

**Einfluss von Bakterien und bakteriellen  
Bestandteilen auf die Interleukin-17-Produktion von  
Thymus- und Milzzellen unter Berücksichtigung  
ihrer möglichen Rolle bei T-Zell-vermittelten  
Autoimmunerkrankungen**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

**Andreas Weber**  
aus Rodalben

Düsseldorf, Februar 2016

Aus der Klinik für Neurologie des Universitätsklinikums Düsseldorf  
(Direktor: Univ.-Prof. Dr.med. Hans-Peter Hartung)

Gedruckt mit der Genehmigung der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen  
Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: PD Dr. med. Harald H. Hofstetter

Korreferent: Prof. Dr. rer. nat. Vlada Urlacher

Tag der mündlichen Prüfung: 06.02.2017

*Meinen Eltern*

<b>INHALTSVERZEICHNIS</b> .....	<b>I</b>
<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b> .....	<b>VII</b>
<b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>XI</b>
<b>SUMMARY</b> .....	<b>XIII</b>
<b>1. EINLEITUNG</b> .....	<b>1</b>
1.1 T-ZELLENTWICKLUNG IM THYMUS .....	1
1.2 AKTIVIERUNG VON NAIVEN T-ZELLEN .....	5
1.3 T-HELPERZELLEN.....	7
1.4 ZYTOKINE .....	10
1.5 INTERLEUKIN-17 .....	11
1.6 PATTERN-RECOGNITION REZEPTOREN.....	12
1.7 DER NOTCH-SIGNALWEG .....	17
1.8 AUTOIMMUNERKRANKUNGEN UND MULTIPLE SKLEROSE.....	18
1.9 ANTIGENE UND STIMULANZIEN.....	19
1.9.1 Bakterien .....	19
1.9.2 Bakterielle Bestandteile.....	21
1.9.3 Imiquimod und Gardiquimod.....	23
1.9.4 Inflammasome Inducers .....	23
1.10 FRAGESTELLUNG.....	24
<b>2 MATERIAL UND METHODEN</b> .....	<b>25</b>
2.1 MATERIAL .....	25
2.1.1 Geräte .....	25
2.1.2 Verbrauchsmaterialien.....	26
2.1.3 Chemikalien, Reagenzien und gebrauchsfertige Lösungen .....	27
2.1.4 Verwendete Kits .....	28
2.1.5 Versuchstiere .....	29
2.1.6 Immunisierung .....	29

2.1.7	Medien und Zellkulturbestandteile.....	29
2.1.8	Antikörper für Differenzierungen .....	30
2.1.9	ELISpot Antikörper.....	30
2.1.10	FACS-Antikörper .....	31
2.1.11	Primer .....	32
2.1.12	Verwendete Antigene und Stimulanzen.....	34
2.1.13	Nährmedien .....	36
2.1.14	Puffer und Lösungen .....	37
2.1.15	Software .....	38
2.2	ZELLBIOLOGISCHE METHODEN .....	39
2.2.1	Organentnahme .....	39
2.2.2	Herstellung von Zellsuspensionen .....	39
2.2.3	Bestimmung der Zellzahl .....	39
2.2.4	Isolation von T-Zellen aus der Milz durch MACS-Separation .....	40
2.2.5	Negativselektion von CD4 <sup>+</sup> -T-Zellen aus der Milz .....	40
2.2.6	Th17-Differenzierung.....	41
2.2.7	Th17-Polarisierung von MOG <sub>35-55</sub> -spezifischen CD4 <sup>+</sup> -T-Zellen.....	41
2.2.8	Generierung von Antigen-präsentierenden Zellen .....	42
2.2.9	Isolierung mononukleärer Zellen aus dem ZNS.....	43
2.3	TIEREXPERIMENTELLE METHODEN .....	44
2.3.1	Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis (EAE) .....	44
2.3.2	Tierhaltung und Genehmigung der Tierversuche.....	44
2.3.3	Induktion der EAE .....	44
2.3.4	Klinische Evaluation der Mäuse.....	45
2.4	QUANTIFIZIERUNG SEZERNIERTER ZYTOKINE MITTELS ELISPOT-ASSAY .....	46
2.4.1	Prinzip der Methode .....	46
2.4.2	Versuchsdurchführung .....	47
2.4.3	Auswertung .....	49
2.4.4	Verwendete Antigene .....	49
2.5.	DURCHFLUSSZYTOMETRIE.....	50
2.5.1	Prinzip der Methode .....	50

2.5.2	Markierung toter Zellen mittels Fixable Viability Dye eFluor® .....	51
2.5.3	Extrazelluläre-Färbung.....	51
2.5.4	Intrazelluläre Färbung von Zytokinen.....	52
2.5.5	Extrazelluläre Färbung der Notch-Rezeptoren.....	52
2.5.6	Intrazelluläre Färbung von FOXP3 und ROR $\gamma$ t.....	53
2.5.7	Nachweis der Proliferation durch CFSE-Färbung .....	53
2.5.8	Nachweis der Apoptose in Thymozyten mittels Annexin-Assay.....	54
2.5.9	Caspase-Assay.....	54
2.5.10	IL-17 Sekretion Assay.....	55
2.5.11	Auswertung der FACS-Daten .....	56
2.6	<b>MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN</b> .....	57
2.6.1	RNA-Isolation aus Thymuszellen .....	57
2.6.2	Konzentrationsbestimmung von RNA und DNA.....	57
2.6.3	cDNA-Synthese.....	57
2.6.4	Quantitative Real-time PCR (qRT-PCR).....	58
2.6.5	Auswertung der PCR-Daten.....	59
2.7	<b>STATISTISCHE ANALYSEN</b> .....	60
<b>3.</b>	<b>ERGEBNISSE</b> .....	<b>61</b>
3.1	<b>BEEINFLUSSUNG DER ZYTOKINPRODUKTION VON THYMUSZELLEN</b> .....	61
3.1.1	Einfluss von Bakterien auf die Zytokinproduktion von Thymuszellen .....	61
3.1.2	IFN- $\gamma$ wird hauptsächlich von CD4 <sup>+</sup> -Thymuszellen produziert.....	64
3.1.3	IL-17 wird hauptsächlich von CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> -Thymuszellen produziert.....	65
3.1.4	Bakterien haben keinen proliferationsfördernden Effekt auf DP- Thymuszellen.....	67
3.1.5	Stimulation mit Bakterien führt zu einer Senkung der Notch2-Aktivität von DP-Thymuszellen.....	67
3.1.6	Beeinflussung der IL-17 Produktion durch Peptidoglycane .....	68
3.1.7	Beeinflussung der IL-17 Produktion durch Lipoteichonsäuren .....	69
3.1.8	Beeinflussung der Zytokinproduktion durch Flagellin .....	71
3.1.9	Beeinflussung der Zytokinproduktion durch Diphtherie Toxin.....	71
3.1.10	Beeinflussung der IFN- $\gamma$ Produktion durch Zellwandbestandteile von <i>P. aeruginosa</i> .....	73

3.1.11	Beeinflussung der IL-6 Produktion durch Zellwandbestandteile von <i>P.aeruginosa</i> .....	74
3.1.12	Beeinflussung der IL-4-Produktion durch Zellwandbestandteile von <i>P. aeruginosa</i> .....	75
3.1.13	Beeinflussung der IL-17-Produktion durch Zellwandbestandteile von <i>P. aeruginosa</i> .....	75
3.1.14	Zellwandbestandteile haben keinen proliferationsfördernden Effekt auf DP-Thymuszellen.....	77
3.1.15	Bakterielle Bestandteile führen zu einer Senkung der Notch2-Aktivität von DP-Thymuszellen.....	78
3.1.16	Beeinflussung der Zellvitalität durch Stimulation mit Lektin und Con A .....	79
3.1.17	Beeinflussung der Zytokinproduktion durch die TLR7-Liganden Imiquimod und Gardiquimod®.....	81
3.1.18	Beeinflussung der IL-17 Produktion durch Inflammasome Inducers .....	83
3.1.19	Einfluss von Bakterien in Kombination mit Alumun- Kristallen auf die IL-17 und IL-1 $\beta$ Produktion.....	85
3.1.20	PCR .....	86
3.2	BEEINFLUSSUNG DER ZYTOKINPRODUKTION VON MILZZELLEN.....	88
3.2.1	Einfluss von Bakterien auf die Zytokinproduktion von Milzzellen.....	88
3.2.2	Die meisten IFN- $\gamma$ produzierenden Milzzellen sind CD4 negativ .....	91
3.2.3	Einfluss von Bakterien auf die intrazelluläre IL-17 Konzentration .....	92
3.2.4	Einfluss von Bakterien auf die IL-17-Produktion von CD4 <sup>+</sup> - und CD8 <sup>+</sup> - T-Zellen.....	94
3.2.5	Beeinflussung der intrazellulären IL-17 und IFN- $\gamma$ Konzentration von CD4 <sup>+</sup> - T-Zellen durch Stimulation mit Bakterien .....	95
3.2.6	Beeinflussung von FOXP3 und ROR $\gamma$ t durch Kultivierung mit verschiedenen Bakterien während der Th17-Polarisierung .....	97
3.2.7	Einfluss von Bakterien auf die Zellproliferation von Milzzellen.....	98
3.2.8	Beeinflussung der Notch-Rezeptoren durch Stimulation mit Bakterien .....	99
3.2.9	Einfluss von Zellwandbestandteilen auf die IFN- $\gamma$ Produktion .....	100
3.2.10	Einfluss von bakteriellen Bestandteilen auf die IL-6 Produktion .....	103
3.2.11	Einfluss von bakteriellen Bestandteilen auf die IL-17 Produktion .....	104

3.2.12	Einfluss von bakteriellen Bestandteilen auf die IL-2, IL-4 und IL-5 Produktion .....	107
3.2.13	Einfluss von PGN-EK, LTA-SA und LPS-PA auf die intrazelluläre IFN- $\gamma$ und IL-17 Konzentration .....	108
3.2.14	Einfluss von bakteriellen Bestandteilen auf die IL-17 Produktion von CD4 <sup>+</sup> - und CD8 <sup>+</sup> - T-Zellen .....	109
3.2.15	Beeinflussung der intrazellulären IL-17 und IFN- $\gamma$ Konzentration von CD4 <sup>+</sup> - T-Zellen durch Stimulation mit bakteriellen Bestandteilen .....	110
3.2.16	Beeinflussung von FOXP3 und ROR $\gamma$ t durch Kultivierung mit verschiedenen bakteriellen Bestandteilen während der Th17-Polarisierung .....	112
3.2.17	Einfluss von Zellwandbestandteilen auf die Zellproliferation von Milzzellen .....	113
3.2.18	Beeinflussung der Notch-Rezeptoren durch Stimulation mit verschiedenen bakteriellen Bestandteilen .....	114
3.3	<b>BEEINFLUSSUNG DER ZYTOKINPRODUKTION VON MOG-SPEZIFISCHEN ZELLEN.....</b>	<b>116</b>
3.3.1	Einfluss von auf die Zytokinproduktion von Milzzellen aus EAE-Tieren.....	116
3.3.2	Einfluss auf die IFN- $\gamma$ und IL-17 Konzentration von Milzzellen aus EAE-Tieren .....	119
3.3.3	Einfluss auf die IL-17 Produktion von CD4 <sup>+</sup> - und CD8 <sup>+</sup> - T-Zellen aus EAE-Tieren .....	122
3.3.4	Einfluss auf die IL-17 Konzentration von CD4 <sup>+</sup> - T-Zellen und MOG-spezifischen Th17-Zellen .....	124
3.3.5	Einfluss auf die Zellproliferation von Milzzellen aus EAE-Tieren .....	125
3.3.6	Beeinflussung der Notch-Rezeptoren von Milzzellen aus EAE-Tieren.....	126
3.3.7	Einfluss auf die IL-17 Produktion von ZNS-Zellen aus EAE Tieren .....	128
<b>4.</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>132</b>
4.1	<b>EINFLUSS AUF DIE ZYTOKINPRODUKTION VON THYMUSZELLEN .....</b>	<b>132</b>
4.1.1	Bakterien .....	132
4.1.2	Zellwandbestandteile.....	135
4.1.3	Lektine.....	137
4.1.4	Imiquimod und Gardiquimod® .....	140
4.1.5	Inflammasomme .....	141

4.1.6	Zusammenfassung .....	142
4.2	EINFLUSS AUF DIE ZYTOKINPRODUKTION VON MILZZELLEN.....	143
4.2.1	Bakterien .....	144
4.2.2	Zellwandbestandteile.....	147
4.2.3	Lektine.....	150
4.2.4	Zusammenfassung.....	151
4.3	EINFLUSS AUF DIE ZYTOKINPRODUKTION VON MOG-SPEZIFISCHEN ZELLEN .....	152
4.3.1	Bakterien .....	153
4.3.2	Zellwandbestandteile.....	154
4.3.3	Lektine.....	156
4.3.4	ZNS .....	156
4.3.5	Zusammenfassung.....	157
	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>159</b>
	<b>SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG .....</b>	<b>184</b>
	<b>PUBLIKATIONSLISTE .....</b>	<b>185</b>
	<b>LEBENS LAUF .....</b>	<b>186</b>
	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>187</b>
	<b>ANHANG .....</b>	<b>188</b>
	EXPERIMENTE MIT THYMUSZELLEN .....	188
	EXPERIMENTE MIT MILZZELLEN.....	190
	EXPERIMENTE MIT EAE-MÄUSEN .....	196

## Abkürzungsverzeichnis

AAD	Aminoactinomycin
ADP	Adenosindiphosphat
AHR	Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor
AP	Alkalische Phosphatase
APC	Allophycocyanin
APZ	Antigen-präsentierende Zellen
ASC	<i>Apoptosis-associated speck-like protein containing CARD</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat
BHS	Blut-Hirn-Schranke
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
CARD	<i>caspase activation and recruitment domains</i>
CCR	<i>chemokine receptor</i>
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CFA	<i>complete Freund adjuvans</i>
CFSE	5-(6)-Carboxyfluorescein-Diazetat-Succinimidylester
ConA	Concanavalin A
CPPD	Calciumpyrophosphat-dihydrat
Ct	<i>Cycle threshold</i>
CTL	<i>cytotoxic t-lymphocytes</i>
CXCL	<i>chemokine C-X-C motif ligand</i>
DAMP	<i>danger-associated molekular pattern</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagke Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DN	doppelt negativ
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DP	doppelt positiv
DTx	Diphtherietoxin
DZ	Dendritische Zellen
EAE	Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis
EF	Elongationsfaktor
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
ELISpot	<i>Enzyme-linked Immunospot</i>

ExoA	Exotoxin A
FACS	<i>fluorescence-activated-cell-sorting</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FoxP3	<i>forkhead box P3</i>
FSC	<i>forward scatter</i>
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GM-CSF	<i>granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i>
HBSS	<i>Hanks`s Balanced Salt Solution</i>
HKG	Housekeeping-Gene
IFA	<i>incomplete Freund adjuvans</i>
IKK	IκB Kinase-Komplex
IFN	Interferon
IRAK	Interleukin-Rezeptor assoziierte Kinase
IRF	<i>interferon regulatory factor</i>
Ig	Immunoglobulin
IL	Interleukin
JAK	Janus kinase
LBP	<i>LPS-binding protein</i>
LPS	Lipopolysaccharid
LRR	<i>leucin-rich repeat</i>
LTA	Lipoteichonsäure
LTi	<i>lymphoid tissue inducer</i>
M-CSF	<i>macrophage colony-stimulating factor</i>
MACS	<i>Magnetic Activated Cell Sorting</i>
MAG	Myelin assoziiertes Glykoprotein
Mal	<i>MyD88 adaptor like</i>
MAPKK	mitogenaktivierte Proteinkinase-Kinasen
MBP	Myelinprotein
MCP	<i>monocyte chemotactic protein</i>
MIP	<i>macrophage inflammatory protein</i>
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
MMP	Matrixmetalloproteinasen
MOG	Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein
MS	Multiple Sklerose

MSU	Mononatrium-urat
MyD88	<i>Myeloid differentiation primary response gene 88</i>
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
NDB	<i>nucleotide-binding domain</i>
NGF	<i>nerve growth factor</i>
NF	<i>nuclear factor</i>
NK-Zellen	Natürliche Killer Zellen
NKT-Zellen	Natürliche Killer T-Zellen
NLR	NOD-like Rezeptoren
NOD	<i>nucleotide-binding oligomerization domain</i>
ODN	Oligodesoxynukleotide
P/S	Penicillin/Streptomycin
PAMP	<i>pathogen-associated molecular pattern</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PE	Phycoerythrin
PGN	Peptidoglycan
PGRP	<i>peptidoglycan-recognition proteins</i>
PI	Propidiumiodid
PLP	Proteolipid-Protein
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PTx	Pertussis Toxin
PRR	<i>pattern recognition receptor</i>
PS	Phosphatidylserine
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RANTES	<i>regulated on activation, normal T cell expressed and secreted</i>
RIG	<i>retinoid acid-inducible gene</i>
RLR	RIG-like Rezeptor
ROR	<i>related orphan nuclear receptor</i>
ROS	reaktive Sauerstoff-Spezies
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SARM	<i>sterile <math>\alpha</math>- and armadillo-motif-containing protein</i>

SEM	<i>standard error of the mean</i>
SP	<i>single positiv</i>
SSC	<i>side scatter</i>
STAT	<i>signal transducers and activation of transcription</i>
Th-Zellen	T-Helfer Zellen
TIR	Toll-/Interleukin-1 Rezeptor
TIRAP	<i>toll-interleukin 1 receptor domain containing adaptor protein</i>
TRAF	<i>TNF receptor associated factor</i>
TRAM	<i>TRIF-related adaptor molecule</i>
Treg-Zellen	regulatorische T-Zellen
TRIF	<i>TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-<math>\beta</math></i>
TLR	Toll-like-Rezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor
TZR	T-Zell-Rezeptor
ZNS	zentrales Nervensystem

## **Zusammenfassung**

Interleukin-17, ein pro-inflammatorisches Zytokin gilt als wichtiger Trigger von Entzündungen und Autoimmunerkrankungen. Allerdings konnten auch in gesunden Organismen IL-17 produzierende Zellen nachgewiesen werden, die eine wichtige Rolle bei der direkten Immunantwort spielen und eine unmittelbare Schutzfunktion gegenüber mikrobiellen Pathogenen ausüben. Neben den induzierbaren Th17-Zellen, konnten auch natürlich vorkommende Th17 identifiziert werden, die ihre Fähigkeit zur IL-17 Sekretion bereits während ihrer Reifung im Thymus erlangen und im Gegensatz zu naiven CD4<sup>+</sup>- T-Zellen keine weitere Differenzierung in peripheren lymphatischen Organen benötigen. Diese Zellen werden auch als Wächter des Immunsystems bezeichnet und spielen eine entscheidende Rolle bei der Abwehr von bakteriellen Infektionen und Tumoren.

Der erste Teil dieser Arbeit zeigt, dass die Zytokinsekretion von unreifen Immunzellen, insbesondere IL-17 durch eine Vielzahl von endogenen und exogenen Faktoren beeinflusst werden kann. Dabei werden nicht nur die Bakterien selbst, sondern auch die einzelnen bakteriellen Bestandteile (Zellwandbestandteile, virulente Faktoren) durch das Immunsystem erkannt, unabhängig von deren Pathogenität oder charakteristischen Eigenschaften. Neben der Erkennung über Toll-like Rezeptoren (2, 4, 5 und 7) resultierte auch die Aktivierung anderer Signalwege des Immunsystems (NOD-like Rezeptoren, NALP3 Inflammasome-Komplex, Dectin-1) in erhöhter IL-17 Sekretion. Daraus kann geschlossen werden, dass IL-17 produzierende unreife Immunzellen eine erste Instanz bei der Erkennung von Pathogen bilden, jedoch keine ersten Mechanismen der Immunabwehr sind. Vielmehr könnte eine regulatorische Funktion von IL-17 bei der Initiation von Immunantworten postuliert werden, wodurch weitere Abwehrmechanismen des angeborenen und adaptiven Immunsystems aktiviert werden, was zu einer Ausschüttung von pro- und anti-inflammatorischen Zytokinen und somit zur Entstehung von pathologischen Entzündungskrankheiten führen kann.

Der zweite Teil dieser Arbeit zeigt, dass die Stimulation mit Bakterien und bakteriellen Bestandteilen auch die Zytokinproduktion von reifen Immunzellen beeinflusst. So konnte nach Stimulation mit allen verwendeten Bakterien eine erhöhte IL-6 Sekretion nachgewiesen werden, wohingegen lediglich der Einfluss gram-positiver Bakterien eine deutlich erhöhte IFN- $\gamma$  Sekretion reifer Immunzellen zur Folge hatte. Im Gegensatz zur Immunantwort des angeborenen Immunsystems, ist die Zytokinsekretion von reifen T-Zellen überwiegend abhängig von einer zusätzlichen Aktivierung des T-Zell Rezeptors durch APZ. Zudem konnte nur ein geringer Einfluss auf isolierte CD4<sup>+</sup>- T-Zellen nachgewiesen werden. Des Weiteren führte der Einfluss von Bakterien und bakteriellen Bestandteilen zu einer gesteigerten

Zellexpansion von aktivierten Lymphozyten und einer Hemmung der Th17-Polarisierung mit vermehrter Bildung von regulatorischen T-Zellen. Die Stimulation von reifen Immunzellen mit Lektinen resultierte in einer erhöhten Sekretion von Zytokinen, insbesondere T-Zell vermittelter Zytokine wie IL-2, IL-4 und IL-17. Dabei beeinflussen die chemische Struktur bzw. die Zuckerrückstände die Affinität der Lektine zum TZR von T-Zellen.

Der dritte Teil dieser Arbeit zeigt, dass die Zytokinsekretion von antigen-spezifischen Zellen aus EAE-Mäusen mehr ausgeprägt ist im Vergleich zu reifen Immunzellen von Wildtyp-Mäusen. Insbesondere die Stimulation mit Lektinen resultierte in erhöhter IL-17 Sekretion von antigen-spezifischen CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>- T-Zellen. Zudem erfolgte die Zytokinsekretion MOG-antigen-spezifischer Milzzellen nach Kontakt mit Bakterien oder bakteriellen Bestandteilen zeitlich verzögert, jedoch kontinuierlicher im Vergleich zu Milzzellen aus Wildtyp-Mäusen.

Daraus kann geschlossen werden, dass Th17-Zellen und IL-17 lediglich eine untergeordnete Rolle bei der Entstehung von bakteriellen Infektionen und Autoimmunerkrankungen einnehmen können und das andere inflammatorische Immunantworten für septische Reaktionen des Wirtes verantwortlich sein müssen. Des Weiteren ist die Immunantwort in Folge einer bakteriellen Infektion nicht nur von dem Erreger selbst, sondern auch von der Aktivität und spezifischen Merkmalen des Immunsystems abhängig.

## Summary

Interleukin-17 is a potent inflammatory cytokine basically produced by activated memory T cells, which are called T helper (Th) 17 cells. In addition to induced IL-17-producing T cells which are primed in the immune periphery during the induction of an antigen-specific T cell response, IL-17 producing T cells are also present in the thymus of naïve wild-type mice. These cells, also referred as the sentinels of the immune system play a critical role in several fields of innate and adaptive immunity, among them immunity against microbial infection and tumors. Dysregulated IL-17 production can result in uncontrolled pro-inflammatory cytokine production and chronic inflammation, promoting tissue damage and leading to autoimmune diseases.

The first chapter of this thesis demonstrated that the cytokine secretion of immature immune cells (thymocytes), especially IL-17 can be triggered by a variety of endogenous and exogenous factors. Thereby, it is not relevant how the antigens are recognized by the immune system or whether the bacterium or bacterial compounds have pathological properties. Independently by whom TLR (2, 4, 5 or 7) the antigen was recognized or whether other immune signaling pathways were activated (NOD-like receptors, NALP3-inflammasome-komplexe or dectin-1 pathways) by bacteria or bacterial compounds, the cytokine response was enhanced. It can be concluded, that IL-17 producing immature immune cells constitute a “first line of recognition”, but not a “first line of defense” against pathogens in general. Their influence on the immune system might trigger immune activation mechanisms resulting in secretion of pro- and anti-inflammatory cytokines, but this must not necessarily lead to pathological disease conditions. Rather could be postulated that IL-17 has a regulatory function at the initiation of immune responses by activation of other defense mechanisms of the innate and adaptive immune system, the consequence being that pathological inflammatory diseases emerge.

In the second part of this work, the impact of bacteria and bacterial components on the cytokine secretion of mature immune cells could be demonstrated, which was distinctly different from immature immune cells. Activation of TLR2 or other PRRs with bacteria merely resulted in minor co-stimulating effects on mature T cells, Furthermore, the cytokine secretion of mature T cells after bacteria-contact was dependent on additional activation of the TCR via APCs. Merely a small amount of CD4<sup>+</sup> t cells were able to secrete IL-17 after contact with bacteria. Besides, stimulation with bacteria suppresses the development of Th17 cells and promotes the emergence of regulatory T cells. Interestingly, merely gram-positive bacteria triggered the secretion of IFN- $\gamma$ , whereas the Notch2-signalling pathway was

primarily activated by gram-negative bacteria, mediated by LPS on the outer membrane of the cell wall. Stimulation with AB-toxins or other lectins resulted in higher secretion of cytokines, especially T cell mediated cytokines such as IL-2, IL-4 and IL-17. The immunostimulatory effect of lectins is mediated by TCR activation whereby the chemical structure, particularly the sugar residue is critical for interacting with the TCR. Furthermore, cells of the innate immune system are involved in the defense against bacterial pathogens. This indicates that IL-17 and Th17 cells merely play a minor role in the development of pathological disease conditions after bacterial infections and that other inflammatory immune responses must be responsible for septic reactions of the host.

At least the influence on antigen-specific cytokine production of splenocytes which have already undergone priming to an auto-antigen was investigated. The cytokine secretion of MOG-antigen-specific cells was more distinct than in wild-type mice. Especially, stimulation with lectins increased the IL-17 secretion of antigen-specific CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells. In contrast to naïve CD4<sup>+</sup> T cells, stimulation with *P.aeruginosa* and lectin resulted in higher amounts of IL-17 producing MOG-specific CD4<sup>+</sup> T cells. Another interesting point is that intracellular cytokine concentrations of MOG-specific cells increased in the course of time, whereas the cytokine concentrations of wild-type splenocytes declined in frequency. Although the number of CNS-infiltrating cells increased tendentially with the clinical score of the EAE-mice, merely stimulation with lectins trigger the IL-17 secretion of brain cells.

This suggests that IL-17 and Th17 cells play a minor role in the development of pathological systemic inflammatory disease conditions during bacterial infections as well as the emergence of autoimmune diseases.

# 1. Einleitung

Ständig unterliegt der menschliche Körper gefährlichen Angriffen durch Krankheitserreger (Mikroorganismen wie Viren, Bakterien, Pilzen, Parasiten) oder anderen schädlichen Fremdstoffen. Im Laufe der Evolution hat sich das Immunsystem höherer Vertebraten zu einem komplexen System entwickelt, um unterschiedliche Pathogene oder entartete Zellen unschädlich zu machen. Generell unterscheidet man zwischen dem angeboren und dem erworbenen, adaptiven Teil des Immunsystems. Das angeborene Immunsystem umfasst neben zellulären Bestandteilen wie Granulozyten (Neutrophile, Basophile, Eosinophile), Makrophagen, natürlichen Killerzellen (NK-Zellen), dendritischen Zellen (DZ) und Mastzellen auch humorale Bestandteile wie das Komplementsystem oder Interleukine (IL) [1]. Ein wichtiger Bestandteil der angeborenen Immunität ist die Erkennung von Erregern oder körpereigenen Zellen über *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs). PAMPs sind für ein breites Spektrum an Mikroorganismen charakteristische Struktur motive, die über *pattern recognition receptors* (PRRs), wie beispielsweise Mitglieder der *Toll-like receptor* (TLR)- Familie erkannt werden [2]. Die Mechanismen der angeborenen Immunität sind die ersten nach einer Infektion eintretenden aktiven Effektorreaktionen und dienen in erster Linie dazu, die Verbreitung des Erregers zu unterdrücken, bis die Mechanismen der erworbenen Immunität einsetzen. Zum erworbenen Immunsystem gehören die B- und T-Lymphozyten, sowie deren produzierte Effektormoleküle. Während das angeborene Immunsystem Antigene über PAMPs erkennt, ist die Antigenerkennung der B- und T-Zellen hochspezifisch. Anstelle vieler verschiedener Rezeptoren, besitzen Lymphozyten nur Rezeptoren einer einzigen Spezifität. B-Zellen produzieren abhängig oder unabhängig von T-Zellen Antigen-spezifische Antikörper (Immunglobuline), die der humoralen Immunantwort zugeordnet werden. Der zellulären Immunantwort liegt eine direkte Wechselwirkung zwischen T-Lymphozyten und Antigen-präsentierenden Zellen (APZ) zugrunde und führt zu einer Aktivierung von Makrophagen, T-Helfer (Th)-Zellen, Zytotoxischen T-Zellen (CTL), NK-Zellen und polymorphkernigen Leukozyten [2-4].

