie, Allergologie und Neonatologie unter Betreuung von PD Dr. Anna-Maria Dittrich mit Unterstützung durch Dr. Melanie Albrecht ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Die Gelegenheit zum vorliegenden Promotionsverfahren ist mir nicht kommerziell vermittelt worden. Insbesondere habe ich keine Organisation eingeschaltet, die gegen Entgelt Betreuerinnen und Betreuer für die Anfertigung der Dissertation sucht oder die mir obliegenden Pflichten hinsichtlich der Prüfungsleistungen für mich ganz oder teilweise erledigt.

Ich habe die Dissertation bisher an keiner in- oder ausländischen Hochschule zur Promotion eingereicht. Weiterhin versichere ich, dass ich den beantragten Titel bisher noch nicht erworben habe.

Teile der Ergebnisse dieser Dissertation wurden durch Dr. Melanie Albrecht in Kooperation mit M. Hagner bereits im „European Respiratory Journal“ 2020 veröffentlicht (Hagner, et al., 2020).

Hannover, den \_\_\_\_\_

---

Sophia Theres Pallenberg