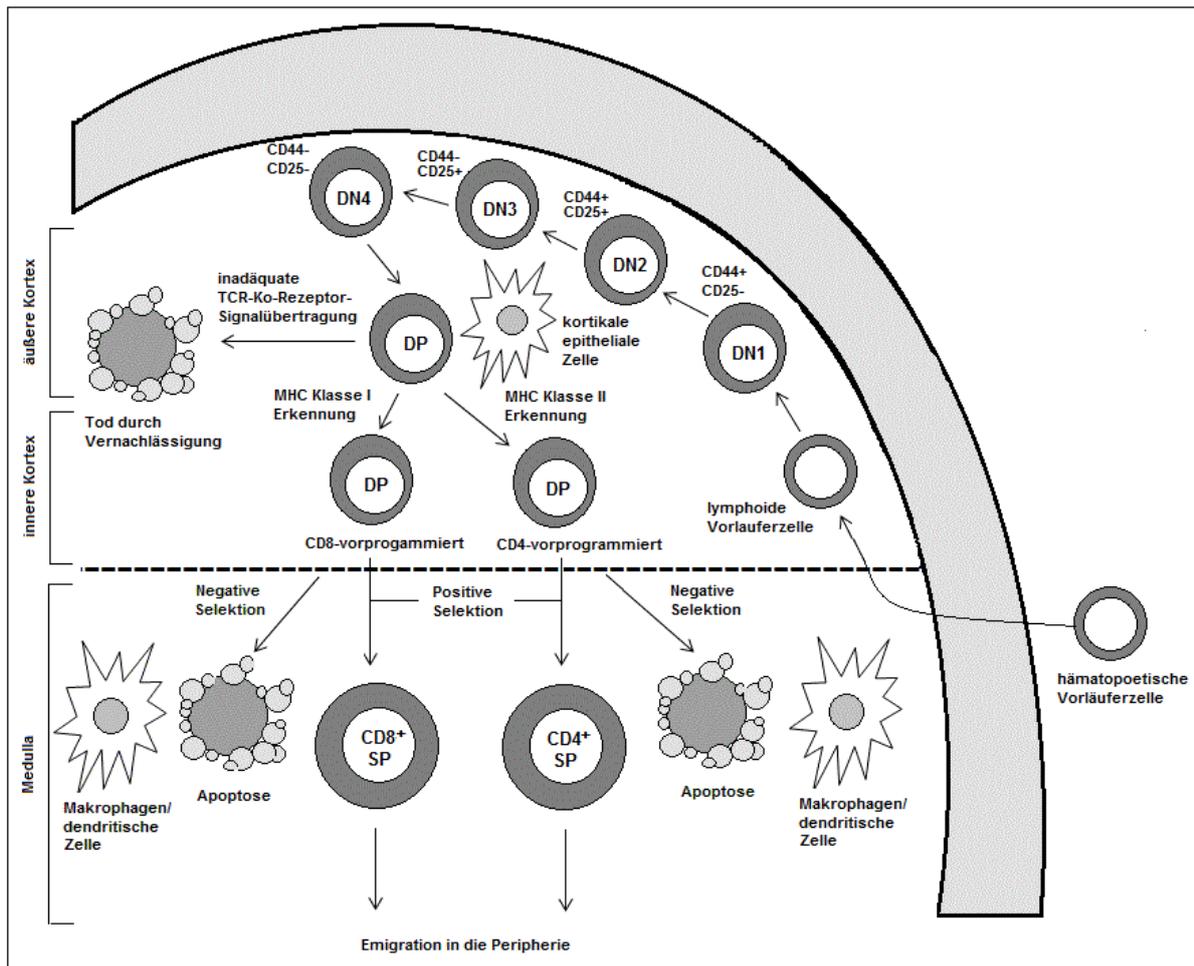
## 1.1 T-Zellentwicklung im Thymus

T-Lymphozyten sind sowohl bei der Abwehr körperfremder pathogener Keime, als auch der Erkennung und Eliminierung körpereigener entarteter Zellen von großer Bedeutung. Die Entwicklung der T-Zellen beginnt wie die der B-Zellen im Knochenmark. Während B-Zellen vollständig im Knochenmark reifen, verlassen T-Zell-Vorläufer das Knochenmark und wandern über die Blutbahn in die kortikalen Bereiche des Thymus ein. Da in diesem frühen

Entwicklungsstadium weder die charakteristischen Oberflächenmoleküle CD (*cluster of differentiation*) 3, CD4 oder CD8, noch der T-Zell-Rezeptor (TZR) vorhanden sind, werden sie auch als „doppelt negative“ (DN) Thymozyten bezeichnet [5]. Die DN-Thymozyten können anhand der Expression von CD25 (IL-2-Rezeptor- $\alpha$ -Kette) und CD44 in vier Subklassen unterschiedlichen Reifegrades unterteilt werden. Der Ablauf der Differenzierung beginnt mit dem CD44<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>-Stadium (DN1), verläuft über CD44<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (DN2) und CD44<sup>-</sup>CD25<sup>+</sup> (DN3) bis zum CD44<sup>-</sup>CD25<sup>-</sup>- Phänotyp (DN4) [6]. In einem komplexen Prozess aus Proliferation und Differenzierung entwickeln sich unreife DN-Thymozyten entweder zu T-Zellen mit einem  $\gamma\delta$ TZR oder T-Zellen mit einem  $\alpha\beta$ TZR [7]. Während der Proliferationsphase kommt es zu somatischen Rekombinationsvorgängen im TZR  $\beta$ -Kettengen. Durch Assoziation der  $\beta$ -Kette mit der prä-T $\alpha$ -Kette, kommt es zusammen mit CD3 zur Expression auf der Zelloberfläche, was die Bildung des prä-TZR-Komplexes zur Folge hat. Der prä-TZR-Komplex sendet ein Signal in die Zelle, wodurch die Umlagerung der  $\beta$ -Ketten Gene gestoppt und die der  $\alpha$ -Ketten Gene initiiert wird. Werden durch fehlerhafte Umlagerungsprozesse keine funktionellen  $\alpha\beta$ -TCR gebildet, kommt es innerhalb kurzer Zeit zur Einleitung der Apoptose der betroffenen Zellen [8, 9]. Im nächsten Differenzierungsabschnitt beginnen die unreifen DN-T-Zellen mit der Expression von den Oberflächenmolekülen CD4 und CD8. Die Differenzierung verläuft über CD4<sup>schwach</sup>CD8<sup>-</sup> - bzw. CD4<sup>-</sup>CD8<sup>schwach</sup> - Stadien zu CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> „doppelt positiven“ (DP) T-Zellen [6]. Im nächsten Schritt durchlaufen die DP-T-Zellen eine Positivselektion an den kortikalen, thymischen Epithelialzellen, die große Mengen an MHC (*major histocompatibility complex*)- Klasse I- und II- Molekülen in Assoziation mit körpereigenen Peptiden auf ihrer Zelloberfläche aufweisen. Dabei bekommen nur diejenigen DP-Thymozyten ein Überlebenssignal, die mit ihrem TZR an Selbst-Peptid-MHC-Komplexe binden können [10]. Die meisten DP-Thymozyten (ca. 90 %) exprimieren einen TZR, der nur schwach oder gar nicht mit Selbst-Peptid-MHC-Komplexen interagiert. Diese sterben innerhalb von 3-4 Tagen durch Apoptose, in diesem Zusammenhang auch mit „Tod durch Vernachlässigung“ bezeichnet [11, 12]. Abhängig davon, welche MHC-Komplexe erkannt werden, regulieren DP-Thymozyten die Expression des CD4- und CD8- Co-Rezeptors. DP-Thymozyten, die positiv MHC I selektioniert worden sind, stellen die Expression des Co-Rezeptors CD4 ein und differenzieren zu TZR $\alpha\beta$ <sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>-T-Zellen. Solche, die positiv MHC II selektioniert worden sind, differenzieren zu TZR $\alpha\beta$ <sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>-T-Zellen. In diesem „single-positiven“ (SP) Differenzierungs-stadium wandern die Thymozyten in die Medulla (Markregion des Thymus) ein und durchlaufen den letzten Selektionsschritt: die Negativselektion. Im Gegensatz zur Positivselektion, bekommen diejenigen Thymozyten ein

Signal zum Sterben, deren TZR eine zu hohe Affinität für Selbst-Peptid-MHC-Moleküle bzw. -Komplexe aufweist [5, 12, 13]. Da solche Thymuszellen potentiell autoreaktiv sind und in der Peripherie die Entstehung von Autoimmunerkrankungen fördern muss ihre Emigration in die Peripherie verhindert werden. In der Medulla des Thymus lokalisierte Makrophagen und DZ erkennen solche potentiell autoreaktiven T-Zellen und leiten die Apoptose ein. Schätzungsweise überleben nur 2% der Thymozyten den Selektionsprozess und verlassen den Thymus als naive T-Zellen [5, 14]. Der Prozess der T-Zell-Entwicklung im Thymus ist vereinfacht in Abb. 1.1 dargestellt.

In jedem Wirbeltier findet man, neben T-Zellen die den TZR $\alpha\beta$  exprimieren, auch solche, deren TZR sich aus einer  $\gamma$ - und  $\delta$ -Kette zusammensetzt. Welche Selektionsschritte diese  $\gamma\delta$ -T-Zellen im Thymus durchlaufen und welche natürlichen Liganden an den  $\gamma\delta$ TZR binden ist noch unklar. Die überwiegende Anzahl dieser Zellen befinden sich in der DN-Thymozyten Population und verlassen den Thymus als CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>-Zellen [15, 16]. Die Entstehung der  $\gamma\delta$ -T-Zellen während der Embryonalentwicklung der Maus verläuft in zwei großen Wellen. Während bei der ersten Welle vorwiegend eine Kolonisierung der Epidermis stattfindet, besiedelt die zweite Welle  $\gamma\delta$ -T-Zellen den Reproduktionstrakt [17]. In adulten Tieren trägt etwa 1-5% der T-Zellen, die durch das Blut und die peripheren Organe zirkulieren den  $\gamma\delta$ -TZR, in epithelreichen Geweben wie Haut oder Darm kann der Anteil jedoch bis zu 50% betragen [18-20]. Obwohl die Funktionen von  $\gamma\delta$ -T-Zellen bisher nur teilweise verstanden sind, deuten einige Studien auf eine wichtige regulatorische Funktion bei der angeborenen Immunabwehr hin. Reife  $\gamma\delta$ -T-Zellen können unmittelbar auf verschiedene „gefährliche“ Signale wie z.B. inflammatorische Zytokine oder PAMPs mit erhöhter Interferon (IFN)- $\gamma$  oder Interleukin IL-17 reagieren [21]. Zudem zeigten Studien an  $\gamma\delta$ TZR-defizienten Mäusen verstärkte inflammatorische Reaktionen auf bakterielle Infektionen, charakterisiert durch Nekrose von Lebergewebe, sekundäre Entzündungen oder Herabregulation der Makrophagenaktivität [22-24]. In einem Tiermodell der Multiplen Sklerose konnten für  $\gamma\delta$ -T-Zellen sowohl pathogene, als auch schützende und regulatorische Funktionen nachgewiesen werden [25]. Ähnlich wie  $\gamma\delta$ -T-Zellen werden auch NKT-Zellen häufig als Regulatoren von angeborenem und adaptivem Immunsystem bezeichnet. NKT-Zellen sind eine heterogene Untergruppe der T-Zellen, die einen  $\alpha\beta$ TZR mit sehr eingeschränkter Variabilität besitzen. NKT-Zellen entstehen im Thymus aus DP-Thymozyten durch Bindung mit ihrem  $\alpha\beta$ TZR an CD1, einem MHC-I ähnlichem Molekül, das keine Peptide, sondern Lipid- oder Glykolipidbausteine präsentiert. Die charakteristische Funktion von NKT-Zellen nach Bindung eines mykobakteriellen Lipides ist die rasche Bildung von Zytokinen wie IL-4,



**Abb. 1.1: T-Zell Entwicklung im Thymus.** Hämatopoetische Vorläuferzellen wandern aus dem Knochenmark in die kortikalen Bereiche des Thymus ein. In diesem Reifestadium exprimieren die DN-Thymozyten weder einen TZR, noch die Oberflächenmoleküle CD4 und CD8. Die DN-Thymozyten können in vier Subklassen unterschiedlichen Reifegrades unterteilt werden: CD44<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> (DN1), CD44<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (DN2), CD44<sup>-</sup>CD25<sup>+</sup> (DN3) und CD44<sup>-</sup>CD25<sup>-</sup> (DN4). Nach erfolgreicher Rekombination der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Kettengene exprimieren die DN-T-Zellen die Oberflächenmarker CD4 und CD8 und differenzieren zu DP-T-Zellen. Bei der Positivselektion bekommen nur diejenigen DP-Thymozyten ein Überlebenssignal, die mit ihrem TZR an Selbst-Peptid-MHC-Komplexe binden können. Die Negativselektion beseitigt potentiell autoreaktive T-Zellen die mit hoher Affinität mit einem Selbstpeptid binden. Thymozyten, die beide Selektionsschritte überlebt haben emigrieren als SP CD4<sup>+</sup>- oder CD8<sup>+</sup>- T-Zellen aus dem Thymus in die Peripherie (modifiziert nach Germain, 2002).

IFN- $\gamma$  und Tumornekrosefaktor (TNF) - $\alpha$ . Dadurch kommt den NKT-Zellen eine bedeutende Rolle bei Immunantworten gegen Tumoren und infektiösen Erregern, sowie bei der Regulation von Autoimmunität zu [26-28].

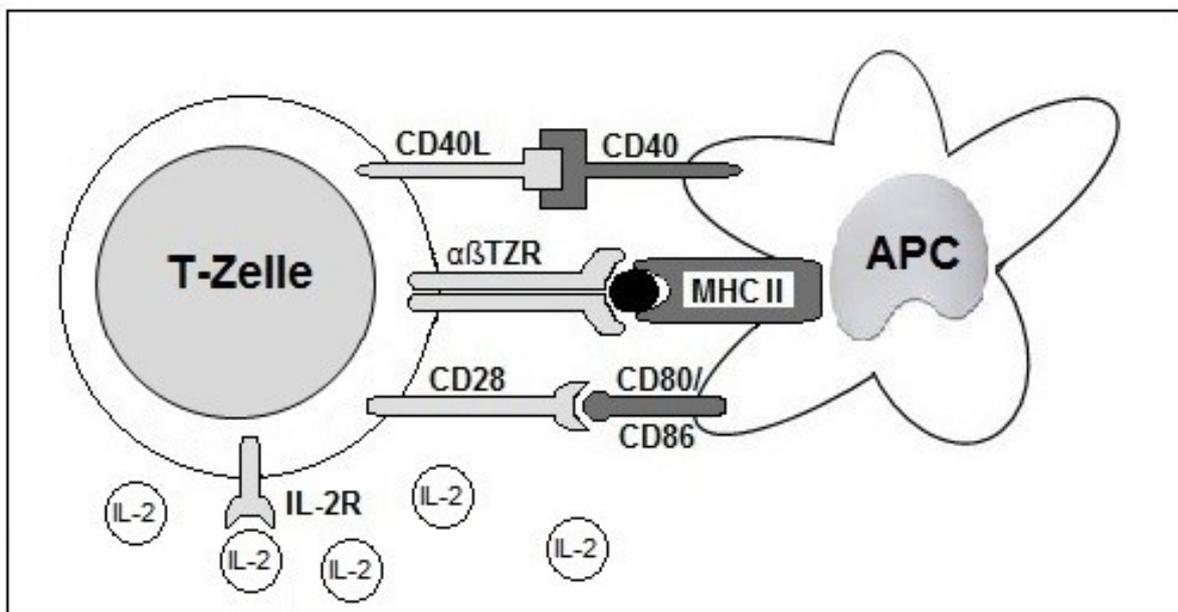
Eine weitere in sich differenzierte Subpopulation des Thymus sind die regulatorischen T-Zellen (Treg). Diese TZR $\alpha\beta^+$ CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>CD25<sup>+</sup>-T-Zellen können Immunreaktionen durch Sekretion von Zytokinen oder direkte Zell-Zell-Kontakte modulieren und besitzen somit eine wichtige Funktion für die Aufrechterhaltung der peripheren Toleranz [29]. Unter der peripheren Toleranz werden Mechanismen verstanden, die dazu führen, dass bei T-Zellen, die

in der Peripherie Selbstantigene erkennen die Apoptose eingeleitet wird und somit körpereigene Strukturen nicht zum Angriffsziel des Immunsystems werden können [30]. Natürliche Treg, die während der T-Zelldifferenzierung im Thymus entstehen besitzen als charakteristischen Marker CD25 (IL-2R $\alpha$ ) auf ihrer Zelloberfläche und exprimieren den Transkriptionsfaktor *forkhead box P3* (FOXP3). Solche die im Zuge der T-Zellentwicklung in der Peripherie gebildet werden, werden induzierte Treg (iTreg) bezeichnet. Mittlerweile werden die regulatorischen T-Zellen bereits in vier Subklassen untergliedert: Tr1-Zellen und Th3-Zellen (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>FOXP3<sup>-</sup>), sowie CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-Treg-Zellen (CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup>) [31, 32]. In Mausmodellen konnte zudem gezeigt werden, dass eine Depletion von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg-Zellen die Entstehung von autoimmunen Erkrankungen fördern kann [33, 34].

## 1.2 Aktivierung von naiven T-Zellen

Nach der Entwicklung im Thymus gelangen die naiven T-Zellen in den Blutkreislauf und zirkulieren immer wieder durch die peripheren Lymphorgane (Milz, Lymphknoten, Tonsillen, Peyersche Plaques und Mukosa-assoziiertes Lymphgewebe) [35]. Naive, reife T-Zellen erkennen spezifisch körperfremde Peptidsequenzen, die von körpereigenen MHC-Molekülen präsentiert werden. Zu den APZ gehören vor allem DZ, Monozyten, Makrophagen und B-Lymphozyten. Dabei gelten DZ als die wichtigste, möglicherweise sogar als die einzige Zellpopulation der APZ, die eine primäre Immunantwort durch Aktivierung naiver T-Zellen induzieren kann [36]. Die Aktivierung von naiven CD4<sup>+</sup>-T-Zellen erfolgt über mehrere Signale. Durch die Bindung des TZR an den spezifischen MHC-II-Peptid-Komplex auf der Zelloberfläche der DZ wird das erste Signal initiiert [37]. Der TZR liegt nichtkovalent assoziiert mit CD3 und zwei  $\zeta$  (Zeta) Polypeptiden vor. Kommt es zu einer antigenspezifischen Bindung des TZR wird ein Signal über CD3 und Zeta in die T-Zelle übertragen, woraufhin eine Signaltransduktionskaskade eingeleitet wird, die zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren (*nuclear factor* (NF) - $\kappa$ B) und zur Transkription von Zytokin RNAs führen kann [38, 39]. Zusätzlich zu dieser Antigenbindung werden zur kompletten Aktivierung einer T-Zelle noch weitere kostimulatorische Signale benötigt, welche von derselben APZ, auf der die T-Zelle ihr Antigen erkennt, kommen müssen [40]. Durch den Kontakt der DZ mit dem Antigen wird ein physiologischer Reifungsprozess initiiert, der die Expression von Oberflächenmolekülen wie MHC Klasse II, CD40, CD80 (B7-1) oder CD86 (B7-2) auslöst. Als reife DZ verfügen sie nun auch über das Potential, naive T-Zellen aktivieren zu können [41]. Der bislang am besten charakterisierte kostimulatorische Weg ist die Interaktion von Mitgliedern von B7 Familie (DZ) mit Mitgliedern der CD28 Familie (T-

Zellen). Erhält eine naive  $CD4^+$ -T-Zelle ein Signal über die Bindung ihres CD28 Rezeptors an B7, kommt es zur Expression von IL-2 und der IL-2-Rezeptor *alpha*-Kette (IL-2R $\alpha$ -Kette). Durch Bindung von IL-2 an seinen hochaffinen Rezeptor beginnen T-Zellen die klonale Expansion, womit sich die Anzahl zuvor seltener antigenspezifischer T-Zellen rasant erhöht [42, 43]. Ein weiteres wichtiges Molekül auf der Zelloberfläche von aktivierten  $CD4^+$ -T-Zellen ist der CD40 Ligand (CD40L). Der Rezeptor von CD40L, CD40 wird vor allem von DZ, B-Zellen, Monozyten und Makrophagen sowie weiteren Zelltypen exprimiert. Eine Interaktion von CD40L und CD40 führt zu einer Aktivierung von DZ, was wiederum zu einer verstärkten Expression kostimulatorischer Moleküle und erhöhter Sekretion von Zytokinen führt [44]. Die Aktivierung von T-Zellen durch APZ ist in Abb. 1.2 vereinfacht schematisch dargestellt.



**Abb.1.2: Aktivierung naiver  $CD4^+$ -T-Zellen.** Die Aktivierung naiver  $CD4^+$ -T-Zellen verläuft über zwei Signale: das erste Signal über die antigenspezifische Bindung des  $\alpha\beta$ -TZR an den MHC-II-Peptid Komplex; das zweite, kostimulatorische Signal über die Interaktion von CD80/CD86 mit CD28. Erhält eine naive  $CD4^+$ -T-Zelle ein Signal über die Bindung ihres CD28 Rezeptors an CD80/86 kommt es zur Expression der IL-2R $\alpha$ -Kette und IL-2. Durch Bindung von IL-2 an seinen hochaffinen Rezeptor beginnen T-Zellen die klonale Expansion. Die Interaktion von CD40L naiver  $CD4^+$ -T-Zellen mit CD40 aktiviert die dendritische Zelle, die darauf die Expression kostimulatorischer Moleküle und Zytokine hochreguliert.

$CD4^+$ -T-Zellen, die nach ihrer Aktivierung den CD40L exprimieren, werden als T-Helferzellen bezeichnet. Ebenso wie  $CD4^+$ -T-Zellen, können auch  $CD8^+$ -T-Zellen nur von DZ aktiviert werden. Dabei stellt die Bindung des  $\alpha\beta$ TZR von  $CD8^+$ -T-Zellen mit dem Selbst-Peptid MHC-I-Komplex von DZ das erste Signal der Aktivierung dar [45]. Im Gegensatz zu naiven  $CD4^+$ -T-Zellen führt dieses Signal bei  $CD8^+$ -T-Zellen nicht zur Expression des

CD40L, wodurch sie auch nicht in der Lage sind, andere DZ zu aktivieren. Da jedoch das zweite Signal eine Aktivierung von DZ voraussetzt, können CD8<sup>+</sup>-T-Zellen nur durch Hilfe von Th-Zellen aktiviert werden, es sei denn, es kommt im Zuge der Infektion zu zusätzlicher Stimulation von DZ, zum Beispiel über TLR [46]. Nach der Aktivierung differenzieren CD8<sup>+</sup>-T-Zellen zu CTL und können somit im Falle einer akuten Infektion, infizierte Zellen durch induzierte Apoptose unschädlich machen. Neben der Elimination der befallenen Zielzellen schütten CTL insbesondere TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  aus, was letztendlich zu einer erhöhten Produktion von MHC-Klasse I Molekülen in benachbarten Zellen führt [46, 47].

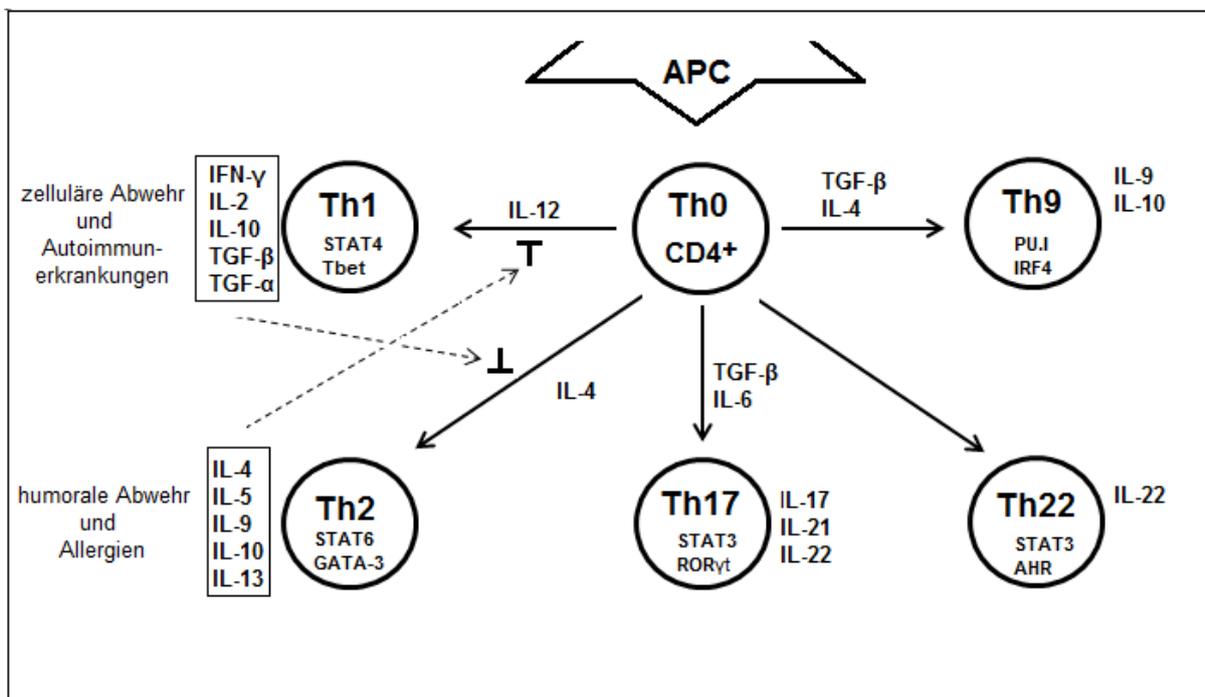
### 1.3 T-Helferzellen

Th-Zellen sind CD4<sup>+</sup>-T-Zellen, die wichtige Funktionen für die Steuerung und Koordination des Immunsystems übernehmen. Die Unterteilung der aktivierten Th-Zellen erfolgt im Wesentlichen anhand ihrer sezernierten Zytokine. Naive CD4<sup>+</sup>-T-Zellen, die noch keinen Kontakt mit einem Antigen hatten, werden auch Th0-Zellen bezeichnet. Aus diesen Th0-Vorläuferzellen entwickeln sich nach Antigen-Aktivierung in Abhängigkeit der Zytokin-Umgebung verschiedene Th-Zellen [48]. Die Differenzierung von naiven CD4<sup>+</sup>-T-Zellen ist vereinfacht in Abb. 1.3 dargestellt.

Die Th1-Differenzierung wird durch die Anwesenheit von IL-12 induziert, welches überwiegend von Monozyten und Makrophagen produziert wird [49]. Th1-Zellen setzen als wichtigstes Zytokin Interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ) frei, das neben antibakteriellen und antiviralen Effekten, einen potenten Makrophagenaktivator darstellt und zusammen mit IL-2 die Reifung von zytotoxischen T-Zellen zur Bekämpfung intrazellulärer Erreger unterstützt [50-52]. Des Weiteren führt IFN- $\gamma$  zu einer Induktion der Transkriptionsfaktoren Tbet und *signal transducers and activations of transcription-4* (STAT4), die zusammen mit IL-12 die Th1-Enddifferenzierung begünstigen [51, 53, 54]. Auch B-Zellen werden durch IFN- $\gamma$  stimuliert, was eine Produktion von Immunglobulinen (Ig) G 1-3 zur Folge hat [55]. Neben IFN- $\gamma$  produzieren Th1-Zellen insbesondere IL-2, IL-10, TNF- $\alpha$  und TNF- $\beta$  [51]. Während eine Differenzierung von Th1-Zellen durch die Zytokine IFN- $\gamma$ , IL-12 und IL-18 begünstigt wird, inhibieren Th1-Zytokine die Differenzierung von Th2-Zellen [48].

Im Gegensatz zu Th1-Zellen, deren sezernierte Zytokine die zelluläre Immunantwort unterstützen, wirken sich Zytokine von Th2-Zellen stärker auf das humorale Immunsystem aus [50, 56]. Neben STAT6 exprimieren Th2-Zellen den für sie spezifischen Transkriptionsfaktor GATA-3 (bindet an die Nukleotidfolge GATA) [57]. Th2-Zellen, deren Differenzierung durch IL-4 initiiert wird, sind durch die Sekretion von IL-4, IL-5, IL-9, IL-10

und IL-13 charakterisiert [50]. IL-4 hat eine wesentliche immunregulatorische Eigenschaft. Die Ausschüttung von IL-4 führt zur Bildung von IgE Antikörpern. Diese können über Bindung an Fc-Rezeptoren Mastzellen oder basophile und eosinophile Granulozyten aktivieren und spielen somit bei der Abwehr von Helmintheninfektionen und Allergien vom Soforttyp eine zentrale Rolle [58, 59]. IL-5 fördert die Differenzierung von Eosinophilen im Knochenmark und fördert einen Klassenwechsel von B-Zellen zu IgE [60]. Zusätzlich führen die von Th2-Zellen sezernierten Zytokine zur Inhibition der Th1-Differenzierung und hemmen somit die Ausschüttung pro-inflammatorischer Th1-Zytokine [50, 61].



**Abbildung 1.3: Differenzierung von naiven CD4<sup>+</sup>-T-Zellen.** Naive CD4<sup>+</sup>-T-Zellen (Th0) differenzieren nach Antigen-Aktivierung in Abhängigkeit der Zytokin-Umgebung zu verschiedenen Subpopulationen von Th-Zellen. IL-12, IFN- $\gamma$  und IL-4 aktivieren unterschiedliche Transkriptionsfaktoren und induzieren die Differenzierung zu Th1 oder Th2-Zellen mit jeweils spezifischem Zytokinexpressionsmuster. Die jeweiligen Zytokine von Th1- und Th2-Zellen hemmen sich gegenseitig. Th17-Zellen sezernieren überwiegend IL-17, IL-21 und IL-22, der Induktionsmechanismus der Differenzierung wird durch TGF- $\beta$  und IL-6 gesteuert. Th9-Zellen benötigen zur Differenzierung IL-4 und TGF- $\beta$  und produzieren als Effektorzellen IL-9 und IL-10.

Th9-Zellen sezernieren vorwiegend IL-9 und IL-10 (nur Maus), wobei ihre Differenzierung aus naiven CD4<sup>+</sup>-T-Zellen entscheidend von TGF- $\beta$  und IL-4 abhängig ist [62]. Neben PU.1 konnte mit *interferon regulatory factor* (IRF) 4 ein weiterer entscheidender Faktor für die Th9-Differenzierung identifiziert werden [63]. Da IL-9 die Expansion von Mastzellen und anderen lymphoiden Zellpopulation fördert, kann davon ausgegangen werden, dass Th9-Zellen in der Lage sind Entzündungsreaktionen und Immunantworten zu beeinflussen [62, 64]. Zudem haben Th9-Zellen möglicherweise eine besondere Bedeutung bei der Entstehung

von Autoimmunerkrankungen. So konnte in einem Tiermodell der Multiple Sklerose gezeigt werden, dass der Transfer von Th9-Zellen eine Progression der Erkrankung zur Folge hatte [65].

Th17-Zellen spielen sowohl eine wichtige Rolle bei der Abwehr gegen extrazelluläre Bakterien und Pilze, als auch bei der Immunpathologie von chronisch inflammatorischen Autoimmunerkrankungen [66, 67]. Besonderes Merkmal der Th17-Zellen ist die Produktion von IL-17A und IL-17F, wobei in neuesten Studien auch die Sekretion von IL-21 und IL-22 durch Th17-Zellen beobachtet werden konnte [68, 69]. Bei der Generierung und Differenzierung von Th17-Zellen sind vorwiegend die Zytokine IL-6 und TGF- $\beta$  beteiligt [66]. Während für IL-6 in erster Linie pro-inflammatorische Effekte nachgewiesen werden konnten (z.B. Induktion von Fieber und Synthese der Akute-Phase-Proteine in der Leber), kann TGF- $\beta$  neben pro- auch anti-inflammatorische Effekte vermitteln [70, 71]. Des Weiteren induziert IL-6 in naiven CD4<sup>+</sup>-T-Zellen die Phosphorylierung von STAT3, was den initialen Schritt der Th17-Differenzierung darstellt [72]. Th17-Zellen exprimieren den für sie spezifischen Transkriptionsfaktor *related orphan nuclear receptor* (ROR)  $\gamma$ t und ROR $\alpha$ , die im Verlauf der Th17-Differenzierung zusammen mit STAT3 die Sekretion von IL-21 induzieren [66, 73]. Auch IL-23 fördert die Aktivierung und Differenzierung von Th17-Zellen und führt somit zu einer verstärkten Bildung pro-inflammatorischer Zytokine wie IL-17 und IL-22 [74]. Nach heutigem Stand der Forschung sind gegenläufige Funktionen im menschlichen Immunsystem für Th17-Zellen bekannt. Zum einen wirken Th17-Zellen pro-inflammatorisch durch die Rekrutierung und Aktivierung von Neutrophilen bzw. Chemokin- und Zytokinproduktion, andererseits konnte eine protektive Rolle bei bakteriellen Infektionen nachgewiesen werden [75-77].

Th22-Zellen sind eine bisher wenig erforschte Subpopulation von Th-Zellen und primär durch IL-22 charakterisiert. Neben dem Transkriptionsfaktor STAT3 begünstigt besonders der Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor (AHR) die Th22-Differenzierung [78]. Th22-Zellen können den Körper vor Entzündungen schützen und die Wundheilung beeinflussen. Erstmals konnten sie in Patienten mit Psoriasis, atopischem Ekzem und allergischer Kontakt-Dermatitis identifiziert werden und sollen das Potential besitzen, die Barriere der Haut und möglicherweise auch der Lunge durch Anregung der Kollagenproduktion zu stärken [78-80].

Nach Beseitigung der Infektion wird für die meisten T-Effektorzellen die Apoptose eingeleitet (negative Rückkopplung) [81]. Einige bleiben allerdings erhalten und differenzieren zu T-Gedächtniszellen. Diese T-Zell-Subpopulationen sind Teil des immunologischen Gedächtnisses und brauchen bei einem zweiten Kontakt mit ihrem spezifischen Antigen nicht

mehr durch DZ aktiviert zu werden [82, 83]. Dadurch kann das Immunsystem z.B. durch direkte Aktivierung von B-Zellen und Makrophagen schneller und effektiver auf bereits bekannte Krankheitserreger reagieren. CD4<sup>+</sup>-T-Gedächtniszellen können anhand der Expression des Chemokinrezeptors CCR7 in zwei Untergruppen aufgeteilt werden: Effektor-Gedächtniszellen (CCR7<sup>low</sup>) und zentrale Gedächtniszellen (CCR7<sup>high</sup>) [84].

## 1.4 Zytokine

Als Zytokine wird eine Gruppe von Proteinen oder Glykoproteinen bezeichnet, die zur Immunmodulation, sowie zur Regulation entzündlicher Prozesse gebildet werden. Grundsätzlich können Zytokine unterteilt werden in Interferone (IFN- $\gamma$ , IFN- $\beta$ , IFN- $\alpha$ ), Interleukine IL-1 bis IL-32), koloniestimulierende Faktoren (M-CSF, GM-CSF), Tumornekrosefaktoren (TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$ ), Wachstumsfaktoren (NGF, EGF) und Chemokine (RANTES, MCP-1, MIP-1 $\alpha$ ). Des Weiteren werden pro-inflammatorische Zytokine wie z.B. IFN- $\gamma$ , IL-1 $\alpha/\beta$ , IL-6, IL-8, IL-12, IL-17, IL-23 und TNF $\alpha$  von den anti-inflammatorischen Zytokinen wie z.B. dem IL-1-Rezeptorantagonisten, IL-4, IL-10, IL-11 und TGF- $\beta$  unterschieden [85-88].

Interferone werden als körpereigene Gewebshormone, vor allem von Leukozyten und Fibroblasten gebildet und entfalten eine immunstimulierende, antivirale und antitumorale Wirkung. IFN- $\gamma$  wird überwiegend von T-Lymphozyten und NK-Zellen gebildet und ist durch Induktion von MHC-I und MHC-II-Komplexen in der Lage Makrophagen und andere T-Lymphozyten zu aktivieren, wirkt jedoch nicht antiviral [89, 90]. Interleukine sind körpereigene Botenstoffe und dienen der Kommunikation der Immunabwehrzellen untereinander, um so effektiv und koordiniert Krankheitserreger bekämpfen zu können [91]. Tab. 1.1 gibt einen Überblick über die für diese Arbeit relevanten Interleukine und deren Funktionen.

**Tab. 1.1: Ausgewählte Zytokine und deren Funktionen**

<b>Zytokin</b>	<b>Funktionen</b>	<b>Quelle</b>
IL-1	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Zentraler Mediator bei der Auslösung und Modulation von Entzündungsreaktionen</li> <li>- Kostimulus für Wachstum und Aktivierung von T-Zellen</li> <li>- Fördert die Antikörper-Sekretion</li> <li>- Aktivierung von neutrophilen Granulozyten</li> </ul>	[91-93]
IL-2	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Stimuliert Wachstum und Reifung von T-Zellen</li> <li>- Aktivierung und Förderung der Proliferation von NK-Zellen</li> <li>- Förderung des Wachstums und Differenzierung von B-Zellen</li> </ul>	[43, 94, 95]
IL-4	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Förderung der Differenzierung und Proliferation von B-Zellen in IgG- und IgE-produzierende Plasmazellen</li> </ul>	[58, 96]
IL-5	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Stimuliert das Wachstum von B-Zellen und fördert die Antikörper-Sekretion</li> <li>- Aktivierung von eosinophilen Granulozyten</li> </ul>	[60, 97, 98]
IL-6	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Fördert die Reifung von Leukozyten</li> <li>- Regulation der Differenzierung von B-Zellen zu Antikörperproduzierenden Plasmazellen</li> <li>- Wachstumsfaktor für Keratinozyten und Mesangiumzellen</li> <li>- Induziert die Synthese von Akute-Phasen Proteinen in der Leber</li> </ul>	[99-102]

## **1.5 Interleukin-17**

IL-17 bildet eine Familie von pro-inflammatorischen Zytokinen IL-17A-F, wobei IL-17A und IL-17F die größte Homologie zueinander besitzen. Beide Proteine verfügen über eine 50%ig identische Aminosäuresequenz [103]. Der Fokus dieser Arbeit liegt auf IL-17A, weshalb im weiteren Verlauf IL-17A als IL-17 bezeichnet wird. IL-17 wird hauptsächlich von Th17-Zellen produziert, allerdings kann es auch von NK-Zellen,  $\gamma\delta$ T-Zellen, CD8<sup>+</sup>-T-Zellen, Granulozyten und *lymphoid tissue inducer* (LTi) Zellen gebildet werden [104]. Die Familie der IL-17 Rezeptoren setzt sich zusammen aus den Rezeptoren IL-17R A-E. Der IL-17-Rezeptor wird von myeloiden Zellen, B- und T-Lymphozyten, Epithel- und Endothelzellen sowie von Fibroblasten exprimiert [105]. Nachdem IL-17 an den Rezeptor gebunden hat, können zwei verschiedene intrazelluläre Signalwege aktiviert werden. Ein Signalweg führt über das Adapterprotein Act1 und die Transkriptionsfaktoren TRAF (*TNF receptor*

*associated factor*) 3 und TRAF6 zu einer Aktivierung von NF- $\kappa$ B. Ein weiterer Signalweg führt Act-1 unabhängig über JAK (Janus Kinase) 1 zu erhöhter Genexpression [106-108].

IL-17 wird vorwiegend mit Entzündungs- und Autoimmunerkrankungen in Verbindung gebracht. In Studien konnte gezeigt werden, dass Th17-Zellen und IL-17 eine entscheidende Rolle für die Induktion der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE), ein Mausmodell für Multiple Sklerose spielen. Untersuchungen an IL-17 Knock-out Mäusen oder die Behandlung von EAE-Mäusen mit anti-IL-17-Antikörper führten zu einer Reduzierung der klinischen Symptome [109-112]. Des Weiteren konnte in der Maus eine verstärkte Ausschüttung der Chemokine CXCL (*chemokine C-X-C motif ligand*)1, CXCL2 und CXCL5 sowie GM-CSF durch IL-17 beobachtet werden, was eine erhöhten Proliferation und Reifung von neutrophilen Granulozyten zur Folge hat [113, 114].

## 1.6 Pattern-recognition Rezeptoren

Das angeborene Immunsystem verfügt nur über eine limitierte Anzahl von Rezeptoren, die PAMPs von Pathogenen erkennen. Zu diesen Rezeptoren gehören insbesondere die PRRs aus der Familie der TLR (Toll-like Rezeptoren), die NOD (*nucleotide-binding oligomerization domain*)-like Rezeptoren (NLR) und RIG (*retinoid acid-inducible gene*) -I-like Rezeptoren (RLR) [2]. Die Unterteilung der PRRs kann gemäß ihrer zellulären Lokalisation in drei Klassen erfolgen (membranständige, intrazelluläre und sekretorische), praktikabler erscheint jedoch eine Unterteilung in funktionelle Klassen: opsonisierende, phagozytische und instruktiv/ signalgebende PRRs [115, 116]. Opsonisierende PRRs sind lösliche Rezeptoren, welche mikrobielle Pathogene oder ganze Zellen erkennen und durch Bindung deren Phagozytose einleiten [117]. Phagozytierende PRRs sind Plasmaproteine, teils mit signalgebender zytoplasmatischer Domäne, die an der Internalisierung von Mikroben oder mikrobieller Komponenten beteiligt sind. Dieser Familie zuzuordnen sind C-Typ Lektine, Scavenger Rezeptoren und Integrine. Während C-Typ Lektin- und Scavenger-Rezeptoren die Internalisierung von Pathogenen erleichtern und somit Immunantworten initiieren, zeigen Integrine überwiegend ausgeprägte phagozytische Funktionen [118, 119]. Im Gegensatz dazu sind instruktive-/ signalgebende PRRs dazu befähigt, kostimulatorische Signale in APZ auszulösen und dadurch deren Fähigkeit zur T-Zell-Aktivierung zu regulieren und protektive Immunantworten durch Ausschüttung von Zytokinen in Gang zu setzen. Neben der membranständigen TLR-Familie, gehören zu dieser Gruppe auch die zytoplasmatischen NLR [2, 120].

TLR gehören zu den wichtigsten Proteinen der angeborenen Immunität und werden auf verschiedenen Zelltypen des Immunsystems exprimiert. Während viele Zellen nur bestimmte TLR exprimieren, finden sich auf Makrophagen, DZ und Neutrophilen nahezu alle TLR [2]. Nach einer Aktivierung von TLR auf Zellen des mononukleären Phagozytensystems kommt durch Aktivierung verschiedener Transkriptionsfaktoren, wie NF- $\kappa$ B, AP (*activator protein*)-1 und IRF3 zu einer Ausschüttung verschiedener Zytokine wie IL-1, IL-6, IL-8, IL-12 und TNF- $\alpha$ , welche dann die Rekrutierung weiterer Immunzellen bewirken und eine humorale Immunantwort auslösen [121, 122]. TLR gehören der Gruppe der Typ-1 Transmembranproteine an, d.h. sie besitzen eine extrazelluläre LRR (*leucine-rich repeat*) Sequenz und eine konservierte intrazelluläre Toll-/Interleukin-1 Rezeptor (TIR) Domäne. Bis dato sind 13 funktionell aktive murine sowie 11 humane TLR beschrieben, wobei jeder Rezeptor spezifische PAMPs und deren synthetische Analoga als exogene Liganden erkennt. Die meisten TLR befinden sich an der Zelloberfläche, jedoch können TLR3, TLR7, TLR8 und TLR9 auch membranständig in intrazellulären Kompartimenten wie dem Endosom vorkommen [2, 123].

Die TLR erkennen verschiedene funktionelle Komponenten von Viren, Bakterien und Pilzen und führen durch Aktivierung biochemischer Reaktionskaskaden zur Abwehr des Krankheitserregers. So gilt der TLR4 aufgrund verschiedener Untersuchungen als wesentlicher physiologischer Rezeptor von Lipopolysaccharid (LPS), einem Zellwandbestandteil gramnegativer Bakterien. Der TLR2 hingegen ist dazu befähigt, verschiedene Bestandteile der bakteriellen Zellwand, wie Peptidoglycane (PGN), Lipoteichonsäuren (LTA) und Diacylierte Lipopeptide zu erkennen. Die im Zellinnern vorkommenden TLR dienen in erster Linie der Erkennung von aus Viren oder Bakterien stammenden Nukleinsäuren, wie dsRNA (TLR3), ssRNA (TLR7) oder CpG ODN (Oligodesoxynukleotid) (TLR9) [2, 124]. Einen Überblick über die TLR mit Beispielen für identifizierte Liganden gibt Tab. 1.2.

Die durch PAMPs ausgelöste Signaltransduktion des TLR-System wird durch Interaktion der TIR-Domäne mit intrazellulären Adaptermolekülen, die ebenfalls TIR-Domänen aufweisen initiiert. Bislang konnten fünf solcher Adaptermoleküle identifiziert werden: MyD88, (*Myeloid differentiation primary response gene 88*), Mal (*MyD88 adaptor like*), TIRAP (*toll-interleukin 1 receptor domain containing adaptor protein*), TRIF (*TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- $\beta$* ), TRAM (*TRIF-related adaptor molecule*) und der negative Regulator SARM (*sterile  $\alpha$ - and armadillo-motif-containing protein*) [125]. Die verschiedenen TLR unterscheiden sich hinsichtlich der Verwendung der einzelnen Adaptermoleküle.

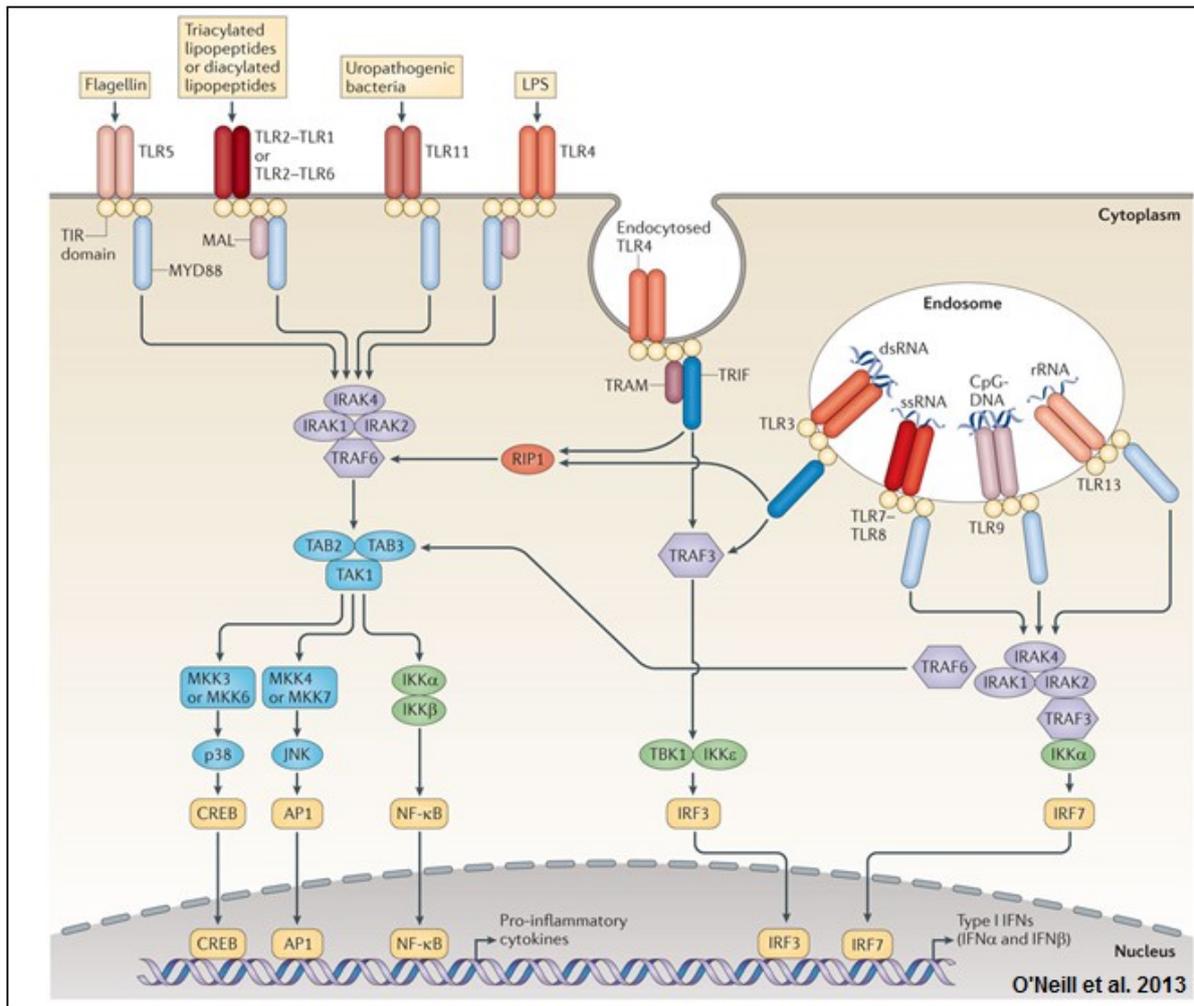
**Tabelle 1.2: Übersicht charakteristischer Toll-like Rezeptoren**

<b>Rezeptor</b>	<b>PAMPs (Liganden)</b>	<b>Vorkommen</b>	<b>Lokalisation</b>	<b>Adapter</b>
TLR1 (+TLR2)	Triacylierte Lipopeptide PAM <sub>2</sub> CSK <sub>4</sub>	Bakterien-Zellwand Synthetisches Analog	Oberfläche	MyD88 TIRAP
TLR2	Peptidoglykan (PGN) Diacylierte Lipopeptide Lipoteichonsäure (LTA)	Bakterien-Zellwand Bakterien-Zellwand Bakterien-Zellwand	Oberfläche	MyD88 TIRAP
TLR2/ Dectin	Zymosan	Zellwand von Pilzen/ Hefen	Oberfläche	MyD88 TIRAP
TLR3	Doppelsträngige RNA Poly (I:C)	Viren Synthetisches Analog	Intrazellulär	Trif
TLR4	Lipopolysaccharid Hyaluronsäure Hsp60 Taxol	Bakterien-Zellwand Bindegewebe Mitochondrien Synthetisches Analog	Oberfläche Golgi	MyD88 TIRAP Trif TRAM
TLR5	Flagellin	gram-negative Bakterien	Oberfläche	MyD88
TLR7	einzelsträngige RNA Guanosinanaloga (Imi- und Gardiquimod)	Viren Synthetische Analoga	Endosomal	MyD88
TLR8	einzelsträngige RNA	Viren	Endosomal	MyD88
TLR9	CpG DNA, CpG ODNs	Bakterien, Viren	Endosomal Oberfläche	MyD88
TLR10 (human)	Nicht bekannt	Nicht bekannt	Oberfläche	MyD88
TLR11	Profilin	urpathogene E.coli Toxoplasma gondii	Murines Urothel	MyD88
TLR13 (murin)	ORN Sa19	S.aureus A2085	Urothel	MyD88

Im Allgemeinen unterscheidet man in der TLR-Signalkaskade zwischen einem MyD88-abhängigen Weg, den alle TLR-Mitglieder außer TLR3 nutzen, und einem MyD88-unabhängigen Weg, über den nur wenige TLR Signale vermitteln. MyD88-abhängig kommt es zunächst zu einer Bindung von IRAK4 (Interleukin-Rezeptor assoziierte Kinase 4) an MyD88, was zur Phosphorylierung von IRAK1 führt. Daraus resultiert eine Komplexierung von IRAK1 und IRAK4 mit TRAF6, was wiederum zu einer Aktivierung des I $\kappa$ B (*inhibitory  $\kappa$ B*)- Kinase-Komplex (IKK) oder von mitogenaktivierter Proteinkinase-Kinasen (MAPKK) führt [125, 126]. I $\kappa$ B Kinasen phosphorylieren das inhibitorische Protein I $\kappa$ B, worauf es zu dessen Degradation und zur Freisetzung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B kommt. Dieser transloziert in den Zellkern und transkribiert Gene inflammatorischer Zytokine [123, 127]. Im Unterschied zu anderen TLR wie TLR5, -7, -9 fungiert in dem MyD88-abhängigen Signaltransduktionweg der TLR2 und -4 TIRAP als weiteres essentielles Adaptermolekül [128]. Der MyD88-unabhängige Signalweg wird durch Aktivierung von TLR3 und TLR4 vom Adaptermolekül TRIF, sowie durch TRAM initiiert. Durch Aktivierung des Transkriptionsfaktors IRF3 kommt es zur Expression zahlreicher IFN-assoziiierter Gene und einer Aktivierung –wenn auch verzögert- von NF- $\kappa$ B [123, 129, 130]. TRAM spielt im TLR4-vermittelten, MyD88-unabhängigen Signalweg eine Rolle, während es im TLR3-vermittelten, MyD88-unabhängigen keine Funktion zu haben scheint [131]. In Abb. 1.4 sind die TLR Signalwege vereinfacht schematisch dargestellt [124].

So wichtig die Erkennung potentieller Pathogene über das TLR-System für die Immunabwehr ist, kann eine mögliche Überaktivierung durch unkontrollierte, hyper-inflammatorische Reaktionen den Wirtsorganismus auch schädigen. So sind fehlgeleitete, durch TLR induzierte Immunreaktionen in die Pathogenese einer Reihe von autoimmun-, chronischer- und infektionsbedingter Krankheiten involviert. Aus diesen Gründen wird die TLR-Signaltransduktion durch verschiedene Mechanismen reguliert, meist als direkte Folge der TLR-Aktivierung in Form einer negativen Rückkoppelung [132-134].

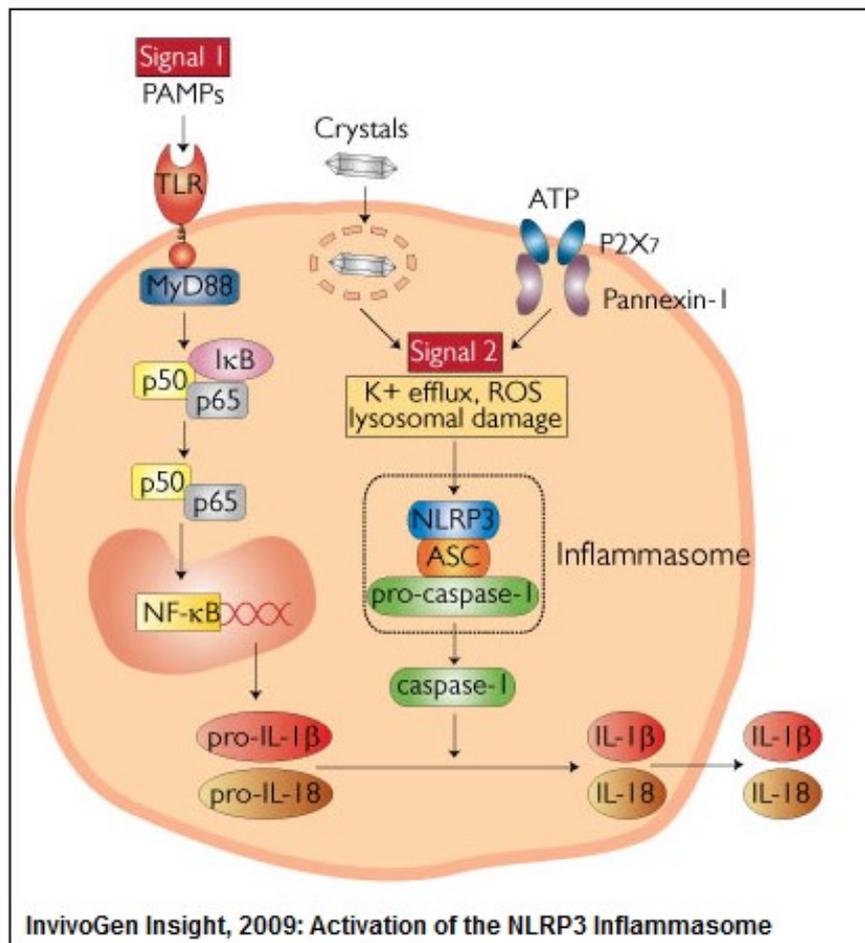
NLRs, besitzen wie die TLR eine LRR-Sequenz und eine NDB (*nucleotide-binding domain*), wodurch sie zur zytosolischen PAMPs Erkennung befähigt sind. Zu den beiden Hauptgruppen der NLRs zählen NOD-Rezeptoren und die NALP-Proteinfamilie (NACHT-,LRR-und Pyrin-Domänen) [120]. Eine bedeutende Untergruppe der NLRs sind solche, die Caspase-1 aktivieren können. Caspase-1 initiiert die Bildung eines großen Proteinkomplexes, dem sogenannten Inflammasom, was zur Spaltung von pro-IL-1 $\beta$  führt [135]. Das murine NALP3 stellt das am besten charakterisierte Inflammasom dar, bestehend aus dem ASC (*Apoptosis-associated speck-like protein containing caspase activation and recruitment domains*), dem



**Abbildung 1.4: Signalkaskade der TLR.** MyD88 abhängig kommt es zunächst zu einer Signaltransduktion über IRAK4 und TRAF6 zu NF-κB und AP-1. Bei einer Aktivierung von TLR2 und TLR4 wird zusätzlich TIRAP als Adaptermoleküle verwendet. Die intrazellulären TLR7-9 aktivieren MyD88-abhängig IRAK4 und TRAF6, was zu einer Expression von IRF7 und verzögerter Aktivierung von NF-κB führt. Der MyD88-unabhängige Signalweg wird durch TLR3 und TLR4 über die Adaptermoleküle TRIF und TRAM initiiert. Dies führt über TRAF3 zu einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors IRF3 und zur Expression zahlreicher IFN-γ assoziierter Gene [124].

Sensorprotein NALP3, sowie Caspase-1 [136]. Die Aktivierung des Caspase-1-Inflammasoms und der Freisetzung von IL-1β erfordert zwei Signale. Das erste Signal erfolgt durch eine TLR-Aktivierung und dient der verstärkten Expression von pro-IL1β. Das zweite Signal wird durch Aktivierung eines oberflächenständigen purinergen Rezeptors vom P2X<sub>7</sub>-Subtyp induziert, wobei ATP als wichtigster endogener Ligand beschrieben wird. Durch Bindung von ATP an den P2X<sub>7</sub>-Rezeptor kommt es zu Perturbationen der Plasmamembran, einem Anschwellen der Zelle sowie einem raschen Efflux von Kaliumionen aus der Zelle, der essentiell für die Caspase-1 Aktivierung zu sein scheint. Die Caspase-1 spaltet schließlich die zytosolisch vorliegenden Pro-Formen der pro-inflammatorischen Zytokine IL-1β, IL-18 und

IL-33, und veranlasst somit deren Freisetzung aus der Zelle [135, 137-139]. Des Weiteren kann die Bereitstellung des zweiten Signals auch durch sogenannte *danger-associated molecular patterns* (DAMPs) Moleküle erfolgen. Dabei handelt es sich um intrazelluläre oder nukleäre Proteine (z.B. Hitze-Schock-Proteine), kristalline Strukturen (Asbest, Siliziumoxid, Harnsäure, Kalziumpyrophosphat) oder reaktive Sauerstoff-Spezies (ROS) [140-144]. In Abb. 1.5 ist die Inflammasom-Aktivierung vereinfacht schematisch dargestellt.



**Abbildung 1.5: Inflammasome-Aktivierung.** Die Aktivierung des Caspase-1-Inflammasoms erfordert zwei Signale. Das erste Signal erfolgt durch TLR-Aktivierung. Das zweite Signal wird durch Bindung an den P2X<sub>7</sub>-Rezeptor oder durch sogenannte DAMPs induziert. Dadurch kommt es zur Bildung des Inflammasoms und zur Aktivierung von Caspase-1. Diese spaltet schließlich die Pro-Formen von IL-1β und veranlasst somit dessen Freisetzung aus der Zelle.

## 1.7 Der Notch-Signalweg

Notch ist ein transmembranärer Rezeptor, der sowohl in der Embryonalentwicklung als auch im adulten Stadium an einer Vielzahl von Differenzierungsprozessen beteiligt ist [145, 146]. In Vertebraten sind vier verschiedene Notch-Rezeptoren (Notch 1-4) bekannt. Der Notch-Signalweg stellt ein Mittel der Zell-Zell-Interaktion dar. Die Notch-vermittelte Signaltransduktion verläuft direkt und bedarf keiner *second messenger* [147, 148]. Die Expression

der verschiedenen Notch-Rezeptoren auf T-Zellen konnte in einer Vielzahl von Studien bestätigt werden. Es konnte gezeigt werden, dass die Liganden-Expression durch mikrobielle Stimuli wie TLR Signale initiiert werden kann [149, 150]. So führte eine Stimulation des TZR zu einer verstärkten Expression aller Notch-Rezeptoren in CD4<sup>+</sup>-T-Zellen [151]. Eine Blockade des Notch-Signals in peripheren CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen führte zur einer inhibierten IFN- $\gamma$  Sekretion nach TZR Stimulation [152]. Zudem spielt der Notch-Signalweg auch bei der Differenzierung von Th1- und Th2-Zellen eine relevante Rolle [153, 154].

## **1.8 Autoimmunerkrankungen und Multiple Sklerose**

Unter Autoimmunität versteht man die Immunreaktionen des adaptiven Immunsystems gegen körpereigene Antigene (Autoantigene) bei Ausfall der immunologischen Selbst-Toleranz. Das Immunsystem erkennt irrtümlicherweise körpereigenes Gewebe als zu bekämpfende Fremdkörper an, was zu schweren Entzündungen und Schädigung von körpereigenem Gewebe führt [155, 156]. Autoimmunreaktionen sind durch das Auftreten von autoreaktiven Zellen gekennzeichnet [157]. Die im gesunden Zustand der immunologischen Selbst-Toleranz inaktiven autoreaktiven Zellklone werden im Falle einer Autoimmunerkrankung durch verschiedene Mechanismen aktiviert [158]. Man unterscheidet organspezifische (Diabetes mellitus Typ 1, Multiple Sklerose) und systemische (systemischer Lupus erythematoses, chronische Polyarthrititis) Autoimmunerkrankungen [159]. Multiple Sklerose (MS) wird als T-Zell vermittelte Autoimmunkrankheit angesehen, bei der es zu einer chronisch, entzündlichen Erkrankung des zentralen Nervensystems (ZNS) kommt [160, 161]. Dabei zerstören T-Lymphozyten, die spezifisch für das Myelin-Antigen sind, die Axon umgebende Myelinscheide und starten so eine Entzündungsreaktion. Die Folgen davon sind Demyelinisierung mit anschließender axonaler Schädigung [162-164]. Wichtige Kennzeichen der MS sind multiple fokale Entmarkungsherde (Läsionen, Plaques) und Vernarbungen (Sklerose) in der weißen Substanz des Rückenmarks und Gehirns [165-167]. Bisher konnte die Pathogenese der MS nicht vollständig geklärt werden. Studien deuten darauf hin, dass eine Aktivierung von CD4<sup>+</sup>-T-Helferzellen, die körpereigene Myelinantigene erkennen Auslöser der Krankheit ist [168-170]. Zu diesen Antigenen gehören das Myelinprotein (MBP), das Myelin assoziierte Glykoprotein (MAG), das Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein (MOG) und das Proteolipid-Protein (PLP) [171]. Die löslichen Myelin-Antigene entstehen hauptsächlich durch Degradierung des Myelins im ZNS und gelangen über den Blutkreis in die sekundären lymphatischen Organe, um dort von APZ phagozytiert und zusammen mit MHC-II präsentiert werden [172]. Als Folge davon kommt es zu einer Aktivierung von

naiven T-Zellen durch die von APZ präsentierten Myelin-Antigene [173-175]. Normalerweise bildet die Blut-Hirn-Schranke (BHS) eine entscheidende Barriere zwischen dem Blutkreislauf und dem ZNS, die ein unkontrolliertes Eindringen von Immunzellen und Pathogenen in das ZNS verhindert [176]. Die Einwanderung der Lymphozyten in das ZNS erfolgt über die Endothelzellen der BHS [177]. Durch die von aktivierten  $CD4^+$ -T-Zellen sezernierten Zytokine kommt es zur Ausschüttung von Chemokinen und zur Aktivierung von Matrixmetalloproteinasen (MMP), wodurch es Immunzellen ermöglicht wird, die BHS zu passieren [178, 179]. Durch lokale Interaktion zwischen den T-Zellen und APZ (Mikroglia, Astrozyten) im ZNS kommt es zu vermehrter Reaktivierung und Proliferation von T-Zellen und Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine, wie  $IFN-\gamma$  und  $TNF-\alpha/\beta$  [172, 180, 181]. Daraus resultiert eine weitere Rekrutierung von T-Zellen, Makrophagen und B-Zellen aus der Peripherie in das ZNS, womit die Entzündungsreaktion weiter voranschreitet [182-185]. Zur Untersuchung der MS-Pathogenese haben sich verschiedene Tiermodelle bewährt. In dieser Arbeit wurde das Mausmodell EAE mit  $MOG_{35-55}$  verwendet. Studien zeigten, dass vor allem Th17-Zellen eine entscheidende Rolle bei der Entstehung von Autoimmunerkrankungen spielen [112, 186-188]. So sind TH17-Zellen in EAE-Modellen weitaus pathogener als Th1-Zellen und besitzen eine entscheidende Bedeutung für die Pathogenese der EAE [185, 189]. Die genauen Ursachen von Autoimmunkrankheiten, wie der MS sind trotz intensiver Forschung bislang unbekannt.

## **1.9 Antigene und Stimulanzen**

Das folgende Kapitel gibt einen Überblick über die in dieser Arbeit verwendeten Stimulanzen.

### **1.9.1 Bakterien**

Bakterien sind einzellige, prokaryontische Mikroorganismen, deren Einteilung durch ihren Zellwandaufbau hauptsächlich in zwei Klassen erfolgt: Grampositive und gramnegative Bakterien. Grampositive Bakterien besitzen eine der Membran aufgelagerte dicke, mehrschichtige Mureinhülle und hohe Anteile an Lipoteichonsäuren in der Zellwand. Gramnegative Bakterien hingegen verfügen nur über eine dünne, einschichtige Mureinhülle [190]. Bakterien gibt es in unserem Körper fast überall, viele davon sind sogar lebensnotwendig für den menschlichen Organismus. So sind beispielweise Bakterien der Darmflora wichtig für die Verdauung, andere wiederum verhindern, dass sich Krankheitserreger zu stark vermehren und helfen dem Körper bei der Bekämpfung von Infektionen [191, 192]. Wenn jedoch unser Immunsystem geschwächt ist und solche

Bakterien überhand nehmen und sich an einem falschen Ort befinden, können auch solche nützliche Bakterien Infektionen auslösen. Allerdings gibt es auch zahlreiche potentiell pathogene Mikroorganismen, die nach einem aktiven oder passiven Eindringen in den menschlichen Organismus bakterielle Infektionen hervorrufen. Viele davon verlaufen harmlos, aber je nach Keim, Lokalisation und Funktionsfähigkeit des Immunsystems des Wirtes können auch solche sehr gefährlich werden. Am häufigsten sind beim Menschen die Schleimhaut des Atemtrakts und des Verdauungstrakts betroffen [193]. Die Sepsis, umgangssprachlich auch Blutvergiftung ist eine komplexe systemische Entzündungsreaktion in Folge einer bakteriellen Infektion und kann über eine lebensbedrohliche Störung der Vitalfunktionen bis hin zum Versagen eines oder mehrerer Organe führen [194, 195]. Alle in dieser Arbeit verwendeten Bakterien wurden hitze-getötet. Die Erkennung durch das Immunsystem erfolgt laut Herstellerangaben über den TLR2. Tab. 1.3 gibt einen Überblick über die verwendeten Bakterien und deren charakteristische Eigenschaften.

**Tabelle 1.3: Charakteristika von verschiedenen Bakterien**

<b>Bakterium</b>	<b>Gram</b>	<b>Zellatmung</b>	<b>Pathogenität</b>	<b>Lokalisation</b>	<b>Quelle</b>
<i>Escherichia coli</i>	-	Fakultativ anaerob	nicht pathogen	extrazellulär	[196]
<i>Helicobacter pylori</i>	-	Mikro-aerophil	pathogen (Gastritis)	extrazellulär	[197]
<i>Listeria monocytognes</i>	+	fakultativ anaerob	pathogen (Listeriose)	intrazellulär	[198]
<i>Legionella pneumophila</i>	-	aerob	pathogen (Legionellose)	intrazellulär	[199]
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	+	fakultativ anaerob	nicht pathogen	extrazellulär	[200]
<i>Mycoplasma fermentans</i>	keine Zellwand	fakultativ anaerob	Potentiell pathogen (Arthritis)	intra- und extrazellulär	[201]
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	aerob	pathogen (Pneumonie)	extrazellulär	[202]
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	-	anaerob	pathogen (Periodontitis)	extrazellulär	[203]
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	fakultativ anaerob	normalerweise nicht pathogen	extrazellulär	[204]
<i>Streptococcus pneumonia</i>	+	aerotolerant anaerob	pathogen (Pneumonie)	extrazellulär	[205]

## 1.9.2 Bakterielle Bestandteile

Ein Bakterium verfügt über zahlreiche Bestandteile, die durch TLR erkannt werden und als Folge darauf eine Immunreaktion auslösen können. Im folgenden Abschnitt werden die für diese Arbeit relevanten bakteriellen Bestandteile beschrieben.

Peptidoglycane (PGN): Aus Zuckern und Aminosäuren zusammengesetzte Makromoleküle, die sowohl in der Zellwand von grampositiven als auch gramnegativen Bakterien vorkommen [206]. Lange Zeit wurde vermutet, die immunstimulatorische Wirkung der PGN verlaufe über Interaktion mit dem TLR2, was zur Aktivierung von NF- $\kappa$ B und Ausschüttung von TNF- $\alpha$  führt [207]. Allerdings deuten neuere Studien darauf hin, dass die Erkennung von PGN durch die TLR nur in Verbindung mit Lipoproteinen oder LTAs erfolgen kann [208, 209]. PGNs können zum einen durch PGRP (*peptidoglycan-recognition proteins*), und zum anderen über die intrazellulären NOD1 oder NOD2 PRRs erkannt werden was zur Aktivierung NF- $\kappa$ B und AP1 führt und die Ausschüttung pro-inflammatorischer Zytokine zur Folge hat [209-212].

Lipoteichonsäuren (LTA): Bestehen aus einem Glyceroglykolipidanteil und einer hydrophilen Kette und sind überwiegend in der Zellwand grampositiver Bakterien zu finden [213]. LTAs werden vom Immunsystem durch den TLR2 erkannt, was zur Aktivierung von NF- $\kappa$ B und zur Produktion von TNF- $\alpha$  und anderen pro-inflammatorischen Zytokinen führt. Zudem konnte eine zusätzliche Beteiligung von TLR4 oder LBP (*LPS-binding protein*) und CD14 in der LTA-vermittelten TLR2 Aktivierung nachgewiesen werden [207, 214, 215]. Ferner sind freie LTAs in der Lage antikörperunabhängig das Komplementsystem zu aktivieren und Komplement-aktivierende Proteine zu binden [216, 217].

Lipopolysaccharid (LPS): Hauptbestandteil der äußeren Zellwand gram-negativer Bakterien und hauptverantwortlich für die Aktivierung des angeborenen Immunsystem in Folge einer bakteriellen Infektion durch gram-negative Bakterien. LPS bestehen aus einer inneren Kernregion, welche an Lipid A gebunden ist und einer äußeren Kernregion, die ein sogenanntes O-Antigen bindet [218, 219]. Dabei handelt es sich um ein bakterienspezifisches Polymer aus sich wiederholenden Polysacchariden. LPS wird durch das Immunsystem überwiegend durch den TLR4 erkannt, was MyD88-abhängig eine Aktivierung von NF- $\kappa$ B zur Folge hat [2, 220]. Die Erkennung erfolgt über die LPS-bindenden Plasmaproteine LBP und lösliches sCD14 [221].

Flagellin: Flagellen sind fadenförmige Gebilde auf der Oberfläche von Mikroorganismen, die hauptsächlich der Fortbewegung dienen. Bakterielle Flagellen sind extrazelluläre, wendelförmige Fäden, die vollständig aus Proteinen bestehen und sowohl mit der Zellmembran, als auch der Zellwand fest verankert sind [222, 223]. Flagellin wird durch das Immunsystem hauptsächlich extrazellulär durch den TLR5 erkannt, wodurch es über den MyD88-abhängigen Signalweg zu einer Aktivierung von NF- $\kappa$ B kommt [223, 224]. Die Erkennung von intrazellulären Flagellin hingegen erfolgt durch die zytosolischen NOD-like Rezeptoren, NLRC4 und NAIP5 [225].

N-Acyl-Homoserin-Lactone: Die Lactone des Homoserins sind Signalmoleküle, die innerhalb der Zelle produziert und in das umgebende Milieu sezerniert werden [226]. Diese Signalmoleküle sind für das Quorum sensing verantwortlich. Dabei handelt es sich um die Fähigkeit von Einzellern über chemische Kommunikation die Zelldichte der Population zu messen und bestimmte Gene entsprechend zu regulieren [227, 228].

Lektine: Komplexe Proteine oder Glykoproteine, die sich über spezifische Kohlenhydratstrukturen an Zellen bzw. Zellmembranen binden. Lektine werden von Tieren, Pflanzen und Mikroorganismen gebildet und können zahlreiche Stoffwechselfvorgänge wie die ribosomale Proteinbiosynthese, die Zellteilung, die Agglutination oder das Immunsystem beeinflussen [229-231]. Zu den Lektinen gehören zudem AB-Toxine wie Diphtherietoxin (DTx) und Exotoxin A (ExoA). DTx ist ein Exotoxin aus *Corynebacterium diphtheriae*, dem Erreger der Diphtherie. Die Wirkungsweise des DTx beruht auf der Hemmung des Elongationsfaktors EF-2, der die Translation durch eine NAD-abhängige ADP-Ribosylierung eines Diphthamid-Restes bei der Proteinsynthese von Eukaryoten katalysiert [232, 233]. ExoA ist ein virulentes Lektin aus *P.aeruginosa*, dessen biochemisches Verhalten identisch ist mit dem des DTx [234]. Concanavalin A aus den Samen der Jackbohne *Canavalia ensiformis* ist ein Beispiel für ein pflanzliches Lektin ohne Zuckerrest [235].

Curdlan AL: Ein lineares beta-1.3-glucan Polymer von *Alcaligenes faecalis*, einem Wasser und Bodenbakterium [236]. Nach Erkennung von Curdlan über den membrangebunden Dectin-1 Rezeptor kommt es zu einer CARD9-abhängigen Aktivierung von NF- $\kappa$ B und MAP-Kinasen. Neuere Studien zeigen, dass Curdlan zudem vom NALP3 Inflammasome Komplex erkannt wird und zusammen mit Dectin-1 zu einer Aktivierung der IL-1 $\beta$  Signalkaskade führt [237, 238].

### **1.9.3 Imiquimod und Gardiquimod**

Zur Stimulation des TLR7 wurden die beiden *immune response modifiers* Imiquimod und Gardiquimod verwendet. Imiquimod ist ein Imidazochinolin-Amin Analog zu Guanosin mit einer potenten indirekten antiviralen Wirkung [239]. Dabei handelt es sich um einen Immunmodulator, d.h. er bekämpft Viren und Tumore durch Aktivierung des Immunsystems. Als Medikament kann Imiquimod zur topischen Behandlung von Basaliomen, aktinischen Keratosen und Feigwarzen verwendet werden [240-242]. Gardiquimod ist eine von der Firma Invivogen entwickelte Imidazochinolin Verbindung. Im Gegensatz zu Imiquimod aktiviert Gardiquimod neben dem TLR7 auch den TLR8 [243].

### **1.9.4 Inflammasome Inducers**

Zur Stimulation des NLRP3 Inflammasomes wurden verschiedene Substanzen verwendet: Aluminium Kristalle (Kaliumaluminiumsulfat), CPPD Kristalle (Calciumpyrophosphat-dihydrat), Hemozoin (Malariapigment) und MSU Kristalle (Mononatrium-urat). Alle Substanzen sind DAMPs und führen durch Aktivierung von caspase-1 zur Produktion pro-inflammatorischer Zytokine [144, 244, 245].

## 1.10 Fragestellung

Interleukin-17 gilt als ein wichtiger Trigger von Entzündungen bei Autoimmunerkrankungen [246]. In den letzten Jahren enthärtete sich jedoch der Verdacht, dass Th17-Zellen verantwortlich für die Entstehung von Autoimmunerkrankungen sind [247]. So lassen sich auch in gesunden Organismen IL-17 produzierende Zellen nachweisen, die eine wichtige Rolle bei der direkten Immunantwort spielen und eine unmittelbare Schutzfunktion gegenüber Bakterien und entarteten Zellen ausüben [248]. Auch im Thymus, ein lymphatisches Organ zur Ausreifung und Differenzierung der T-Zellen konnten IL-17 produzierende Zellen nachgewiesen werden [249, 250]. Neben den induzierbaren Th17-Zellen (iT<sub>H</sub>17), die nach Antigenkontakt mit naiven CD4<sup>+</sup>-T-Zellen in den peripheren lymphatischen Organen IL-17 ausschütten, konnten auch natürliche vorkommende Th17-Zellen (nTh17) identifiziert werden. Diese nTh17-Zellen erlangen die Fähigkeit zur IL-17 Sekretion bereits während ihrer Reifung im Thymus und benötigen keine weitere Differenzierung in peripheren lymphatischen Organen [251].

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung des Einflusses von Bakterien und bakteriellen Bestandteilen auf die IL-17-Produktion von Thymus- und Milzzellen unter Berücksichtigung ihrer möglichen Rolle bei T-Zell-vermittelten Autoimmunerkrankungen.

Zunächst wurde der Einfluss von verschiedenen hitze-getöteten Bakterien und bakteriellen Bestandteilen (Zellwandbestandteile, Toxine) auf die Zytokinproduktion von unreifen T-Zellen (CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>) näher untersucht, mit besonderem Fokus auf IL-17. Zudem wurden synthetische Verbindungen (*immune response modifiers*) und kristalline Substanzen (*inflammasome inducers*) als Stimulanzen verwendet.

Des Weiteren wurde der Einfluss ausgewählter hitze-getöteter Bakterien und bakterieller Bestandteile auf die Zytokinproduktion von reifen T-Zellen genauer untersucht. Der Fokus sollte hierbei auf den lienalen CD4<sup>+</sup>-T-Zellen liegen. Unter Verwendung MOG-antigen-spezifischer T-Zellen aus EAE-Tieren, einem Tiermodell der MS wurde die Beeinflussung der Zytokinantwort durch Stimulation mit hitze-getöteten Bakterien und bakteriellen Verbindungen näher untersucht. Der Fokus lag hierbei auf der IL-17-Sekretion lienaler MOG-antigen-spezifischer CD4<sup>+</sup>-T-Zellen.

Schlussendlich sollten die Unterschiede zwischen unreifen und naiven/ reifen bzw. Antigen-spezifischen T-Zellen hinsichtlich ihrer Zytokinantwort nach dem Einfluss von Bakterien und bakteriellen Bestandteilen aufgezeigt und ihre mögliche Rolle bei autoimmunen Erkrankungen erläutert werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte

Tabelle 2.1: Verwendete Geräte

Gerät	Hersteller
Analysenwaage	Sartorius, Göttingen
Brutschrank HERAcell	Thermo Fisher Scientific, MA, USA
Durchflusszytometer FACSCanto™	BD Biosciences, Heidelberg
Durchflusszytometer Guava EasyCyte8	Millipore, Darmstadt
EasySep™ Magnet	Stemcell Technologies, Köln
ELISpot Plate Reader ImmunoSpot®	CTL, Shaker Heights, OH, USA
Heizblock Thermochem	Liebisch, Bielefeld
Homogenisator SONOPLUS HD 2070	Bandelin, Berlin
Kühlschrank 4°C	Liebherr, Biberach
MACS-Separator OctoMACS™	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Mikroskop Leica DME	Leica Mircosystems, Wetzlar
Mikroskop Wilovert S	Hund, Wetzlar
Millipore DestWasserAnlage	Millipore, Darmstadt
Mini-Protean 3 Elektrophorese System	BioRad Laboratories GmbH, München
Multistep Pipette	Eppendorf, Hamburg
Nanodrop®ND-1000 Spectrophotometer	Peqlab, Erlangen
Neubauer-Zählkammer	LO – Laboroptik GmbH, Friedrichsdorf
PCR System 7900HT Fast Real-Time PCR	Applied Biosystems, Darmstadt
Pipetten (2,5; 10; 20; 100; 200; 1000 µl)	Eppendorf, Hamburg
Pipettus	Hirschmann-Laborgeräte, Eberstadt
Präparationsbesteck	Aeskulap, Tuttlingen
Reinstwassersystem, Milli-Q®	Millipore, Darmstadt
Rotator	neoLab, Heidelberg

Schüttler MTS4	IKA, Staufen
Sterilbank Modell HeraSafe KS / KSP	Heraus, Hanau
Thermomixer comfort 1,5 ml	Eppendorf, Hamburg
Tiefkühlschrank -20°C	Liebherr, Biberach
TRIO-Thermoblock	Biometra, Göttingen
Vortex Mixer L46	Labinco, Breda, Niederlande
Waage Acculab vicon	Sartorius, Göttingen
Wasserbad	Memmert, Schwabach
Zentrifuge Heraeus Fresco 17	Thermo Fisher Scientific, MA, USA
Zentrifuge Multifuge 3S-R	Thermo Fisher Scientific, MA, USA
Zentrifuge Megafuge 40 R	Thermo Fisher Scientific, MA, USA
Zentrifuge minispin	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge EBA 12	Hettich, Tuttlingen

### 2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2.2: Verwendete Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
Cryo.s	Greiner bio one, Kremsmünster
Combitips (0,5 – 5 ml)	Eppendorf, Hamburg
Drei-Wege-Hahn	Braun, Melsungen
Einwegpipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml)	Corning, NY, USA
Falcons (15 ml, 50 ml)	Greiner Bio One, Kremsmünster
Kanülen Microlance	Becton Dickinson, Heidelberg
MicroAmp® Optical 96 well reaction plate	Applied Biosystems, Darmstadt
MultiScreen HTS 96-well Plate	Millipore, Darmstadt
MS Columns	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Petrischalen (3,5 – 9 cm)	Greiner Bio One, Kremsmünster
Pipettenspitzen (10 – 1000 µl)	Starlab, Ahrensberg
Probenröhrchen für FACS	Becton Dickinson, Heidelberg

Reagenzröhrchen Falcon (15 ml, 50 ml)	Becton Dickinson, Heidelberg
Reaktionsgefäße (0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml, 5 ml)	Eppendorf, Hamburg
Spritzen (3 - 25 ml)	Braun, Melsungen
Skalpell (Feather)	Wolfram Droh GmbH, Mainz
Sterilfilter 0,45 µm Durchmesser	Roth, Karlsruhe
Well-Platten (6 – 96 wells )	Greiner Bio One, Kremsmünster
Zellkulturflaschen	Greiner Bio One, Kremsmünster
Zellkulturschalen	Greiner Bio One, Kremsmünster
Zellsiebe (40 µm, 70 µm)	Becton Dickinson, Heidelberg

### 2.1.3 Chemikalien, Reagenzien und gebrauchsfertige Lösungen

Tabelle 2.3: Verwendete Chemikalien, Reagenzien und gebrauchsfertige Lösungen

Chemikalie	Hersteller
2-Mercaptoethanol	Sigma Aldrich, Steinheim
7-AAD	Merck Millipore, Darmstadt
Ammoniumchlorid (NH <sub>4</sub> Cl)	Merck KGaA, Darmstadt
Brefeldin A	eBioscience, Frankfurt/Main
Bovines Serumalbumin (Fraktion V)	Carl Roth, Karlsruhe
Calciumchlorid (CaCl <sub>2</sub> )	Merck KGaA, Darmstadt
Dinatriumhydrogenphosphat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Merck KGaA, Darmstadt
Dinatrium-ethylendiamin-tetraacetat (Na <sub>2</sub> H <sub>2</sub> EDTA)	Carl Roth, Karlsruhe
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma Aldrich, Steinheim
Fixable Viability Dye-eFluor® 660	eBioscience, Frankfurt/Main
Fixable Viability Dye-eFluor® 780	eBioscience, Frankfurt/Main
Ethanol	Carl Roth, Karlsruhe
Isofluran	Actavis Deutschland GmbH, München
Kaliumcarbonat (K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> )	Merck KGaA, Darmstadt
Kaliumchlorid (KCl)	Merck KGaA, Darmstadt

Kaliumdihydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Merck KGaA, Darmstadt
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl)	Merck KGaA, Darmstadt
Propidiumiodid (PI)	Merck Millipore, Darmstadt
RIPA Puffer (10x)	Cell Signaling, Cambridge, GB
Staurosporin	Sigma Aldrich, Steinheim

#### 2.1.4 Verwendete Kits

Tabelle 2.4: Verwendete Kits

Kit	Bezugsquelle
AP Conjugate Substrate Kit	BioRad, München
BD Cytotfix/Cytoperm™ Fixation and Permeabilization Kit mit BD GolgiStop	BD Biosciences, Heidelberg
CD4 (L3T4) MicroBeads, mouse	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
CD8a (Ly-2) MicroBeads, mouse	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
EasySep Mouse CD4 <sup>+</sup> T Cell Enrichment Kit	StemCell Technologies, Köln
Foxp3 Fix/Perm Buffer Set	Biolegend, San Diego, CA, USA
Guava® Caspase 3/7 FAM & Multicaspase SR Kit	Millipore, Darmstadt
Guava Nexin® Reagent	Millipore, Darmstadt
IC Fixation & Permeabilization Buffer Set	eBioscience, Frankfurt/Main
Mouse IL-17 Sekretions Assay	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Power SYBR® Green PCR Master Mix	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
RNeasy Mini Kit	Qiagen GmbH, Hilden
SuperScript® III First-Strand Synthesis System for RT-PCR	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA

### 2.1.5 Versuchstiere

Tabelle 2.5: Verwendete Versuchstiere

Mausstamm	Bezugsquelle
C57.BL/6J	Elevage Janvier Le Genest Saint Isle, FRA Hauseigene Zucht
BALB/c	Elevage Janvier
SJL	Elevage Janvier

### 2.1.6 Immunisierung

Tabelle 2.6: Verwendete Reagenzien zur Immunisierung

Reagenz	Bezugsquelle
MOG <sub>35-55</sub>	BioTrend, Köln
IFA ( <i>Incomplete Freund`s Adjuvant</i> )	Difco Laboratories, Detroit, MI, USA
Mycobakterium tuberculosis	Difco Laboratories, Detroit, MI, USA
Pertussis Toxin (PTx)	Sigma-Aldrich, Steinheim

### 2.1.7 Medien und Zellkulturbestandteile

Tabelle 2.7: Verwendete Medien und Zellkulturbestandteile

Komponente	Bezugsquelle
2-Mercaptoethanol	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
BD Pharm Lyse™	BD Biosciences, Heidelberg
Collagenase D	Roche, Basel, Schweiz
DMEM high glucose (4,5 g/l mit Phenolrot)	PAA Laboratories, Cölbe
DNase I	Roche, Basel, Schweiz
HBSS 10x	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
HL-1 serumfreies Medium	Lonza, Basel, Schweiz
GIBCO® RPMI-1640 Medium	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Fetales Kälberserum (FCS)	PAA Laboratories, Cölbe
L-Glutamin	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Penicilin/Streptomycin (P/S) 100x	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
PBS	Sigma Aldrich, Steinheim

Percoll-Lösung	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
Trypanblau-Lösung (0,4 %)	Sigma Aldrich, Steinheim

## 2.1.8 Antikörper für Differenzierungen

**Tabelle 2.8: Verwendete Antikörper für die Differenzierungen**

Antikörper	Bezugsquelle
Ultra-LEAF™ Purified mouse CD3ε (Clone: 145-2C11)	Biolegend, San Diego, CA, USA
LEAF™ Purified anti mouse CD28 (Clone: 37.51)	Biolegend, San Diego, CA, USA
LEAF™ Purified anti mouse IFN-γ (Clone: XMG1.2)	Biolegend, San Diego, CA, USA
LEAF™ Purified anti mouse IL-4 (Clone: 11B11)	Biolegend, San Diego, CA, USA
Recombinant Mouse GM-CSF (carrier-free)	Biolegend, San Diego, CA, USA
Recombinant Mouse IL-4 (carrier-free)	Biolegend, San Diego, CA, USA
Recombinant Mouse Il-6 (carrier-free)	Biolegend, San Diego, CA, USA
Recombinant Mouse IL-23 (carrier-free)	R&D Systems, Minneapolis, US
Recombinant Human TGF-β1 (carrier-free)	Biolegend, San Diego, CA, USA

## 2.1.9 ELISpot Antikörper

**Tabelle 2.9: Verwendete ELISpot Antikörper**

Antikörper	Clone	Bezugsquelle
Purified Rat Anti-Mouse IFN-γ	R4-6A2	BD Biosciences, Heidelberg
Purified Rat Anti-Mouse IL-1β	B122	eBioscience, Frankfurt/Main
Purified Rat Anti-Mouse IL-2	JES6-1A12	BD Biosciences, Heidelberg
Purified Rat Anti-Mouse IL-4	11B11	BD Biosciences, Heidelberg
Purified Rat Anti-Mouse IL-5	TRFK5	BD Biosciences, Heidelberg
Purified Rat Anti-Mouse IL-6	MP5-20F3	BD Biosciences, Heidelberg
Purified Rat Anti-Mouse Il-17A	TC11-18H10	BD Biosciences, Heidelberg
Biotin Rat Anti-Mouse IFN-γ	XMG1.2	BD Biosciences, Heidelberg
Biotin Rat Anti-Mouse IL-1β	Poly5158	eBioscience, Frankfurt/Main
Biotin Rat Anti Mouse IL-2	JES6-5H4	BD Biosciences, Heidelberg

Biotin Rat Anti-Mouse IL-4	BVD6-24G2	BD Biosciences, Heidelberg
Biotin Rat Anti-Mouse IL-5	TRFK4	BD Biosciences, Heidelberg
Biotin Rat Anti-Mouse IL-6	MP5-32C11	BD Biosciences, Heidelberg
Biotin Rat Anti-Mouse Il-17A	TC11-8H4	BD Biosciences, Heidelberg
APC Streptavidin		BD Biosciences, Heidelberg

### 2.1.10 FACS-Antikörper

**Tabelle 2.10: Verwendete FACS-Antikörper**

Antikörper	Fluorochrom	Bezugsquelle
CD3	FITC	BD Biosciences, Heidelberg
CD4	FITC	BD Biosciences, Heidelberg
	PE	Biolegend, San Diego, CA, USA
	PE-Cy7	BD Biosciences, Heidelberg
	PerCP-Cy5.5	Biolegend, San Diego, CA, USA
CD8a	PE	Biolegend, San Diego, CA, USA
	APC-H7	BD Biosciences, Heidelberg
CD11b	FITC	Biolegend, San Diego, CA, USA
	PerCP-Cy5.5	eBioscience, Frankfurt/Main
CD11c	APC	Biolegend, San Diego, CA, USA
CD16/32	APC	BD Biosciences, Heidelberg
CD19	PerCP-Cy5.5	BD Biosciences, Heidelberg
CD25	FITC	BD Biosciences, Heidelberg
CD45	PE-Cy7	BD Biosciences, Heidelberg
		Biolegend, San Diego CA, USA
CD117	FITC	Biolegend, San Diego, CA, USA
F4/80	APC	Biolegend, San Diego, CA, USA
FOXP3	PE	Biolegend, San Diego, CA, USA
IFN- $\gamma$	PE	BD Biosciences, Heidelberg
	PE-Cy7	BD Biosciences, Heidelberg

IL-6	FITC	Biolegend, San Diego CA, USA
	PE	eBioscience, Frankfurt/Main
	APC	BD Biosciences, Heidelberg
IL-17	PE	BD Biosciences, Heidelberg
	PerCP-Cy5.5	BD Biosciences, Heidelberg
IgG-Isotyp-Kontrolle	PE	Biolegend, San Diego, CA, USA
Ly-6G	PE	Biolegend, San Diego, CA, USA
NK1.1	APC	BD Biosciences, Heidelberg
Notch1	PE	Biolegend, San Diego, CA, USA
Notch2	PE	Biolegend, San Diego, CA, USA
Notch3	PE	Biolegend, San Diego, CA, USA
Notch4	APC	Biolegend, San Diego, CA, USA
ROR $\gamma$ t	APC	eBioscience, Frankfurt/Main

### 2.1.11 Primer

Die verwendeten Oligodesoxynukleotide wurden von MWG Eurofins bezogen, mit RNase-freiem Wasser auf 100 $\mu$ M eingestellt und vor der Verwendung auf 10 $\mu$ M (1:10) verdünnt.

**Tabelle 2.11: Verwendete Primer**

Primer	Sequenz
$\beta$ -actin	forward 5' - AGA GGG AAA TCG TGC GTG AC -3'
	reverse 5' - CAA TAG TGA TGA CCT GGC CGT -3'
GADPH	forward 5' - ACT GCC ACC CAG AAG ACT G -3'
	reverse 5' - CAC CAC CCT GTT GCT GTA G -3'
IL-1 $\beta$	forward 5' - TGC CAC CTT TTG ACA GTG ATG -3'
	reverse 5' - TTC TTG TGA CCC TGA GCG AC -3'
IL-17A	forward 5' - TCA TCC CTC AAA GCT CAG CG -3'
	reverse 5' - TTC ATT GCG GTG GAG AGT CC -3'
IL-17A	forward 5' - CAG CAG CGA TCA TCC CTC AAA G -3'

	reverse	5` - TGA GGT TGA CCT TCA CAT TCT GGA -3`
IL-17R	forward	5` - GTG GTC CTA AAG TTC GCC CA -3`
	reverse	5` - AAG CAG AGG TTC TCA CGC TC -3`
IL-23	forward	5` - CAA AGG ATC CGC CAA GGT CT -3`
	reverse	5` - CTT GCC CTT CAC GCA AAA CA -3`
IRAK4	forward	5` - CCC AAA CCG TCA AAA GCC TG -3`
	reverse	5` - GAG CAA CCT TGC ACC TTG TG -3`
IRF3	forward	5` - TCA TGC TAC TGG GGA TGG GA -3`
	reverse	5` - CTT CCC GGG CCA TCT CTA AC -3`
MyD88	forward	5` - TGT TCT TGA ACC CTC GGA CG -3`
	reverse	5` - CGA AAA GTT CCG GCG TTT GT -3`
NF-κB	forward	5` - ACC CTG ACC ATG GAC GAT TC -3`
	reverse	5` - AAT GGC TTG CTC CAG GTC TC -3`
NLRP3	forward	5` - GGG TTC TGG TCA GAC ACG AG -3`
	reverse	5` - TCA CCT CTC GGC AGT GGA TA -3`
PGE2	forward	5` - AAG GCC ATG AAT GAC CAG GG -3`
	reverse	5` - TGT TCG GTA CAC GTT GGG AG -3`
TLR2	forward	5` - CAG TCT TCC TAG GCT GGT GC -3`
	reverse	5` - AAG GAA ACA GTC CGC ACC TC -3`
TLR4	forward	5` - TGC TTG GCG AAT GTT TCT GC -3`
	reverse	5` - TCT GTT CCT TGA CCC ACT GC -3`
TRAF	forward	5` - TGA GTG TAG CCC ACG AAA GC -3`
	reverse	5` - CCA GAG GTG GGT CAA ACT CC -3`
TSLP	forward	5` - GGA GCC TCT TCA TCC TGC AA -3`
	reverse	5` - TCC GGG CAA ATG TTT TGT CG -3`

## 2.1.12 Verwendete Antigene und Stimulanzen

### Bakterien

Tabelle 2.13: Verwendete Bakterien

Bakterium	Bezugsquelle
HKAL	Invivogen, San Diego, CA, USA
HKEB	Invivogen, San Diego, CA, USA
HKHP	Invivogen, San Diego, CA, USA
HKLM	Invivogen, San Diego, CA, USA
HKLP	Invivogen, San Diego, CA, USA
HKLR	Invivogen, San Diego, CA, USA
HKMF	Invivogen, San Diego, CA, USA
HKPA	Invivogen, San Diego, CA, USA
HKPG	Invivogen, San Diego, CA, USA
HKSA	Invivogen, San Diego, CA, USA
HKSP	Invivogen, San Diego, CA, USA

### Zellwandbestandteile

Tabelle 2.14: Verwendete Zellwandbestandteile

Zellwandbestandteil	Bezugsquelle
FLA-ST	Invivogen, San Diego, CA, USA
Lektin von <i>P. aeruginosa</i>	Sigma Aldrich, Steinheim
LPS-EB	Sigma Aldrich, Steinheim
LPS-PA	Sigma Aldrich, Steinheim
LTA-BS	Invivogen, San Diego, CA, USA
LTA-SA	Invivogen, San Diego, CA, USA
N-Acyl-L-Homoserin-Lacton	Sigma Aldrich, Steinheim
PGN-EB	Invivogen, San Diego, CA, USA
PGN-EK	Invivogen, San Diego, CA, USA
PGN-SA	Invivogen, San Diego, CA, USA

### ***Inflammasom-Inducer***

**Tabelle 2.15: Verwendete Inflammasome-Inducer**

<b><i>Inföammasome-Inducer</i></b>	<b>Bezugsquelle</b>
Alumns-Crystals	Invivogen, San Diego, CA, USA
CPPD-Crystals	Invivogen, San Diego, CA, USA
Hemozoin	Invivogen, San Diego, CA, USA
MSU-Crystals	Invivogen, San Diego, CA, USA

### **Sonstige Antigene und Stimulanzen**

**Tabelle 2.16: Verwendete sonstige Antigene und Stimulanzen**

<b>Antigen</b>	<b>Bezugsquelle</b>
Concanavalin A	Sigma Aldrich, Steinheim
Curdlan AL	Invivogen, San Diego, CA, USA
Diphtherie Toxin	Sigma Aldrich, Steinheim
Exotoxin A	Sigma Aldrich, Steinheim
Gardiquimod®	Invivogen, San Diego, CA, USA
Imiquimod	Invivogen, San Diego, CA, USA
Ionomycin	Sigma Aldrich, Steinheim
Phorbol-12-myristat-13-acetat	Sigma Aldrich, Steinheim
Purified anti mouse CD3 (clone 145-2C11)	BD Biosciences, Heidelberg
Purified anti mouse CD28 (Clone: 37.51)	Biolegend, San Diego, CA, USA

### 2.1.13 Nährmedien

Tabelle 2.12: Verwendete Nährmedien

<b>ELISpot-Medium</b>	HL-1 Serumfrei	
	P/S	1 %
	L-Glutamin	2 mM
<hr/>		
<b>APZ-Nährmedium</b>	RPMI 1640-Medium	
	FCS	10 %
	L-Glutamin	2 mM
	P/S	1 %
	2-Mercaptoethanol	50 $\mu$ M
	rmGM-CSF	5 ng/ml
	rmIL-4	5 ng/ml
<hr/>		
<b>Th17-Differenzierungsmedium</b>	RPMI 1640-Medium	
	FCS	10 %
	L-Glutamin	2 mM
	P/S	1%
	2-Mercaptoethanol	50 $\mu$ M
	anti-CD28	2 $\mu$ g/ml
	anti-IFN- $\gamma$	10 $\mu$ g/ml
	anti IL-4	10 $\mu$ g/ml
	rmIL-6	50 ng/ml
	rmIL-23	5 ng/ml
	rmTGF- $\beta$	5 ng/ml
<hr/>		
<b>Proliferations-Medium</b>	RPMI 1640-Medium	
	FCS	10 %
	L-Glutamin	2 mM
	P/S	1 %

## 2.1.14 Puffer und Lösungen

Tabelle 2.17: Verwendete Puffer und Lösungen

<b>Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)</b>  <b>10x</b>	NaCl	1,37 M
	KCl	27 mM
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	65 mM
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	15 mM
	Gelöst in H <sub>2</sub> O <sub>d</sub> , pH 7,4	
<b>Erythrozyten-Lysepuffer 10x</b>	NH <sub>4</sub> Cl	155 mM
	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	10 mM
	EDTA-Na <sub>2</sub>	0,1 mM
	Gelöst in H <sub>2</sub> O <sub>d</sub> , pH 7,2	
<b>RIPA-Lysepuffer (1x)</b>	TRIS-HCl	20 mM
	NaCl	150 mM
	Na <sub>2</sub> EDTA	1 mM
	EGTA	1 mM
	NP-40	1 %
	Natriumdeoxycholate	1 %
	Natriumpyrophosphat	2,5 mM
	B-Glycerophosphat	1 mM
	Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>	1 mM
	Leupeptin	1 µg/ml
<b>Collagenase-DNAse-Lösung</b>	Collagenase D	2,5 mg/ml Pufferlösung
	DNAse	1 mg/ml Pufferlösung
	Pufferlösung	10 mM MgCl <sub>2</sub> 0,9 mM CaCl <sub>2</sub>
	Gelöst in PBS	

<b>MACS-Puffer</b>	PBS	
	BSA	0,5 %
	EDTA	2 mM
	Entgasen über Sterilfiltration, pH 7,2	
<b>FACS-Puffer</b>	PBS	
	FCS	2 %
<b>CFSE-Waschpuffer</b>	RPMI-Medium	
	FCS	10 %
<b>Annexin-V-Puffer</b>	HL-1-Medium	
	BSA	1 %

## 2.1.15 Software

Tabelle 2.18: Verwendete Software

Software	Hersteller
DIVA v6.1.3	BD Biosciences, Heidelberg
Endnote 6.	Adept Scientific, Frankfurt
InStat 3.00	GraphPad Software Inc, CA, USA
Immunospot 5.0 pro	Cellular Technology Limited, OH, USA
Office 2010	Microsoft, WA, USA
PRISM 5	GraphPad Software Inc, CA, USA
Guava EasyCyte version 2.2.2	Merck Millipore, Darmstadt
SDS 2.3	Applied Biosystems, Darmstadt

## **2.2 Zellbiologische Methoden**

Alle in dieser Arbeit verwendeten Zellkulturen wurden in einem Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % Wasserdampfsättigung kultiviert. Alle zellbiologischen Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen unter einer Heraus Sterilbank durchgeführt. Das serumfreie HL-1 wurde stets mit Zusätzen (1 % P/S, 2 mM L-Glutamin) verwendet.

### **2.2.1 Organentnahme**

Die Mäuse wurden in Inhalationsnarkose mit Isofluran versetzt und durch zervikale Dislokation getötet. Dann wurden die Mäuse mit Ethanol desinfiziert und der Thorax mit einer Schere geöffnet. Die entsprechenden Organe wie Thymus, Milz, Rückenmark oder Gehirn wurden mit einem sterilen Besteck entnommen und direkt in eis-vorgekühltes DMEM-Nährmedium überführt. Abhängig von der späteren Verwendung wurde das Tier vorher mit kalter PBS-Lösung gespült. Dazu wurde die rechte Vorkammer des Herzens mit einer Schere geöffnet und 20 ml PBS über eine Kanüle in die linke Hauptkammer eingeführt.

### **2.2.2 Herstellung von Zellsuspensionen**

Die Organe wurden vorsichtig mit Hilfe eines Spritzenkolbens in DMEM-Nährmedium (10 ml) in einer Petrischale zerrieben. Um Gewebeteile zu entfernen wurden die Zellsuspensionen über einen Zellsieb (40 µm oder 70 µm) filtriert. Anschließend wurden die gewonnenen Zellsuspensionen für 10 min bei 1200g und 4 °C zentrifugiert und der Überstand entfernt. Für die Lyse der Erythrozyten wurde das Zellpellet in 1x Lyse-Puffer (5 ml/ Organ) resuspendiert und bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Nach fünfminütiger Inkubation wurde die Lyse durch Zugabe von 15 ml DMEM-Medium gestoppt und die Zellsuspensionen einmal mit PBS gewaschen. Je nach weiterer Verwendung wurden die Zellen in Nährmedium, FACS-Puffer oder MACS-Puffer aufgenommen und ausgezählt.

### **2.2.3 Bestimmung der Zellzahl**

Jeweils 10 µl der gewonnenen Zellsuspension wurden je nach zu erwartender Zellzahl mit 10-90 µl Trypanblau-Lösung vermischt und in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Dabei wurden nur die nicht angefärbten, lebenden Zellen ausgezählt. Die Neubauer-Zählkammer besteht aus neun großen Quadraten, wobei jedes Quadrat 0,1 µl fasst. Um die Zellzahl pro Milliliter berechnen zu können, wurde die ermittelte Zellzahl in einem Quadrat mit dem Verdünnungsfaktor sowie dem Kammerfaktor 10<sup>4</sup> multipliziert.

#### 2.2.4 Isolation von T-Zellen aus der Milz durch MACS-Separation

*Magnetic Activated Cell Sorting*, auch als MACS-Separation bezeichnet, ist eine Methode, die der Sortierung von Zellgemischen bzw. der Separation von bestimmten Zellen aus einem Gemisch anhand von speziellen Oberflächenstrukturen der Zellen dient. Die gewünschte Zellpopulation wird mit Magnetpartikeln, an die spezifische Antikörper gebunden sind (MicroBeads) inkubiert und über eine sich in einem Magnetfeld befindliche Säule eluiert. Die mit MicroBeads markierten Zellen bleiben in der Säule hängen und können nach dem Entfernen aus dem Magnetfeld durch Spülen der Säule gewonnen werden. In dieser Arbeit wurde die Methode zur Isolation von CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen angewendet. Die separierten Zellen wurden vorwiegend für IL-17 ELISpot Assays verwendet.

Für die Isolation von CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen wurden die gewonnenen Zellsuspensionen aus den Milzen verwendet. Hierfür wurden die Zellen mit PBS gewaschen (1200g, 4 °C, 10 min) und in MACS-Puffer resuspendiert (90 µl/10<sup>7</sup> Zellen). Anschließend folgte eine Inkubation mit den Magnetbeads (10 µl/10<sup>7</sup> Zellen) für 15 min bei 4 °C im Dunkeln. Die Zellen wurden zweimal mit MACS-Puffer (2 ml/10<sup>7</sup>-Zellen) gewaschen und für die Separation in MACS-Puffer (0,5 ml) aufgenommen. Zwischenzeitlich wurden die Säulen (MS-Columns) in den Magnetständer eingespannt und zweimal mit MACS-Puffer (0,5 ml) vorgespült. Danach wurde die Zellsuspension auf die Säule gegeben, wobei die gewünschte Population in der Säule zurückgehalten wurde. Der Durchfluss wurde verworfen und die MACS-Säule dreimal mit MACS-Puffer (0,5 ml) gespült. Anschließend wurden die magnetisch an die Säule gekoppelten T-Zellen (CD4<sup>+</sup> oder CD8<sup>+</sup>) eluiert, indem die Säule aus dem Magnetfeld entfernt, mit MACS-Puffer gefüllt (1 ml) und der Puffer mittels eines Stempel in ein Reaktionsgefäß (15 ml) gedrückt wurde. Abschließend wurden die Zellen ausgezählt, in HL-1 Medium (10<sup>6</sup> Zellen/ml) aufgenommen und für 48 h mit verschiedenen Antigenen stimuliert. Die Reinheit der so isolierten CD4<sup>+</sup>- oder CD8<sup>+</sup>-T-Zellen wurde mittels FACS-Analyse überprüft und lag über 90 %.

#### 2.2.5 Negativselektion von CD4<sup>+</sup>-T-Zellen aus der Milz

Die Negativselektion von CD4<sup>+</sup>-T-Zellen wurde mit Hilfe des *EasySep<sup>TM</sup> Mouse CD4<sup>+</sup> T Cell Enrichment Kit* (StemCell Technologies) entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt. Das Grundprinzip von *EasySep* basiert auf einem Magnetblock, der mit einem Röhrchen mit der markierten Zellsuspension bestückt wird. Durch die Anlagerung der positiv markierten Zellen an der Außenwand des Röhrchens, kann die negative Fraktion durch das Umdrehen des Magnetblocks abgekippt werden. Die Unterschied zur MACS-Isolation von CD4<sup>+</sup>-T-

Zellen besteht darin, dass die hier erhaltenen Zellen keine durch die Isolation bedingte Markierung tragen und sich somit besser für folgende Differenzierungsexperimente eignen. Zur negativen Selektion von CD4<sup>+</sup>-T-Zellen wurden 5\*10<sup>7</sup> Splenozyten nach vorheriger Lyse der Erythrozyten in *RoboSep*<sup>TM</sup> Puffer (500 µl) aufgenommen. Nach Zugabe von Rattenserum (25 µl) und *EasySep Mouse CD4<sup>+</sup> Isolation Cocktail* (25 µl) wurde die Probe gut durchgemischt und 10 min bei RT inkubiert. Danach erfolgte nach Zugabe von Streptavidin (37,5 µl) und gründlichem Durchmischen eine 2,5 minütige Inkubation bei RT. Vor der Isolation wurden die Röhren mit *RoboSep*<sup>TM</sup> Puffer auf 2,5 ml Gesamtvolumen aufgefüllt, gut durchgemischt und 2,5 min in den *EasySep*<sup>TM</sup> Magneten gestellt. Anschließend wurde das Röhren zusammen mit dem Magneten in einer einzigen, flüssigen Bewegung umgedreht und die gewünschte Zellfraktion in einem Reagenzröhrchen aufgefangen. Abschließend wurden die Zellen ausgezählt, in HL-1 Medium (10<sup>6</sup> Zellen/ml) aufgenommen und unter Th17-Bedingungen kultiviert. Die Reinheit der so isolierten CD4<sup>+</sup>-T-Zellen wurde durch FACS-Analyse überprüft und lag über 95 %.

### 2.2.6 Th17-Differenzierung

Um polarisierte Th17-Zelllinien zu erhalten, wurden naive CD4<sup>+</sup>-T-Zellen mit α-CD3 und α-CD28 (2 µg/ml) aktiviert und in Anwesenheit von rm-IL-6 (50 ng/ml), rh-TGF-β (5 ng/ml), rm-IL-23 (5 ng/ml), α-IFN-γ (10 µg/ml) und α-IL-4 (10 µg/ml) kultiviert. Dazu wurden die durch negative Selektion gewonnenen naiven CD4<sup>+</sup>-T-Zellen in Th17-Differenzierungsmedium (5\*10<sup>5</sup> Zellen/ml Medium) aufgenommen und in 24-well-Platten ausplattiert (0,5 ml/well). Zur Beschichtung wurden die verwendeten 24-well-Platten vorher für 2 h mit α-CD3 (2,5 µg/ml, 250 µl/well) bei 37 °C inkubiert und dreimal mit PBS gewaschen (500 µl/well). Fünf Tage nach Ansetzen der Kultur wurden die generierten Th17-Zellen für 5 h (nach einer Stunde Zugabe von 0,5 µl Golgi Stop) mit verschiedenen Antigenen stimuliert und durchflusszytometrisch analysiert.

### 2.2.7 Th17-Polarisierung von MOG<sub>35-55</sub>-spezifischen CD4<sup>+</sup>-T-Zellen

Hierzu wurden die CD4<sup>+</sup>-T-Zellen aus Milzen von EAE-Tieren (Tag 15 nach der Immunisierung) durch negative Selektion isoliert und in Anwesenheit von MOG<sub>35-55</sub> (20 µg/ml), rm-IL-6 (50 ng/ml), rh-TGF-β (5 ng/ml), rm-IL-23 (5 ng/ml), α-IFN-γ (10 µg/ml) und α-IL-4 (10 µg/ml) kultiviert. Fünf Tage nach Ansetzen der Kultur wurden die generierten MOG<sub>35-55</sub>-spezifischen Th17-Zellen für 5 h (0,5 µl Golgi Stop/well) mit verschiedenen Antigenen stimuliert und durchflusszytometrisch analysiert.

## 2.2.8 Generierung von Antigen-präsentierenden Zellen

Die in dieser Arbeit verwendeten APZ wurden aus hämatopoetischen Vorläuferzellen des Knochenmarks von weiblichen C57.BL/6 im Alter von 6-8 Wochen generiert. Hierfür wurde ein modifiziertes Protokoll nach Lutz et al. (1999) zur in vitro Generierung von dendritischen Zellen mit den Differenzierungsfaktoren GM-CSF und IL-4 angewendet. Zur Gewinnung der Knochenmarksvorläuferzellen wurden die Tiere durch zervikale Dislokation getötet und die Hinterläufe vom Torso der Tiere abgetrennt. Nachdem Femur und Tibia weitgehend vom Muskelfleisch befreit wurden, folgte eine 5 minütige Desinfektion in 70 % Ethanol bevor die Knochen in PBS überführt wurden. Anschließend wurden die Knochenenden mit einer Schere durchtrennt und die Stammzellen mit einer Spritze mit 5 ml sterilem PBS aus der Knochenhöhle gespült. Die erhaltene Zellsuspension wurde über einen Zellsieb (40 µm) filtriert und 10 min bei 1200g und 4 °C zentrifugiert. Nach Lyse der Erythrozyten wurde die Zellzahl bestimmt und auf  $2 \cdot 10^6$  Zellen/ml mit APZ Nährmedium eingestellt. Die weitere Verfahrensweise ist in Tabelle 2.19 dargestellt. Die generierten APZ wurden vor der weiteren Verwendung durchflusszytometrisch mit den Oberflächenmarkern CD11b, CD11c, F4/80 und Ly-6 charakterisiert [252].

**Tabelle 2.19: Generierung und Stimulation von APZ**

<b>Tag</b>	<b>Behandlung der APZ</b>
Tag 0	Aussaat der murinen Knochenmarkszellen in 6-well-Platten $3 \cdot 10^6$ Zellen/3 ml APZ-Medium
Tag 3	Zugabe von 3 ml APZ-Medium
Tag 6	Mediumwechsel, d.h Zentrifugation (1200g, 10 min, 4 °C), Abnahme von 3 ml Medium Resuspension mit 3 ml frischem APZ-Nährmedium
Tag 8	Abnahme des gesamten Mediums Resuspension in frischem APZ-Nährmedium Aussaat zu je $5 \cdot 10^5$ - Zellen/ml in 24-well-Platten Stimulation der APZ mit verschiedenen TLR-Liganden: HKPA und HKEB: $10^8$ /ml, LPS-PA: 1 µg/ml
Tag 9	Zentrifugation (1200g, 10 min, 4 °C) Aufnahme der beladenen APZ in HL-1 Nährmedium Ko-Kultivierung mit Thymozyten bzw. isolierten CD4 <sup>+</sup> - und CD8 <sup>+</sup> -T-Zellen

### 2.2.9 Isolierung mononukleärer Zellen aus dem ZNS

Zur Isolation mononukleärer Zellen aus dem ZNS wurde eine modifizierte Methode nach Pino et al. (2011) verwendet. Die Tiere wurden durch zervikale Dislokation getötet und mit PBS gespült. Nach der Präparation wurden Rückenmark und Gehirn in einer Petrischale mit einem Skalpell in möglichst kleine Stücke geschnitten und 45 min bei 37 °C im Schüttelinkubator mit Collagenase D/DNase-Lösung verdaut (1 ml pro Gehirn, 0,5 ml pro Rückenmark). Im Anschluss daran wurde das gewonnene Homogenisat mit einem Spritzenkolben durch ein Zellsieb (40 µm) gedrückt, mit PBS (20 ml) gewaschen und zentrifugiert (1200g, 10 min, 4°C). Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellt in RPMI-Medium (7 mL) resuspendiert. Die dadurch erhaltenen Zellsuspensionen wurden einer Aufreinigung mittels Percoll-Dichtegradientenzentrifugation unterzogen. Hierfür wurden in einem 15 ml Reagenzröhrchen 10 ml der 30 %igen Percoll-Lösung langsam über 2 ml einer 70 %igen Percoll-Lösung gelegt (siehe Tabelle 2.20). Eine Vermischung der beiden Schichten sollte vermieden werden. Die erhaltenen Gradienten wurden bei 500g für 30 min bei 18 °C unter minimaler Beschleunigung sowie ohne Bremsung zentrifugiert. Im Anschluss daran wurden die Myelin-Debris entfernt, die Interphase entnommen, mit PBS (30 ml) verdünnt, zentrifugiert (1200g, 10 °C, 4 min) und nochmals mit PBS (10 ml) gewaschen. Abschließend wurden die erhaltenen Zellpellets für folgende ELISpot-Experimente in HL-1 Nährmedium (2 ml pro Gehirn und Rückenmark) aufgenommen. Zudem wurden die erhaltenen Zellsuspensionen mittels FACS-Analyse hinsichtlich ihrer Zelldiversität charakterisiert [253].

**Tabelle 2.20: Herstellung der Percoll-Gradienten.**

100 %-Percoll-Lösung	9 Teile Percoll + 1 Teil HBSS ( <i>Hanks` s Balanced Salt Solution</i> ) 10x
70 %-Percoll-Lösung	7 Teile Stocklösung + 3 Teile HBSS 1x
30 %-Percoll Lösung	3 Teile Stocklösung + 7 Teile Zellsuspension
HBSS 1x	1 Teil HBSS 10x + 9 Teile H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>

## **2.3 Tierexperimentelle Methoden**

### **2.3.1 Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis (EAE)**

Die EAE wird aufgrund der klinischen und pathologischen Ähnlichkeiten als Tiermodell für MS genutzt. Typischerweise führt der Verlauf der klassischen EAE zu Gewichtsverlust und aufsteigenden schlaffen Lähmungserscheinungen, die mit atonischem Schwanz beginnen und sich im weiteren Verlauf auf die Hinter- und Vorderbeine ausbreiten. Die Pathogenese der EAE wird durch myelin-reaktive T-Zellen vermittelt. In der Peripherie kommt es zur Aktivierung myelinspezifischer T-Zellen durch APZ. Diese sind in der Lage, die BHS zu überwinden und in das ZNS einzuwandern und dort durch Aktivierung und Rekrutierung von entzündungsfördernden Immunzellen (Makrophagen und T-Zellen) eine Entzündungsreaktion zu initiieren. Die Folgen davon sind fortschreitende Demyelinisierung und Schädigung von Nervenfasern. In dieser Arbeit wurde die EAE mit Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein 35-55 (MOG<sub>35-55</sub>) induziert. Dieses Modell der EAE, in dem hauptsächlich CD4<sup>+</sup>-T-Zellen aktiviert werden, zeigt einen chronischen Krankheitsverlauf mit den ersten klinischen Symptomen ca. 9 Tage nach der aktiven Immunisierung und einem Maximum der Krankheit etwa 3-5 Tage nach Krankheitsbeginn [254-256].

### **2.3.2 Tierhaltung und Genehmigung der Tierversuche**

Es wurden weibliche Mäuse des Stamms C57.BL/6J im Alter von 6-8 Wochen verwendet. Diese wurden in der Tierversuchsanlage der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf unter kontrollierten Bedingungen gehalten und einem kontinuierlichen 12 Stunden Tag/Nachtrhythmus ausgesetzt. Die Tiere wurden in Gruppen mit bis zu 6 Mäusen pro Käfig gehalten und hatten freien Zugang zu Wasser und Nahrung. Gemäß Tierschutzgesetz waren die Tierversuche zuvor von der zuständigen Behörde, in diesem Fall vom Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen unter den Aktenzeichen 9.93.2.10.34.07.207 und 8.87.50.10.37.09.149 genehmigt worden.

### **2.3.3 Induktion der EAE**

Zur Induktion der EAE ist eine aktive Immunisierung mit einem synthetischen MOG-Protein notwendig. Zur Verstärkung der Immunantwort wurde Komplettes Freund-Adjuvans (*complete Freund adjuvans*, CFA), eine Wasser-in-Öl-Emulsion bestehend aus Paraffinöl, Mykobakterien und einem Emulgator (Arlacel A) verwendet. Zur Erhöhung der vaskulären Permeabilität der BHS und zur Induktion von autoreaktiven T-Zellen in der Peripherie wurde zusätzlich Pertussis Toxin (PTx) appliziert [257].

Die Immunisierung der Mäuse erfolgte mit einem Gemisch aus MOG<sub>35-55</sub>-Peptid und CFA. Zur Herstellung des Inokulums wurde MOG<sub>35-55</sub> (2 mg/ml in PBS) zusammen mit CFA (4 mg *Mycobacterium tuberculosis*/ml) in gleichen Teilen vermischt und mit zwei Spritzen über einen Drei-Wege-Hahn bis zu einer milchigen, homogenen Konsistenz emulgiert. Das erhaltene Reagenz wurde bis zur Applikation bei 4 °C gelagert. Zur Immunisierung wurden pro Tier zunächst 200 µl des Inokulums subkutan unter die Achsel des rechten Vorderbeines injiziert. Zusätzlich wurden direkt nach Verabreichen des Inokulums und 48 h später intraperitoneal 400 ng PTx (gelöst in 500 µl PBS) pro Tier appliziert.

### 2.3.4 Klinische Evaluation der Mäuse

Der Allgemeinzustand der Versuchstiere wurde täglich kontrolliert. Der Schweregrad der Lähmung wurde ab Tag 8 nach der Immunisierung mit klinischen Score-Punkten bewertet und dokumentiert. In Tabelle 2.21 sind die Klassifizierungen der Lähmungserscheinungen während der EAE aufgeführt. Mäuse, die während der EAE einen klinischen Score von 4,0 zeigten, wurden aus tierschutzrechtlichen Gründen aus dem Versuch genommen (Abbruchkriterium).

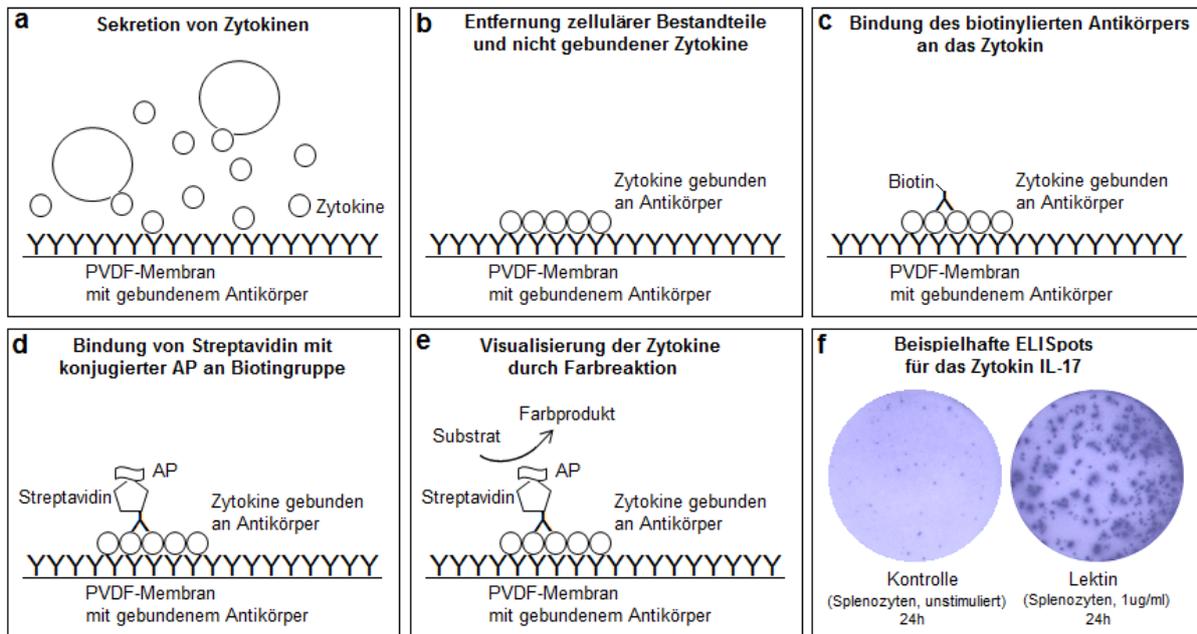
**Tab.2.21 Klassifizierung der Lähmungserscheinung während dem Verlauf der EAE**

Score	Schweregrad der Lähmungserscheinung
0,0	keine klinischen EAE Symptome
0,5	partielle Schwanzlähmung
1,0	vollständige Schwanzlähmung
1,5	partiell gestörter Aufrichtungsreflex
2,0	Maus dreht sich nicht selbstständig in aufrechte Position (Ataxie)
2,5	unilaterale Parese der Hinterbeine
3,0	bilaterale Parese der Hinterbeine
3,5	bilaterale Parese der Hinterbeine mit unilateraler Vorderbeinschwäche
4,0	Tetraparese (zusätzliche Parese der Vordergliedmaßen (Abbruchkriterium))
5	Tod

## 2.4 Quantifizierung sezernierter Zytokine mittels ELISpot-Assay

### 2.4.1 Prinzip der Methode

Der *Enzyme-linked Immunospot*-(ELISpot) Assay ist eine hochsensitive Methode zum Nachweis von spezifischer zellulärer Aktivität anhand der Sekretion von Effektormolekülen. Diese Effektormoleküle können Zytokine oder Antikörper sein, wobei quantitative Auswertungen sezernierter Antikörper nur sehr begrenzt möglich sind. Basierend auf dem Prinzip eines Sandwich-Enzymimmunoassays (ELISA) wird zunächst eine hydrophobe Polyvinylidenfluorid (PVDF) -Membran mit einem Antikörper beschichtet. Aufgrund hydrophober Wechselwirkungen wird der Antikörper an die PVDF-Membran adsorbiert und somit gebunden. Nach Beschichtung der Membran werden nicht gebundene Antikörper entfernt und freie unspezifische Proteinbindungsstellen blockiert. Anschließend wird die Membran mit einer definierten Anzahl der zu untersuchenden Zellsuspension und entsprechenden Antigenen überschichtet und über einen festgelegten Zeitraum inkubiert. Während der Inkubationszeit kommt es zur Sekretion zahlreicher Zytokine, wobei das zu untersuchende Zytokin von den an der Membran haftenden Antikörpern gebunden wird. Die zellulären Bestandteile, sowie nicht gebundene Effektormoleküle werden nach der Inkubationszeit durch gründliches Waschen entfernt. Die auf der PVDF-Membran gebundenen Antikörper-Zytokin-Komplexe werden mit einem biotinylierten-Antikörper inkubiert, der gegen die konstanten Fc-Teile des zu untersuchenden Zytokins gerichtet ist. Zur Detektion wird das an Streptavidin konjugierte homodimere Enzym alkalische Phosphatase (AP) verwendet. Streptavidin bindet aufgrund seiner hohen Affinität gegenüber Biotin an den Antikörper-Zytokin-Antikörper-Komplex. Die daran konjugierte AP erzeugt im letzten Schritt durch Umsetzung von 5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat (BCIP) und Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (NBT) einen blauen 5,5'-Dibrom-4,4'-dichlor-indigo-Farbstoff. Die dadurch entstandenen blauen Spots unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Fläche und Intensität, wobei jeder einzelne Spot ein Gebiet repräsentiert, innerhalb dessen eine Zytokinsekretion auf das Antigen reagiert. Jeder einzelne Spot entspricht somit dem Abdruck einer zytokinproduzierenden Zelle. Der Vorteil dieser Methode liegt zu einen in der bis zu 200fach höheren Sensitivität gegenüber ELISA-Assays und zum anderen Analyse von geringen Zellmengen. Abbildung 2.1 zeigt eine schematische Darstellung des ELISpot-Verfahrens.



**Abbildung 2.1: Schematische Darstellung des ELISpot-Verfahrens.** Die sezernierten Zytokine binden an den membrangebundenen Antikörper (a). Zelluläre Bestandteile und nicht gebundene Zytokine werden entfernt (b). Bindung des biotinylierten Antikörpers an die Fc-Region des Zytokins (c). Bindung von Streptavidin mit konjugierter AP an die Biotingruppe des Antikörpers (d). Visualisierung der gebundenen Zytokine durch Enzym-Substrat vermittelte Farbreaktion (e). Beispielhafte ELISpots für das Zytokin IL-17 (f).

## 2.4.2 Versuchsdurchführung

Der ELISpot-Assay wurde in 96-well MultiScreen<sub>HTS</sub>-Filter Platten mit PVDF-Membran (Merck Millipore) durchgeführt. Zur Beschichtung der Platten wurden die Antikörper in PBS verdünnt (siehe Tabelle 2.22) und über Nacht bei 4 °C inkubiert (100 µl/well). Am nächsten Tag wurde die Antikörperlösung entfernt und die Platten für 2 h mit 2,5%iger PBS-BSA-Lösung (100 µl/well) blockiert. Nach dreimaligem Waschen der Platten mit PBS (200 µl/well) wurden die vorbereiteten Einzelzellsuspension in HL-1-Medium (100 µl/well) ausgesät (siehe Tab. 2.23) und zusammen mit den verschiedenen Antigensuspension (100 µl/well) für 16 – 48 h bei 37 °C inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die Platten sechsmal mit PBS (200 µl/well) gewaschen und mit biotinylierten Antikörpern (siehe Tabelle 2.22) in PBS-BSA-Lösung (100 µl/well) über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach vier weiteren Waschschrritten mit PBS (200 µl/well) erfolgte eine Inkubation mit Streptavidin-AP in PBS-BSA-Lösung (100 µl/well, 0,4 µg/ml PBS-BSA) für 2 h bei RT. Nach erneutem dreimaligem Waschen wurden die Platten für 5 – 10 min mit Entwicklungslösung (siehe Tabelle 2.24) inkubiert und nach mehrmaligem Waschen mit kaltem Wasser bei RT im Dunkeln getrocknet.

**Tabelle 2.22: Antikörperlösungen**

<b>Antikörper zu Beschichtung</b>		<b>Biotinylierte Antikörper</b>	
	( $\mu\text{g/ml}$ PBS)		( $\mu\text{g/ml}$ PBS)
IL-1 $\beta$	2	IL-1 $\beta$	4
IFN- $\gamma$	4	IFN- $\gamma$	2
IL-2	4	IL-2	2
IL-4	4	IL-4	2
IL-5	2	IL-5	2
IL-6	2	IL-6	2
IL-17A	2	IL-17A	0,5

**Tabelle 2.23: Aussaat und Kultivierungsdauer der verwendeten Zellsuspensionen**

<b>Zellpopulation</b>	<b>Nährmedium</b>	<b>Ausgesäte Zellen (well)</b>	<b>Kultivierung (h)</b>
Thymus	HL-1(+Glu,+P/S)	$10^6$	16 – 48
Thymus IL-1 $\beta$	HL-1(+Glu,+P/S)	$2 \cdot 10^6$	48
Milz IFN- $\gamma$	HL-1(+Glu,+P/S)	$2,5 \cdot 5 \cdot 10^5$	24
Milz IL-2 – IL-17	HL-1(+Glu,+P/S)	$5 \cdot 10^5$	24
CD4 <sup>+</sup> -T-Zellen	HL-1(+Glu,+P/S)	$10^5$	48
CD8 <sup>+</sup> -T-Zellen	HL-1(+Glu,+P/S)	$10^5$	48
APZ	HL-1(+Glu,+P/S)	$5 \cdot 10^4$	24 - 48
Rückenmark	HL-1(+Glu,+P/S)	ca. $10^5$	24
Gehirn	HL-1(+Glu,+P/S)	ca. $10^5$	24

**Tabelle 2.24: Entwicklungslösung**

<b>Lösung</b>	<b>Pro Platte</b>
H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	9,6 ml
Entwicklungspuffer (25x)	0,4 ml
Lösung A (NBT)	0,1 ml
Lösung B (BCIP)	0,1 ml

### 2.4.3 Auswertung

Zur Auswertung der ELISpot-Platten wurde ein ELISpot-Reader (CTL) verwendet. Die Systeme besitzen als wesentliche Komponenten ein Mikroskop, eine Kamera die die Spots aufnimmt und einen PC mit spezieller Software zur Auswertung der digitalisierten Bilder. Für die automatische Auszählung der Spots sowie die abschließende Qualitätskontrolle der Zählung wurde die Software Immunospot 5.0 pro verwendet. Zudem wurden bei der Zählung der Durchmesser, die Spotfläche sowie die Intensität der zu zählenden Spots eingestellt. Dadurch konnten Artefakte und Verschmutzungen von der Zählung ausgeschlossen werden.

### 2.4.4 Verwendete Antigene

Für die Stimulation der Zellsuspensionen mit verschiedenen Antigenen wurden immer Doppelbestimmungen durchgeführt. Für einige Experimente wurden die Zellen zusätzlich mit  $\alpha$ -CD3-Antikörper (1  $\mu$ g/ml) aktiviert. In Tabelle 2.25 sind die verwendeten Antigene und deren getesteten Konzentrationen aufgeführt.

**Tabelle 2.25: Verwendete Antigene und deren getestete Konzentrationen**

Rezeptor	Verwendete Antigene	Abkürzung	Konzentrationen
TLR2	Heat-Killed <i>Escherichia coli</i> 0111:B4	HKEB	10 <sup>8</sup> /ml
	Heat-Killed <i>Helicobacter pylori</i>	HKHP	10 <sup>7</sup> - 5*10 <sup>8</sup> /ml
	Heat-Killed <i>Listeria monocytogenes</i>	HKLM	10 <sup>8</sup> /ml
	Heat-Killed <i>Legionella pneumophila</i>	HKLP	10 <sup>7</sup> - 5*10 <sup>8</sup> /ml
	Heat-Killed <i>Lactobacillus rhamnosus</i>	HKLR	10 <sup>8</sup> /ml
	Heat-Killed <i>Mycoplasma fermentans</i>	HKMF	10 <sup>7</sup> /ml
	Heat-Killed <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	HKPA	10 <sup>5</sup> - 10 <sup>8</sup> /ml
	Heat-Killed <i>Porphyromonas gingivalis</i>	HKPG	10 <sup>8</sup> /ml
	Heat-Killed <i>Staphylococcus aureus</i>	HKSA	10 <sup>8</sup> /ml
	Heat-Killed <i>Streptococcus pneumoniae</i>	HKSP	10 <sup>8</sup> /ml
	Peptidoglycan von <i>E.coli</i> K12	PGN-EK	1 – 10 $\mu$ g/ml
	Peptidoglycan von <i>E. coli</i> 0111:B4	PGN-EB	1 – 10 $\mu$ g/ml
	Peptidoglycan von <i>S. aureus</i>	PGN-SA	1 – 10 $\mu$ g/ml
	Lipoteichonsäure von <i>S. aureus</i>	LTA-SA	0,1 – 10 $\mu$ g/ml
	Lipoteichonsäure von <i>Bacillus subtilis</i>	LTA-BS	0,1 – 10 $\mu$ g/ml

TLR4	Lipopolysaccharid von <i>E. coli</i> K12	LPS	1 µg/ml
	Lipopolysaccharid von <i>P. aeruginosa</i>	LPS-PA	1 – 10 µg/ml
TLR5	Flagellin von <i>Salmonella typhimurium</i>	FLA-ST	6 – 600 ng/ml
TLR7	Imiquimod	R837	0,005 – 50 µg/ml
	Gardiquimod™		0,0025 – 5 µg/ml
Dectin-1	Beta-1,3 glucan von <i>Alcaligenes faecalis</i>	Curdlan AL	10 – 100 µg/ml
	Diphtherie Toxin	DTx	5 – 500 ng/ml
	Exotoxin A von <i>P. aeruginosa</i>	ExoA	0,001 – 1 µg/ml
	Lektin von <i>P. aeruginosa</i>		0,01 – 10 µg/ml
	Concanavalin A	ConA	0,1 – 10 µg/ml
	N-(3-Oxododecanoyl)-L-Homoserinlacton von <i>P. aeruginosa</i>	HSL	0,1 – 10 µg/ml
<i>Inflammason Inducer</i>	Aluminium Calciumsulfat Kristalle	Alumns	1 – 500 µg/ml
	Calciumpyrophosphat-dihydrat Kristalle	CPPD	1 – 300 µg/ml
	Hemozoin		0,5 – 350 µg/ml
	Harnsäure ( <i>monosodium urate</i> ) Kristalle	MSU	10 – 250 µg/ml
	Phorbol-12-myristat-13-acetat/	PMA/	50 ng/ml
	Ionomycin	Iono	1 µg/ml

## 2.5. Durchflusszytometrie

### 2.5.1 Prinzip der Methode

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie (*fluorescence-activated-cell-sorting*, kurz FACS) können Zellen aufgrund ihrer physikalischen Eigenschaften wie Größe und Struktur identifiziert werden. Das FACS besteht aus einer optischen und einer hydrodynamischen Komponente. Die hydrodynamische Fokussierung ermöglicht den konstanten Zellstrom, bei dem idealerweise nur eine Zelle pro Zeitpunkt durch den Laserfokus geführt wird. Das optische System besteht aus verschiedenen Lasern, Spiegeln, Linsen, Filtern und Detektoren. Trifft der Laser auf eine Zelle im Zellstrom, so wird das Laserlicht in zwei Hauptrichtungen reflektiert. Die abgelenkten Strahlen Vorwärtsstreulicht (Forward Scatter, FSC) korrelieren mit der Zellgröße, die des Seitwärtsstreulicht (Side Scatter, SSC) mit der Zellgranularität, also der

intrazellulären Komplexität zellulärer Strukturen. Des Weiteren können charakteristische Zellmerkmale (Oberflächenantigene, Transkriptionsfaktoren, Zytokine) durch Kopplung spezifischen, fluoreszenzgekoppelten Antikörpern detektiert werden. Die durch das Fluorochrom absorbierte Lichtenergie kann bei unterschiedlicher Wellenlänge emittiert werden. In Tabelle 2.26 sind die Absorptionsspektren der verwendeten Fluorochrome aufgeführt.

**Tab 2.26:** Absorptionsspektren der verwendeten Fluorochrome

<b>Fluorochrom</b>	<b>Kanal</b>	<b>Wellenlänge</b>
FITC (Fluoresceinisothiocyanat)	Green	525/30 nm
PE (Phycoerythrin)	Yellow	583/26 nm
PE-Cy5.5, PerCP-Cy5.5	Red1	690/50 nm
PE-Cy7	NIR1	785/70 nm
APC (Allophycocyanin), eFluor®660	Red2	661/19 nm
APC-Cy7, APC-H7, eFluor®780	NIR2	785/70 nm

### 2.5.2 Markierung toter Zellen mittels Fixable Viability Dye eFluor®

Zur Bestimmung der Anzahl vitaler Zellen nach Inkubation mit einem Antigen wurde ein mit eFluor®-gekoppelter *Fixable Viability Dye* verwendet. Der Vorteil dieser Methode ist, dass sich die Zellen anschließend fixieren, permeabilisieren und intrazellulär anfärben lassen, ohne dass die Signalstärke abnimmt. Hierfür wurden die gewonnenen Zellsuspension in HL-1-Nährmedium aufgenommen ( $5 \cdot 10^7$ /ml), in 96-well-Platten ausgesät (100 µl/well) und mit verschiedenen Antigenen (100 µl/well) für 24 h bei 37 °C inkubiert. Nach Waschen mit PBS (0,5 ml/Probe) wurden die Proben zentrifugiert (2400g, 4 °C, 4 min), in PBS aufgenommen (0,5 ml/Probe) und für 30 min mit *Fixable Viability Dye eFluor®* 660 oder 780 (je 0,5 µl/Probe) bei 4 °C unter Lichtausschluss inkubiert. Im Anschluss daran wurden die Proben zentrifugiert (2400g, 4 °C, 4 min), zweimal mit FACS-Puffer gewaschen und zur weiteren Verwendung in FACS-Puffer (0,5 ml/Probe) resuspendiert.

### 2.5.3 Extrazelluläre-Färbung

Zur Färbung von extrazellulären Marken mit fluoreszenzgekoppelten Antikörpern wurden die Zellen mit PBS gewaschen (0,5 ml/Probe) und mit *Fixable Viability Dye eFluor®* markiert. Nach einem Waschschrift mit PBS (0,5 ml/Probe) wurden die Proben für 15 min bei 4 °C mit FACS-Puffer blockiert (0,5 ml/Probe) und nochmals mit FACS-Puffer gewaschen (0,5

ml/Probe). Die Inkubation mit den entsprechenden Antikörpern erfolgte für 20 min bei 4 °C unter Lichtausschluss. Hierfür wurden die Antikörper 1:50 für bis 1:100 mit FACS-Puffer verdünnt und die Proben mit Antikörperlösung (50 µl) resuspendiert. Nach zweimaligem Waschen mit FACS-Puffer (0,5 ml/Probe) wurden die Zellen in FACS-Puffer (250 µl) aufgenommen und durchflusszytometrisch bestimmt.

#### **2.5.4 Intrazelluläre Färbung von Zytokinen**

Zur Bestimmung von intrazellulären Marker ist es erforderlich die Sekretion von Zytokinen aus dem Golgi Apparat zu hemmen und damit die Zytokinakkumulation in der Zelle zu fördern. Nach Stimulation der Zellen über einen bestimmten Zeitraum mit einem Antigen wurde den Proben Brefeldin A zugesetzt (1:1000) und für weitere 4 h (je nach Versuch auch 8-10 h) inkubiert. Nach zwei Waschvorgängen mit PBS (0,5 ml/Probe) wurden die Zellen mit *Fixable Viability Dye eFluor®660* markiert und im Anschluss daran für 15 min mit FACS-Puffer blockiert. Nach Färbung der extrazellulären Marker mussten die Zellen zur intrazellulären Färbung von Zytokinen fixiert und permeabilisiert werden. Dafür wurden die Proben in 250 µl Fixierlösung (*IC Fixation Buffer*, 4 % Paraformaldehyd) für 20 min unter Lichtausschluss inkubiert. Zur Permeabilisierung (Perm) wurden die Proben nach Zugabe von Perm-Puffer (0,5 % Saponin, 0,5 ml/Probe) zentrifugiert (2400g, 4 °C, 4 min) und weitere zweimal mit Perm-Puffer (0,5 ml/Probe) gewaschen. Die erhalten Proben wurden in Perm-Puffer über Nacht unter Lichtausschluss bei 4 °C aufbewahrt. Am nächsten Morgen wurden die Proben zentrifugiert (2400g, 4 °C, 4 min) und zur Färbung der intrazellulären Zytokine mit Antikörper-Lösung (1:50 in 50 µl Perm-Puffer) für 30 min unter Lichtausschluss inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit FACS-Puffer (0,5 ml/Probe) wurden die Zellen in FACS-Puffer (150 µl) aufgenommen und durchflusszytometrisch bestimmt.

#### **2.5.5 Extrazelluläre Färbung der Notch-Rezeptoren**

Zur Färbung der Notch Rezeptoren 1 - 4 wurden die Proben wie in Abschnitt 2.5.3 mit entsprechenden Antikörpern extrazellulär markiert und zur weiteren Verwendung gesplittet. Die Inkubation mit den entsprechenden Notch-Antikörpern erfolgte für 30 min bei 4 °C unter Lichtausschluss. Hierzu wurden die Antikörper mit FACS-Puffer verdünnt (1:50) und die Proben mit Antikörperlösung (50 µl) resuspendiert. Nach zweimaligem Waschen mit FACS-Puffer (0,5 ml/Probe) wurden die Zellen in FACS-Puffer (150 µl) aufgenommen und am Durchflusszytometer analysiert.

### 2.5.6 Intrazelluläre Färbung von FOXP3 und ROR $\gamma$ t

Zur intrazellulären Färbung von FOXP3 und ROR $\gamma$ t wurde das FOXP3 Fix/Perm Buffer Set von BioLegend verwendet. Isolierte CD4<sup>+</sup>-T-Zellen wurden unter Th17-Polarisationsbedingungen für 72 h mit verschiedenen Antigenen inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS (0,5 ml/Probe) wurden die Zellen mit *Fixable Viability Dye eFluor®780* markiert und im Anschluss daran für 15 min mit FACS-Puffer (0,5 ml/Probe) blockiert. Im Anschluss an die extrazelluläre Färbung von CD4 wurden die Proben zentrifugiert (2400g, 4 °C, 4 min) und nach Zugabe von FOXP3 Fix/Perm Lösung (0,5 ml/Probe) für 20 min unter Lichtausschluss bei RT inkubiert. Nach einem Waschschrift mit FACS-Puffer (0,5 ml/Probe) wurden die Proben mit FOXP3 Perm-Puffer (0,5 ml/Probe) gewaschen, in FOXP3 Perm-Puffer (0,5 ml/Probe) aufgenommen und für 15 min unter Lichtausschluss bei RT inkubiert. Zur Färbung von ROR $\gamma$ t und FOXP3 wurden die Proben für 30 min mit Antikörperlösung (1:100 50  $\mu$ l FOXP3 Perm-Puffer) unter Lichtausschluss bei RT inkubiert. Nach zwei Waschschriften mit FOXP3 Perm-Puffer (0,5 ml/Probe) und FACS-Puffer (0,5 ml/Probe) wurden die Zellen in FACS-Puffer (200  $\mu$ l) aufgenommen und analysiert.

### 2.5.7 Nachweis der Proliferation durch CFSE-Färbung

Die Fähigkeit der isolierten Zellen nach Kontakt mit entsprechenden Antigenen zu proliferieren wurde mittels 5-(6)-Carboxyfluorescein-Diazetat-Succinimidylester (CFSE) bestimmt. Das Fluorescein-Derivat ist in seiner ursprünglichen Form membranpermeabel und nicht fluoreszierend. Nach Diffusion in die Zelle kommt es durch intrazelluläre Esterasen zur Abspaltung von Azetatgruppen, wodurch CFSE in einen grünfluoreszierenden und membranimpermeablen Farbstoff umgewandelt wird. Durch kovalente Bindung der Succinimidyl-Gruppe an intrazelluläre Moleküle, wie Lysinreste oder ähnliche Aminogruppen kann der Farbstoff über einen längeren Zeitraum in der Zelle gehalten werden. Durch fortschreitende Zellteilungsprozesse kommt es zu einer gleichmäßigen Verdünnung des Farbstoffes auf die Tochterzellen. Durch Abnahme der Fluoreszenzintensität kann die Proliferationsrate mittels FACS-Analyse bestimmt werden.

Zur Färbung mit CFSE wurden  $2,5 \cdot 10^7$ -Zellen in 0,1 %iger PBS-BSA-Lösung (1 ml) aufgenommen und mit 5  $\mu$ mol/l CFSE (Stocklösung: 2 mM in DMSO) für 20 min bei 37 °C unter Lichtausschluss in horizontaler Position inkubiert. Nach Zugabe von CFSE-Waschpuffer (10 ml) wurden die Zellen zentrifugiert (1200g, 4 °C, 10 min) und weitere zweimal mit CFSE-Waschpuffer gewaschen. Im Anschluss daran wurden die CFSE-gefärbten Zellen ausgezählt, in Proliferations-Medium ( $2,5 \cdot 10^6$  Zellen/ml) aufgenommen, in 96-well-

Platten ausplattiert (100 µl/well) und durch Zugabe verschiedener Antigen-Lösungen (100 µl/well) für 72 h bei 37 °C inkubiert. Zur durchflusszytometrischen Charakterisierung der proliferierten Zellen wurden die Proben zusätzlich extrazellulär mit verschiedenen Markern gefärbt. Zum Ausschluss toter Zellen wurden die Proben kurz vor der Messung mit PI (5 µl/Probe) oder 7-AAD (5 µl/Probe) angefärbt.

### **2.5.8 Nachweis der Apoptose in Thymozyten mittels Annexin-Assay**

Zum Nachweis der Apoptose wurde ein Guava-Nexin Reagenz bestehend aus Annexin-V-PE Antikörper und PI verwendet. Annexin-V ist ein  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängiges Phospholipid-Bindeprotein, mit einer hohen Affinität für Phospholipid-Phosphatidylserine (PS) der Membran. PS findet sich normalerweise auf der Innenseite der Zellmembran lebender Zellen. Während der Apoptose wird PS schon frühzeitig auf die Außenseite der Zellen der Membran transloziert und kann durch Bindung mit markierten Annexin-V-Antikörpern detektiert werden. PI durchdringt die perforierte Zellmembran und dient der Identifikation der bereits toten Zellen. Zur Durchführung des Experiments wurden die isolierten Thymozyten in HL-1 Medium ( $2,5 \cdot 10^6/\text{ml}$ ) aufgenommen, in 96-well-Platten ausgesät (100 µl/well) und durch Zugabe von Antigenlösungen (100 µl/well) für 4 h bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss daran wurden die Proben zentrifugiert (2400g, 4 °C, 4 min) und in Annexin-V-Puffer (100 µl) aufgenommen. Nach Zugabe von Guava-Nexin Reagenz (100 µl) wurden die Proben für 20 min bei RT im Dunkeln inkubiert und durchflusszytometrisch analysiert.

### **2.5.9 Caspase-Assay**

Caspasen sind ein wichtiger Bestandteil der Enzymkaskade zur Induktion von Apoptose. Zum Nachweis der Caspase-Aktivität wurde ein Guava MultiCaspase SR Kit (Merck Millipore) verwendet. Zur Durchführung des Experimentes erfolgte eine Zellaussaat und Stimulation analog zum Annexin-Assay. Nach der vierstündigen Inkubationszeit wurden 100 µl Zellsuspension mit je 10 µl Caspase-3-7-SR und MultiCaspase-FAM für eine Stunde bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Die mitgelieferten Caspase-Lösungen mussten vor der Verwendung entsprechend mit PBS (1:25) verdünnt werden. Nach Zugabe von Apoptose Waschpuffer (100 µl/Probe) wurden die Proben zentrifugiert (2400g, 4 °C, 4 min) und nochmals mit Apoptose Waschpuffer (200 µl/Probe) gewaschen. Abschließend wurden die Proben mit 200 µl 7-AAD-Lösung (1:40 verdünnt in PBS) für 10 min bei RT inkubiert und am Durchflusszytometer analysiert.

### 2.5.10 IL-17 Sekretion Assay

Der IL-17 Sekretions Assay (Miltenyi Biotec) basiert auf einer bispezifischen CD45/IL-17A-Antikörper-Affinitäts-matrix (*IL-17 Catch Reagent*) zur Immobilisierung des IL-17 unweit der Zelloberfläche der IL-17 sezernierenden CD45-positiven Zellen. Zuerst heftet sich das *IL-17 Catch-Reagent* an lebende CD45-positive Zellen und bindet das sezernierte IL-17. Anschließend werden die Zellen durch das immobilisierte IL-17 mit einem an ein Fluorophor (PE) konjugierten  $\alpha$ -IL-17-Antikörper markiert und durch eine weitere Markierung mit anti-PE-Microbeads über MACS-Separation isoliert und durchflusszytometrisch analysiert.

Die Isolation von IL-17 sekretierenden Zellen wurde entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt. Hierfür wurden die isolierten Thymozyten in HL-1 Nährmedium ( $10^7$ /ml) aufgenommen, in 24-well-Platten (1 ml/well) ausgesät und für 16 h mit verschiedenen Antigenen stimuliert. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen mit PBS (10 ml / Probe) gewaschen, zentrifugiert (1200g, 4 °C, 10 min) und in gekühltem Nährmedium (80  $\mu$ l) aufgenommen. Nach Zugabe von *IL-17 Catch Reagent* (20  $\mu$ l) erfolgte eine fünfminütige Inkubation auf Eis bevor die Proben in warmen Nährmedium (10 ml) resuspendiert und für 45 min bei 37 °C unter ständigem Schütteln inkubiert wurden. Nach Zugabe von MACS-Puffer (5 ml) wurden die Proben zentrifugiert (1200g, 4 °C, 10 min), nochmals mit MACS-Puffer (10 ml) gewaschen und in MACS-Puffer (80  $\mu$ l) aufgenommen. Nach Zugabe von IL-17 *Detection-Antibody* (20  $\mu$ l) erfolgte eine Inkubation für 10 min auf Eis. Nach einem Waschschrift mit MACS-Puffer (10 ml) wurden die Zellen wiederum in MACS-Puffer (80  $\mu$ l) aufgenommen und mit Anti-Biotin-PE Antikörper (20  $\mu$ l) für 15 min auf Eis inkubiert. Zur Oberflächenfärbung wurden die Proben zeitgleich mit CD4-FITC und CD8a-APC inkubiert. Nach erneutem Waschen mit MACS-Puffer (10 ml) wurden die Zellen in MACS-Puffer (80  $\mu$ l) aufgenommen und nach Zugabe von Anti-PE-Microbeads (20  $\mu$ l) für 15 min bei 4 °C inkubiert. Nach einem Waschschrift mit MACS-Puffer (10 ml) wurden die Proben zur Separation in MACS-Puffer (0,5 ml) aufgenommen. Die Säulen (MS-Columns) wurden zwischenzeitlich in den Magnetständer eingespannt und mit MACS-Puffer (2\*0,5 ml) vorgespült. Nach Eluation der Zellsuspension durch das magnetische Feld, wurde die Säule mit MACS-Puffer gespült (3\*0,5 ml) und der Durchfluss verworfen. Anschließend wurden die magnetisch an die Säule gekoppelten Zellen eluiert, indem die Säule aus dem Magnetfeld entfernt, mit MACS-Puffer gefüllt (1 ml) und der Puffer mittels eines Stempel in ein Reaktionsgefäß (15 ml) gedrückt wurde. Abschließend wurden die gewonnenen Zellen zentrifugiert (1200g, 4 °C, 10 min), in FACS-Puffer (0,5 ml) aufgenommen und mittels Durchflusszytometrie analysiert.

### 2.5.11 Auswertung der FACS-Daten

In der vorliegenden Arbeit wurden die meisten Messungen mit einem Guava EasyCyte8 (Merck Millipore) durchgeführt, lediglich die Th17-polarisierten Zellen wurden an einem FACSCanto (BD Biosciences) gemessen. Die Auswertung der Daten erfolgte mit der Guava InCyte Software 2.2.2 und der FACS DIVA Software 6.5.1. Die Analysen sind als Dot Plots dargestellt. Hierbei wird das Ergebnis in korrelierten Zweiparameterdarstellungen visualisiert, wobei jeder Punkt (Dot) einer Zelle entspricht. Eine Teilmenge der Zellen, die innerhalb des Dot Plots liegt kann mit Hilfe von Gates (definierte Regionen) für weitere Analysen ausgewählt und in einem neuen Dot Plot dargestellt werden. Die Quantifizierung der gewünschten Population erfolgte immer in Prozent im Verhältnis zur Gesamtpopulation. Abb. 2.2 verdeutlicht die typische Vorgehensweise.

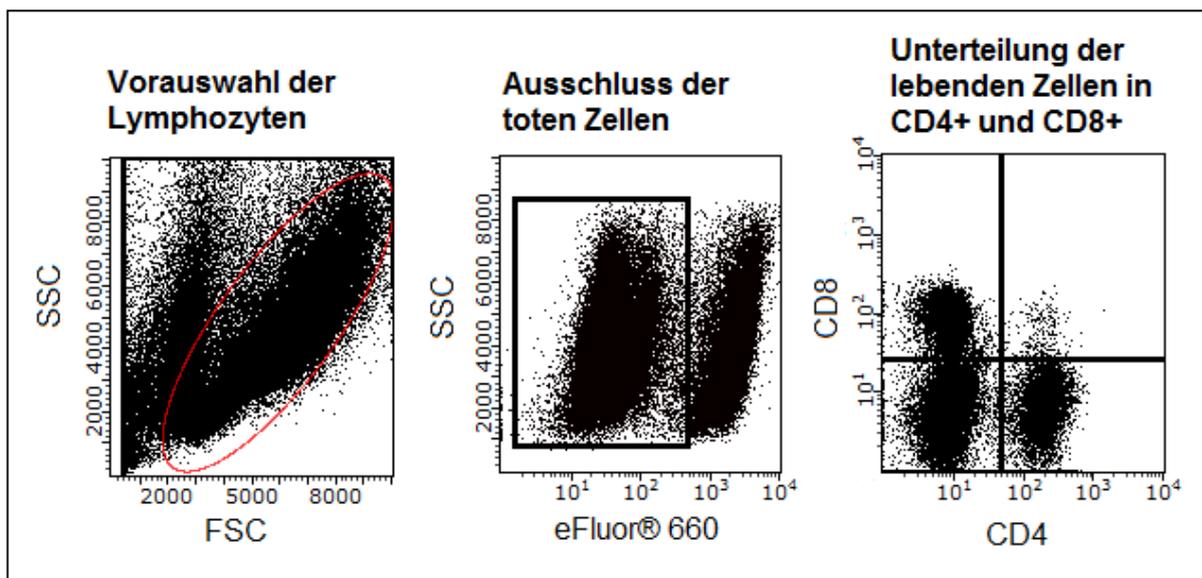


Abbildung 2.2: Vorgehensweise zur Auswertung der FACS-Daten am Beispiel von Milzzellen.

Sind die Zellen mit mehreren fluoreszenzgekoppelten Antikörpern markiert kommt es zur Überlagerung der Emissionsspektren einiger Fluoreszenzfarbstoffe. Von daher ist es notwendig durch die Kompensation Einschränkungen für die selektive Detektion der Signale eines Kanals durchzuführen. Dies erfolgte anhand von Einzelfärbungen mit den verschiedenen fluoreszenzgekoppelten Antikörpern und wurde vor jeder Messung durchgeführt. Da es sich um eine Relativmessung handelt wurde mit Hilfe von ungefärbten Kontrollen die Grenze zwischen negativen und positiven Populationen festgelegt.

## **2.6 Molekularbiologische Methoden**

### **2.6.1 RNA-Isolation aus Thymuszellen**

Zur Isolation der RNA wurde das RNeasy Mini Kit (Qiagen GmbH) verwendet. Das Prinzip beruht auf einer Bindung der RNA an eine Silika-Gel-Membran, auf der RNA durch mehrere Waschschriffe gereinigt und eluiert werden kann. Hierzu wurden Thymuszellen in 24-well Platten (20 Mio/1,5 ml HL-1 Medium) ausgesät und 48 h mit verschiedenen Antigenen inkubiert. Nach einem Waschvorgang mit PBS (0,5 ml/ Probe) wurden die Zellpellets in RLT-Puffer (350 µl) resuspendiert, auf eine QIAshredder-Säulen gegeben und für 2 min bei 14000 rpm zentrifugiert. Der Lysispuffer enthält Guanidium Isothiocyanat und wurde vor Verwendung mit β-Mercaptoethanol (1:100) versetzt. Anschließend wurde der klare Überstand mit 70 %igem Ethanol (350 µl) vermischt, auf eine RNeasy Mini-Säule gegeben und für 1 min bei 12000 rpm zentrifugiert. Die an der Silika-Gel-Membran absorbierte RNA wurde mit RWI-Puffer (350 µl) gewaschen und nach kurzer Zentrifugation (12000 rpm) für 15 min bei RT mit RNase-freier DNase (80 µl pro Säule, frisch angesetzt) inkubiert. Nach einem zweiten Waschschriff mit RWI-Puffer (350 µl/Säule) wurden die Säulen mit RPE-Puffer (500 µl) gewaschen und 1 min bei 12000 rpm zentrifugiert. Zur Trocknung der Membranen wurden die Säulen nochmals für 2 min bei 12000 rpm zentrifugiert. Zur Elution der absorbierten RNA wurde 30 µl RNase-freies Wasser auf die Säulen aufgetragen und 1 min bei 12000 rpm zentrifugiert. Das gewonnene RNA-Extrakt wurde auf Eis gekühlt und direkte zur cDNA-Synthese verwendet.

### **2.6.2 Konzentrationsbestimmung von RNA und DNA**

Der Nukleinsäuregehalt und die Reinheit einer Probe wurden durch eine spektral-photometrische Messung im UV-Bereich mit Hilfe des NanoDrop bestimmt. Hierzu wurden 1,5 µl Probenvolumen auf die Probenhalterung aufgetragen und gegen einen Leerwert (RNase-freies Wasser) gemessen. Das Verhältnis der Absorptionen von 260 nm zu 280 nm ( $OD_{260}/OD_{280}$ ) ist ein Maß für die Reinheit der RNA, wobei der Zielbereich hier zwischen 1,9 und 2,1 lag. Eine optische Dichte von 1 entspricht bei 260 nm 40 µg/ml ssRNA.

Formel zur Berechnung der Nukleinsäurekonzentration: RNA:  $40 \times OD_{260} = \text{ng RNA}/\mu\text{l}$

### **2.6.3 cDNA-Synthese**

Um aus einer RNA-Matrize cDNA zu erhalten, wurde das SuperScript® III First-Strand Synthesis System für RT-PCR (Life Technologies) verwendet. Hierzu wurden pro Ansatz

zwischen 0,20 µg und 1 µg isolierte mRNA aus Thymuszellen verwendet. Im ersten Schritt wurden in 0,5 ml Reaktionsgefäßen folgende Komponenten pipettiert:

**Tabelle 2.27: Reaktionsansatz**

<b>Komponente</b>	<b>Menge in µl</b>
0,25 – 1 µg mRNA	n
Primer (50 µM oligo(dT) <sub>20</sub> )	1
dNTP Mix (10 mM)	1
DEPC-treated water	(8 - n)
Gesamtvolumen	10

Die Reaktionsansätze wurden kurz durch Zentrifugation gesammelt und für 15 min bei 65 °C inkubiert. Nach einem kurzen Kühlvorgang auf Eis erfolgte die Zugabe von 10 µl cDNA Synthese Mix, bestehend auf folgenden Komponenten:

**Tabelle 2.28: cDNA-Synthese Mix**

<b>Komponente</b>	<b>Menge in µl</b>
10x RT Puffer	2
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	4
DTT (0,1 M)	2
RNaseOUT™ (40 U/µl)	1
SuperScript® III RT (200 U/µl)	1

Nach kurzer Zentrifugation erfolgte eine Inkubation für 50 min bei 50 °C. Im Anschluss daran wurde zur Deaktivierung der Transkriptase die Temperatur für 5 min auf 85 °C erhöht. Abschließend wurden zur Entfernung der restlichen RNA 1 µl RNase H hinzugegeben und für 20 min bei 37 °C inkubiert. Die gewonnen cDNA wurde bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

#### **2.6.4 Quantitative Real-time PCR (qRT-PCR)**

Das Prinzip dieser Methode basiert auf der Detektion eines während der Amplifikation entstehenden Fluoreszenzsignals, welches proportional mit der Menge der PCR-Produkte zunimmt. Für die relative Quantifizierung der PCR-Produkte wurde der unspezifische Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green I verwendet. Dieser interkaliert während der PCR-

Reaktion in dem entstehenden DNA-Doppelstrang, wodurch die Fluoreszenz des Farbstoffs enorm ansteigt und detektiert werden kann.

Vor Beginn der Experimente mit den gewonnenen cDNA-Proben aus Thymuszellen wurde die optimale Konzentration jedes Primerpaares getestet. Alle Primer konnten in einer Konzentration von 0,75  $\mu\text{M}$  eingesetzt werden. Für einen PCR-Ansatz mit einem Gesamtvolumen von 20  $\mu\text{l}$ /well wurden pro Reaktion die in Tabelle 2.29 aufgeführten Reagenzien in eine MicroAmp® Optical 96 well Platte zusammenpipettiert.

**Tabelle 2.29.: Zusammensetzung des PCR-Ansatzes**

Reagenz	Volumen in $\mu\text{l}$
SYBR-Green Master Mix 2x	10
<i>forward</i> -Primer	1,5
<i>reverse</i> -Primer	1,5
DEPC-Wasser	6
cDNA (4,7 – 5,9 ng)	1

Die PCR wurde in Doppelbestimmungen unter folgenden Standardeinstellungen durchgeführt:

**Tabelle 2.30: Standardeinstellungen für die PCR**

Dauer	Temperatur	
2 min	50 °C	
10 min	95 °C	
15 sec	95 °C	40 – 45 Zyklen
60 sec	60 °C	

Zur Überprüfung der Spezifität der PCR-Produkte wurde am Ende jeder Reaktion eine Schmelzkurvenanalyse des Amplifikats von 55 – 95 °C, mit einer Erhöhung von 0,5 °C pro 30 sec aufgenommen.

### 2.6.5 Auswertung der PCR-Daten

Zur Normalisierung der Expression wurden die Housekeeping-Gene (HKG)  $\beta$ -actin und GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) verwendet. Dadurch können unterschiedliche RNA-Isolierungseffizienzen, Fehler der Transkription und Gewebe- bzw. Matrixeffekte ausgeglichen werden, da gleichermaßen die HKG und das Zielgen betroffen

sind. Zur relativen Quantifizierung wurde die sogenannte  $\Delta\Delta\text{Ct}$  – Methode verwendet. Der Ct-Wert (*cycle threshold*) beschreibt den Abschnitt einer Kurve, in dem die Fluoreszenz erstmals exponentiell über den Hintergrundwert ansteigt. Als unbehandelte Kontrollprobe diente zum einen die RNA aus den unstimulierten Thymozyten, und zum anderen aus den mit  $\alpha\text{-CD3}$  stimulierten Thymuszellen. Die relative Genexpressionsrate eines Zielgens wurde nach folgenden Formeln bestimmt:

$$\Delta\text{Ct} = \text{Ct Zielgen} - \text{Ct HKG}$$

Anschließend wurde der  $\Delta\Delta\text{Ct}$  gebildet:

$$\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct Behandlung} - \Delta\text{Ct Kontrolle}$$

Der relative Expressionsunterschied errechnet sich aus:

$$\text{Relative Expression} = 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$$

Dieses Berechnungsmodell geht von einer Verdopplung der DNA Menge pro Zyklus aus, was oft nicht der Praxis entspricht. Zur Berechnung der Effizienz wurden mit repräsentativen Mischproben (zusammengesetzt aus allen verwendeten cDNA-Proben) Standardkurven aus unterschiedlichen Verdünnungsstufen erstellt. Die eingesetzte Menge an cDNA wurde in einer logarithmischen Funktion gegen die Ct-Werte aufgetragen. Die Effizienz berechnet sich schließlich nach der Gleichung:

$$E = 10^{(-1/\text{Steigung})}$$

Da sich alle berechneten PCR-Effizienzen (siehe Anhang) in einem kleinen Bereich bewegen und einen Mittelwert von 2,06 bilden, wurde für alle Berechnungen eine ideale Effizienz von  $E = 2$  angenommen.

## 2.7 Statistische Analysen

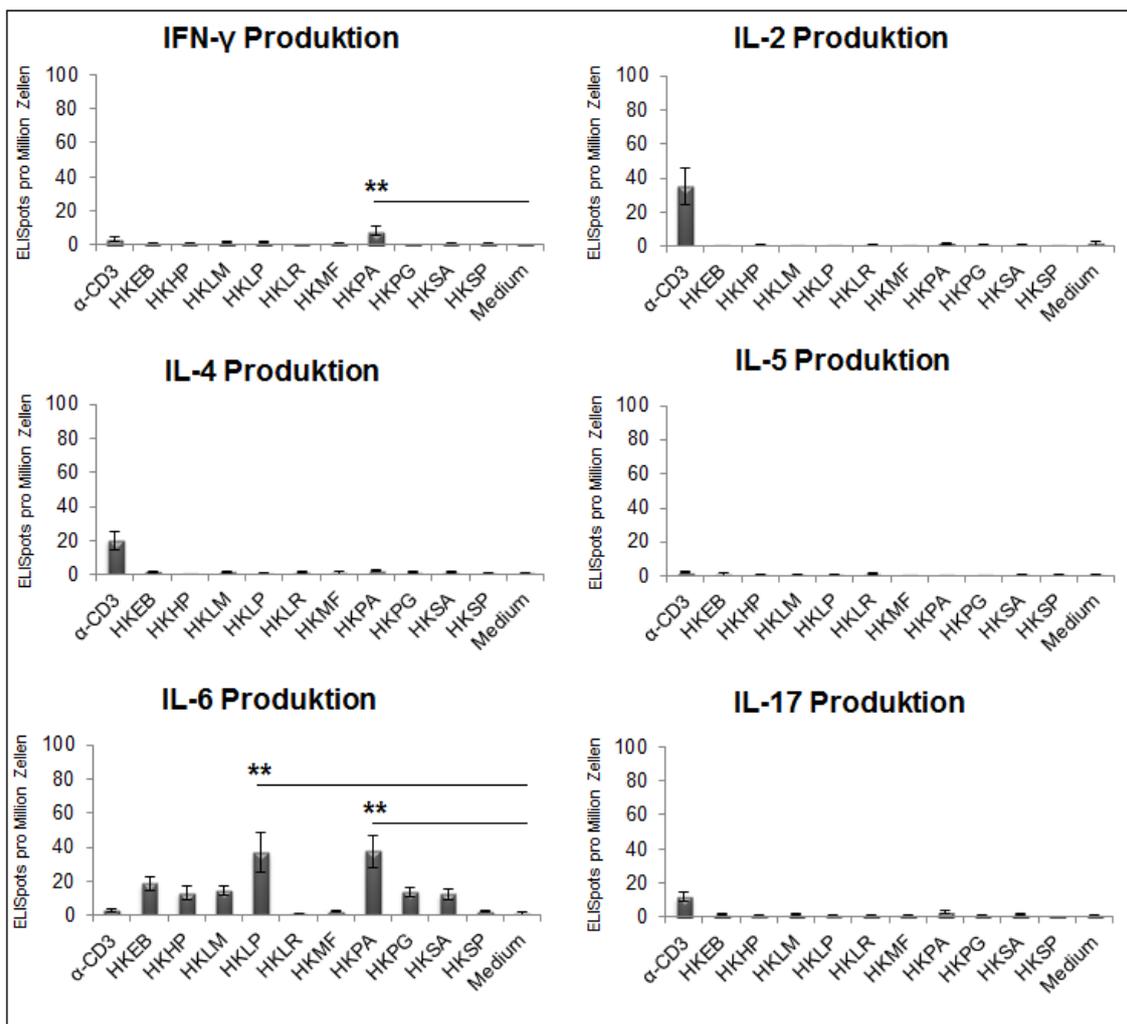
Die statistische Auswertung wurde mit Hilfe der GraphPad Prism Software (GraphPad software, Inc., San Diego, USA) und Microsoft Excel durchgeführt. Die Ergebnisse sind als Mittelwert  $\pm$  SEM (Standardfehler) dargestellt. Zur statistischen Analyse wurde der gepaarte Student's T-Test verwendet. Werte von  $p < 0,05$  (\*) wurden als statistisch signifikant, Werte von  $p < 0,01$  (\*\*) als statistisch hoch signifikant angesehen. Alle p-Werte  $> 0,05$  wurden als statistisch nicht signifikant bezeichnet.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Beeinflussung der Zytokinproduktion von Thymuszellen

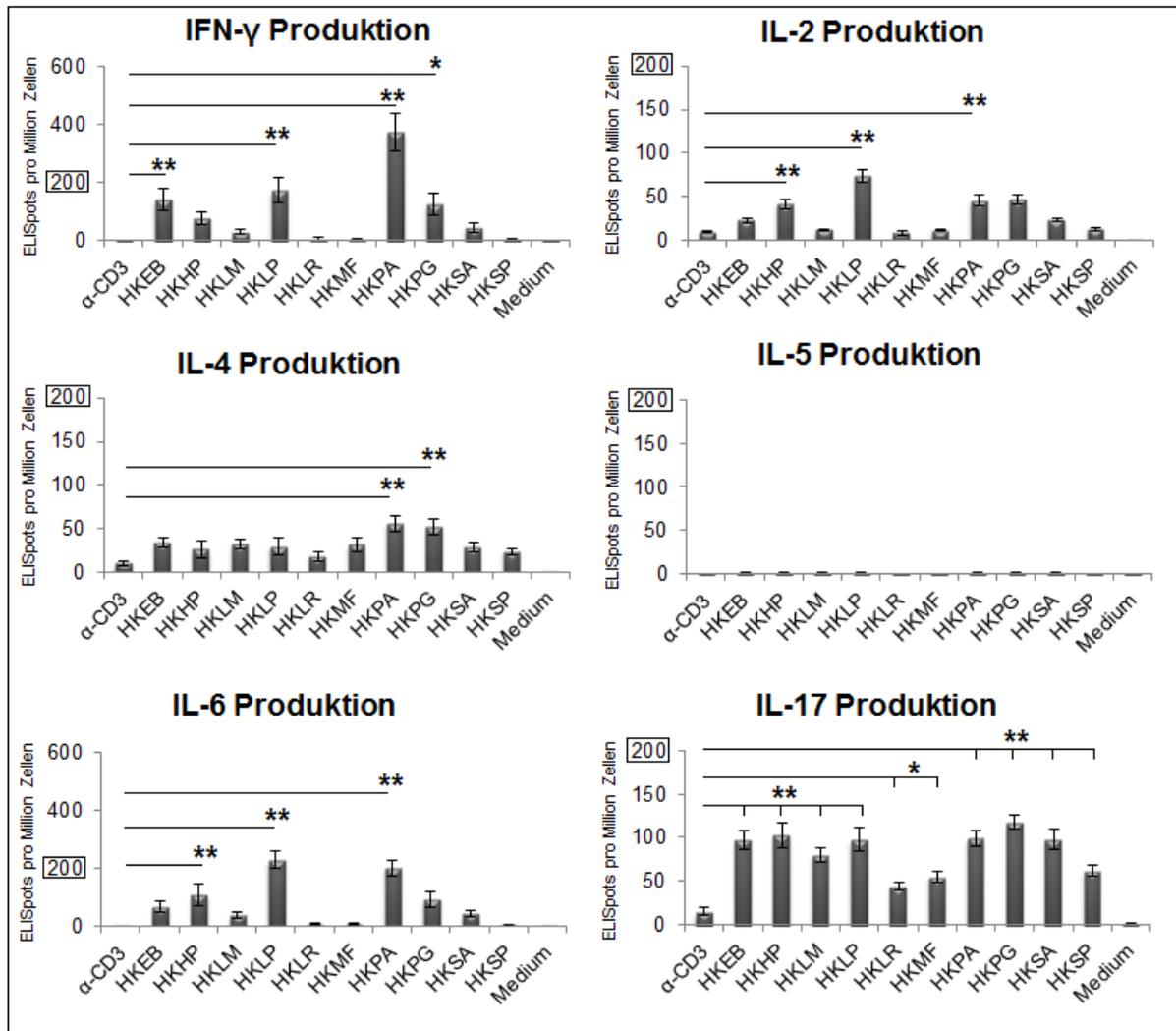
##### 3.1.1 Einfluss von Bakterien auf die Zytokinproduktion von Thymuszellen

*In vitro* wurde der Einfluss von verschiedenen hitze-getöteten Bakterien auf die Produktion pro- und anti-inflammatorischer Zytokine von Thymuszellen untersucht. Die Erkennung aller verwendeten Bakterien durch das Immunsystem verläuft über den TLR2. Aus Abb. 3.1 geht hervor, dass nur Stimulation mit HKPA die IFN- $\gamma$  Produktion erhöht. Zudem konnte eine statistisch hoch signifikant erhöhte IL-6 Sekretion nach Stimulation mit HKLP und HKPA beobachtet werden. Für die anderen getesteten Zytokine konnte keine erhöhte Zytokinsekretion durch den Einfluss von hitze-getötetem Bakterien nachgewiesen werden.



**Abbildung 3.1: Einfluss von hitze-getöteten Bakterien auf die Zytokinproduktion von Thymuszellen.**

Thymuszellen von weiblichen C57.BL/6 Mäusen (6-8 Wochen) wurden zu  $10^6$ -Zellen pro well ausgesät und mit  $10^7$ /ml HKMF,  $5 \cdot 10^7$ /ml HKHP und HKLP bzw.  $10^8$ /ml HKEB, HKLM, HKLR, HKPA, HKPG, HKSA und HKSP stimuliert. Nach 20 h Inkubationszeit wurde die Zytokinproduktion mittels ELISpot Assay ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM aus zwei unabhängigen Experimenten mit n=8 Mäusen. Signifikante Unterschiede sind mit Sternen gekennzeichnet (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ).

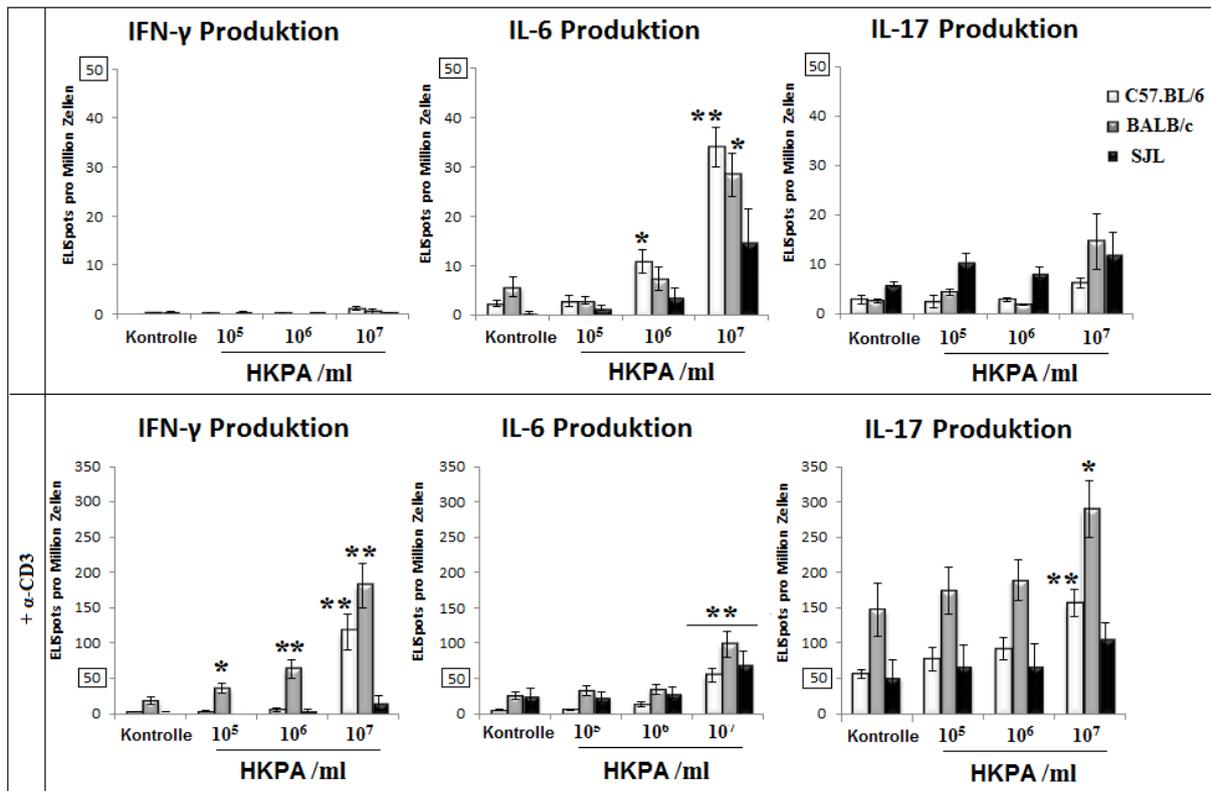


**Abbildung 3.2: Einfluss von hitze-getöteten Bakterien auf die Zytokinproduktion von Thymuszellen nach gleichzeitiger Co-Aktivierung mit  $\alpha$ -CD3.** Thymuszellen von weiblichen C57.BL/6 Mäusen (6-8 Wochen) wurden zu  $10^6$ -Zellen pro well ausgesät und mit  $10^7$ /ml HKMF,  $5 \cdot 10^7$ /ml HKHP und HKLP bzw.  $10^8$ /ml HKEB, HKLM, HKLR, HKPA, HKPG, HKSA und HKSP in Kombination mit  $\alpha$ -CD3 (1  $\mu$ g/ml) stimuliert. Nach 20 h Inkubationszeit wurde die Zytokinproduktion mittels ELISpot Assay ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM aus zwei unabhängigen Experimenten mit n=8 Mäusen. Signifikante Unterschiede sind mit Sternen gekennzeichnet (\* p < 0,05; \*\* p < 0,01).

Zur Untersuchung kostimulatorischer Effekte von hitze-getöteten Bakterien auf die Zytokinproduktion wurden die Thymuskulturen zusätzlich mit  $\alpha$ -CD3 stimuliert. Durch diese zusätzliche Aktivierung des TZR mit  $\alpha$ -CD3 konnten deutlich erhöhte Zytokinsekretionen ermittelt werden. Wie in Abb. 3.2 dargestellt, konnten lediglich für IL-5 keine kostimulatorischen Effekte detektiert werden. Für IFN- $\gamma$  konnten nach Stimulation mit HKEB, HKLP und HKPA statistisch hoch signifikant erhöhte Sekretionen ermittelt werden, statistisch signifikant erhöht nach Stimulation mit HKPG. Zudem konnte nach Stimulation mit HKPA und HKPG eine statistisch hoch signifikant erhöhte IL-4 Sekretion beobachtet werden. Für die Zytokine IL-2 und IL-6 konnten nach Stimulation mit HKHP, HKLP und

HKPA statistisch hoch signifikant erhöhte Sekretionen festgestellt werden. Der am stärksten ausgeprägte kostimulatorische Effekt konnte für IL-17 ermittelt werden. Für alle getesteten Bakterien konnten statistisch signifikant erhöhte IL-17 Antworten detektiert werden.

Um einen speziesabhängigen Effekt hinsichtlich der Zytokinausschüttung von Thymuszellen genauer zu untersuchen, wurden drei genetisch unterschiedliche Mausstämmen mit verschiedenen Konzentrationen HKPA stimuliert. Wie aus Abb. 3.3 hervorgeht, konnten lediglich für das IL-6 statistisch signifikant erhöhte Ausschüttungen detektiert werden.



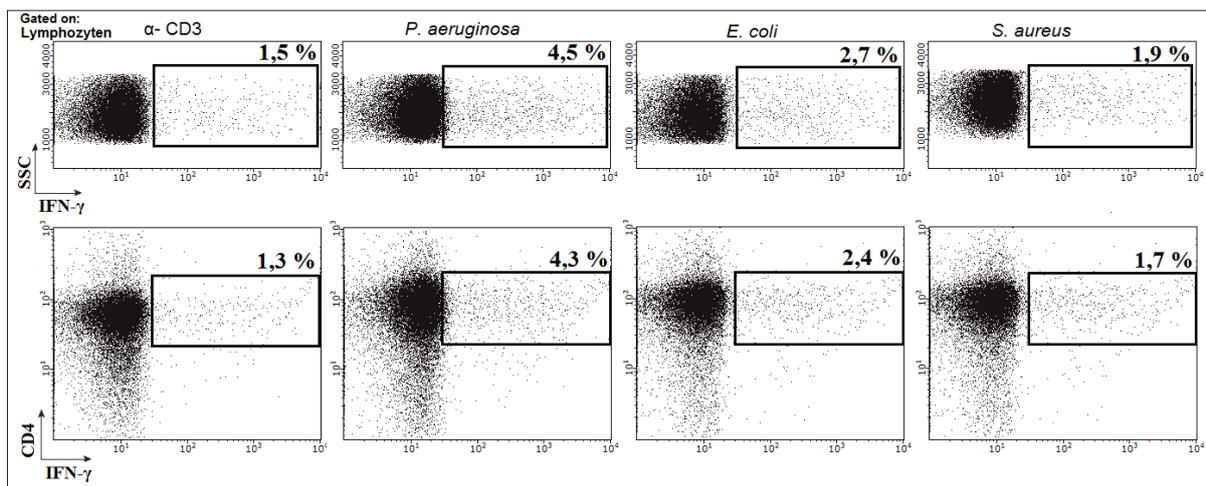
**Abbildung 3.3: Konzentrationsabhängigkeit der Zytokinantwort nach Stimulation mit HKPA.**

Thymuszellen von weiblichen C57.BL/6, BALB/c und SJL Mäusen (6-8 Wochen) wurden zu  $10^6$ -Zellen pro well ausgesät und mit  $10^5 - 10^7$ /ml HKPA  $\pm \alpha$ -CD3 ( $1\mu\text{g}/\text{ml}$ ) stimuliert. Nach 20 h Inkubationszeit wurde die Zytokinproduktion mittels ELISpot Assay ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM aus zwei unabhängigen Experimenten mit 4-8 Mäusen (ohne  $\alpha$ -CD3  $n=4$ ; mit  $\alpha$ -CD3  $n=8$ ). Signifikante Unterschiede sind mit Sternchen gekennzeichnet (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ).

Nach Koaktivierung mit  $\alpha$ -CD3 zeigten alle getesteten Spezies einen konzentrationsabhängigen Anstieg von IL-6, statistisch hoch signifikant nach Stimulation mit  $10^7$  HKPA/ml in allen getesteten Mausstämmen. Bereits nach  $10^5$ /ml HKPA konnte eine statistisch signifikant erhöhte IFN- $\gamma$  Ausschüttung in BALB/c Mäusen nachgewiesen werden, in C57.BL/6-Mäusen hingegen erst nach Stimulation mit  $10^7$  HKPA/ml. Hinsichtlich der IL-17 Sekretion konnte für C57.BL/6 und BALB/c Mäuse ein leichter konzentrationsabhängiger Anstieg beobachtet werden, statistisch signifikant nach Simulation mit  $10^7$  HKPA/ml.

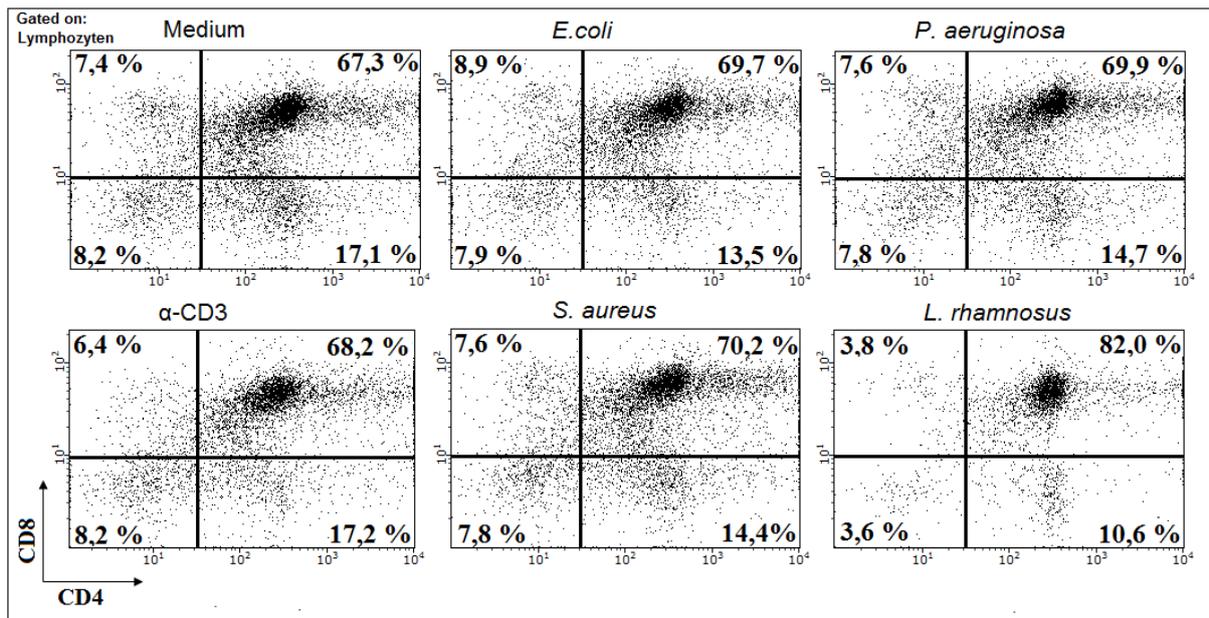
### 3.1.2 IFN- $\gamma$ wird hauptsächlich von CD4<sup>+</sup>-Thymuszellen produziert

Zur näheren Untersuchung der IFN- $\gamma$  produzierenden Subpopulationen wurden Thymuszellen mit HKPA, HKEB und HKSA in Kombination mit  $\alpha$ -CD3 für 20 h inkubiert und die intrazelluläre IFN- $\gamma$  Konzentration mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Wie in Abb. 3.4 (obere Reihe) dargestellt, führte eine Kostimulation mit HKPA (4,5 %) zu einer 3% höheren Anzahl IFN- $\gamma$  produzierender Thymuszellen im Vergleich zur  $\alpha$ -CD3 Kontrolle (1,5 %). Auch nach Stimulation mit HKEB (2,7 %) und HKSA (1,9 %) konnte eine erhöhte Anzahl an IFN- $\gamma$  produzierenden Zellen nachgewiesen werden. Zudem konnte gezeigt werden, dass der Hauptteil der IFN- $\gamma$  Produzenten CD4<sup>+</sup>- T-Zellen sind. Hierrunter befinden sich sowohl die CD4<sup>+</sup>-, als auch die CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>- Thymozyten.



**Abbildung 3.4: Intrazelluläre IFN- $\gamma$  Färbung von Thymuszellen nach Stimulation mit hitze-getöteten Bakterien.** Thymuszellen von weiblichen C57.BL/6 Mäusen (6-8 Wochen) wurden mit  $\alpha$ -CD3 (1  $\mu$ g/ml) aktiviert und mit  $10^8$ /ml HKPA, HKEB und HKSA für 20 h stimuliert. 4 h vor Ende der Restimulationszeit wurde Brefeldin A zu den Zellen gegeben. Nach Färbung mit *Fixable Viability Dye*® 660 wurden die Oberflächen mit CD4 und CD8, sowie das Zytokin IFN- $\gamma$  gefärbt und mittels FACS analysiert. Dargestellt sind die IFN- $\gamma$  positiven Zellen als *frequency of parent* bezogen auf alle Zellen (obere Reihe) und bezogen auf CD4<sup>+</sup>-T-Zellen (untere Reihe) nach dem Ausschluss toter Zellen. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment (n=4).

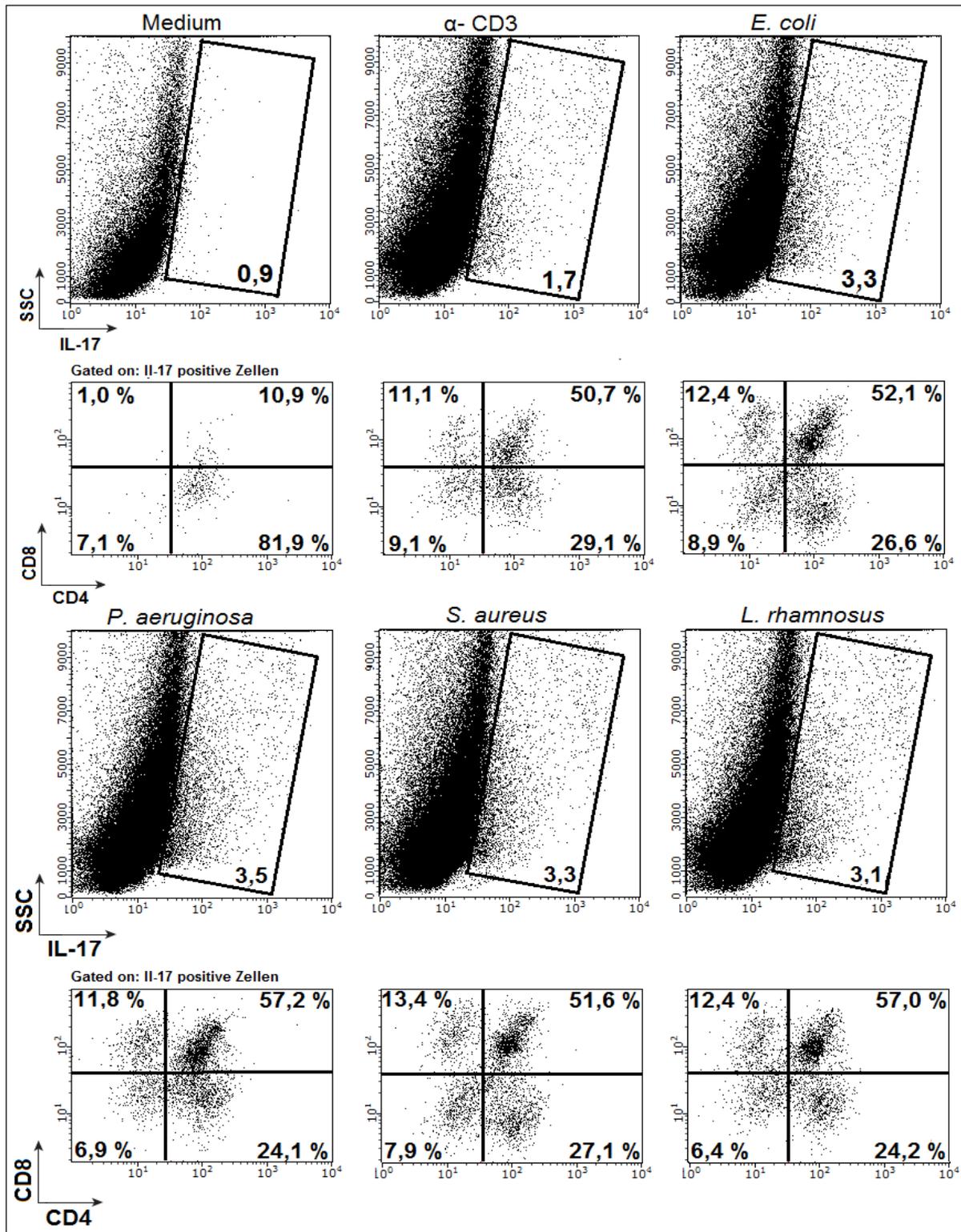
Zusätzlich wurden die stimulierten Thymuskulturen hinsichtlich ihrer phänotypischen Veränderung der Subpopulationen nach dem Einfluss verschiedener hitze-getöteten Bakterien untersucht. Aus Abb. 3.5 geht hervor, dass Stimulation mit  $\alpha$ -CD3, HKPA und HKEB keinen Einfluss auf die prozentuale Verteilung der CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>- Subpopulationen hatte. Lediglich nach Stimulation mit HKLR (82,0 %) konnten deutlich erhöhte Anteile an CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>- T-Zellen im Vergleich zur Kontrolle (67,3 %) detektiert werden.



**Abbildung 3.5: FACS-Analyse der Oberflächenmoleküle CD4 und CD8 nach Stimulation mit hitze-getöteten Bakterien.** Thymuszellen von weiblichen C57.BL/6 Mäusen (6-8 Wochen) wurden mit  $\alpha$ -CD3 (1  $\mu$ g/ml), HKPA, HKEB, HKSA und HKLR (jeweils  $10^8$ /ml) für 20 h stimuliert. Nach Färbung mit *Fixable Viability Dye*® 660 wurden die Oberflächen mit CD4 und CD8 gefärbt und durchflusszytometrisch bestimmt. Dargestellt sind die prozentualen Anteile CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>- und CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>-T-Zellen nach dem Ausschluss toter Zellen. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment (n=3).

### 3.1.3 IL-17 wird hauptsächlich von CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>-Thymuszellen produziert

Zur genaueren Identifikation IL-17-produzierender Subpopulationen im Thymus wurden die Zellen mit  $\alpha$ -CD3 aktiviert und zusätzlich mit HKEB, HKPA, HKSA und HKLR für 20 h inkubiert. Das sekretierte IL-17 wurde mit Hilfe des IL-17-Sekretions-Assays an deren produzierende Zelle gebunden, mittels MACS-Separation angereichert und durchflusszytometrisch analysiert. Wie in Abb. 3.6 dargestellt, konnte für alle getesteten Antigene ein höherer Anteil IL-17-produzierender Thymuszellen detektiert werden. Während durch  $\alpha$ -CD3 Aktivierung (1,7 %) bereits deutlich höhere Werte im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle (0,7 %) detektiert werden konnten, verdoppelt sich nach Stimulation mit den verschiedenen hitze-getöteten Bakterien nochmals die Anzahl IL-17 sekretierender Thymuszellen. Zudem zeigte sich, dass die CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>- T-Zellen den Hauptanteil der IL-17-Produktion übernehmen. Der gemessene prozentuale der IL-17 produzierenden CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>-T-Zellen lag bei alle gestesteten Antigenen über 50%, der Anteil der CD4<sup>+</sup>-T-Zellen zwischen 20 und 30 %.



**Abbildung 3.6: FACS-Analyse von IL-17 nach Anreicherung mittels MACS-Separation.** Thymuszellen von weiblichen C57.BL/6 Mäusen (6-8 Wochen) wurden mit  $\alpha$ -CD3 (1  $\mu$ g/ml) aktiviert und mit  $10^8$ /ml HKPA, HKEB, HKSA und HKLR für 20 h stimuliert. Nach Anreicherung der IL-17-produzierenden Zellen mittels MACS-Separation und Färbung der Oberflächen mit CD4 und CD8 wurden die Proben am Durchflusszytometer analysiert. Dargestellt ist die IL-17 Produktion in Prozent als *frequency of parent* bezogen auf alle Zellen (obere Reihe) und die prozentualen Anteile der IL-17-produzierenden CD4<sup>-</sup>, CD8<sup>-</sup>, CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>- und CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>- T-Zellen (untere Reihe). Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment (n=3).

### 3.1.4 Bakterien haben keinen proliferationsfördernden Effekt auf DP- Thymuszellen

Zur Untersuchung des Einflusses von Bakterien auf die Proliferation wurden Thymuszellen mit CFSE gefärbt und für 72 h mit verschiedenen Bakterien inkubiert. Für kein getestetes Bakterium konnte ein proliferationsfördernder Effekt von CD4<sup>+</sup> (inklusive CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>) - Thymuszellen ermittelt werden (Abb. 3.7). Für die Subpopulation der DN-Thymozyten hingegen konnte für alle Bakterien eine erhöhte Proliferationsrate detektiert werden, am deutlichsten nach Stimulation mit HKPA (5,58 %) und HKEB (6,48 %) im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle (0,61 %).

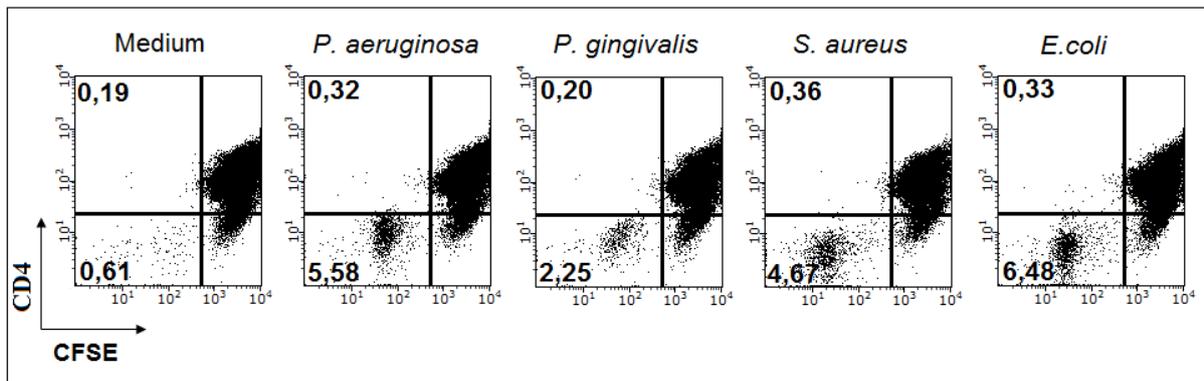
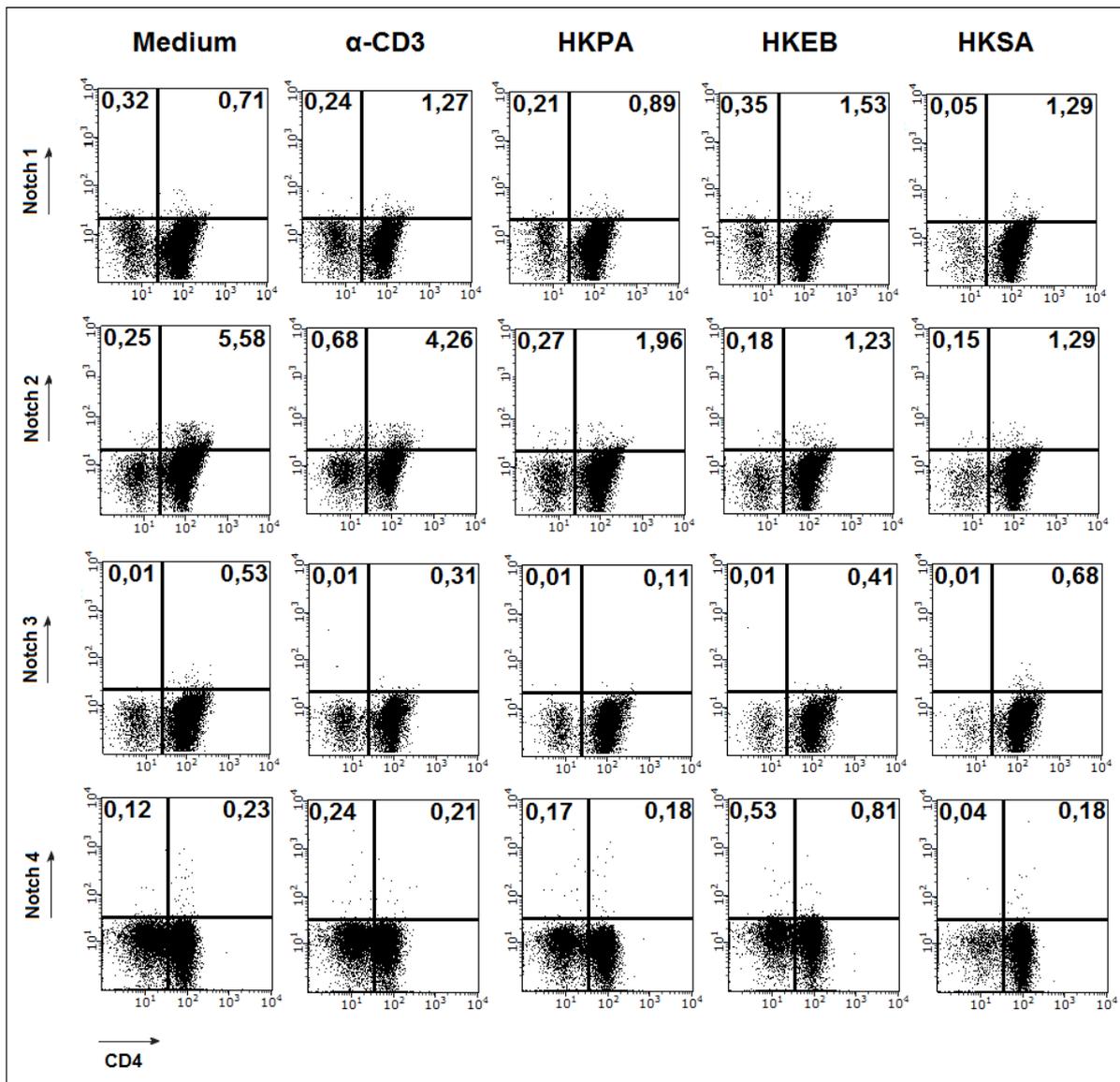


Abbildung 3.7: Messung der Proliferation von Thymuszellen nach Stimulation mit hitze-getöteten Bakterien. Thymuszellen von weiblichen C57.BL/6 Mäusen wurden mit CFSE gefärbt und für 72 h mit 10<sup>8</sup>/ml HKPA, HKPG, HKSA und HKEB stimuliert. Nach Färbung der Oberflächen mit CD4 und CD8 wurden die Proben durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt ist die Proliferationsrate von CD4<sup>+</sup>- und CD4<sup>-</sup>-Thymozyten in Prozent als *frequency of parent* bezogen auf alle Zellen. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment (n=3).

### 3.1.5 Stimulation mit Bakterien führt zu einer Senkung der Notch2-Aktivität von DP-Thymuszellen

Um eine Beeinflussung der Notch Rezeptoren 1-4 von Thymozyten zu ermitteln, wurden die Zellen für 48 h mit verschiedenen Bakterien stimuliert und die Anzahl der vorhandenen Notch-Rezeptoren mittels FACS-Analyse bestimmt. Wie in Abb. 3.8 dargestellt, konnte lediglich ein geringer Einfluss auf den Notch-Rezeptor 2 ermittelt werden. Alle getesteten Bakterien führten zu einer Senkung der Notch2<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>- Thymuszellen. Für die Notch-Rezeptoren 1, 3 und 4 hingegen konnte keine veränderte Anzahl der positiven CD4<sup>+</sup>-Thymuszellen ermittelt werden.

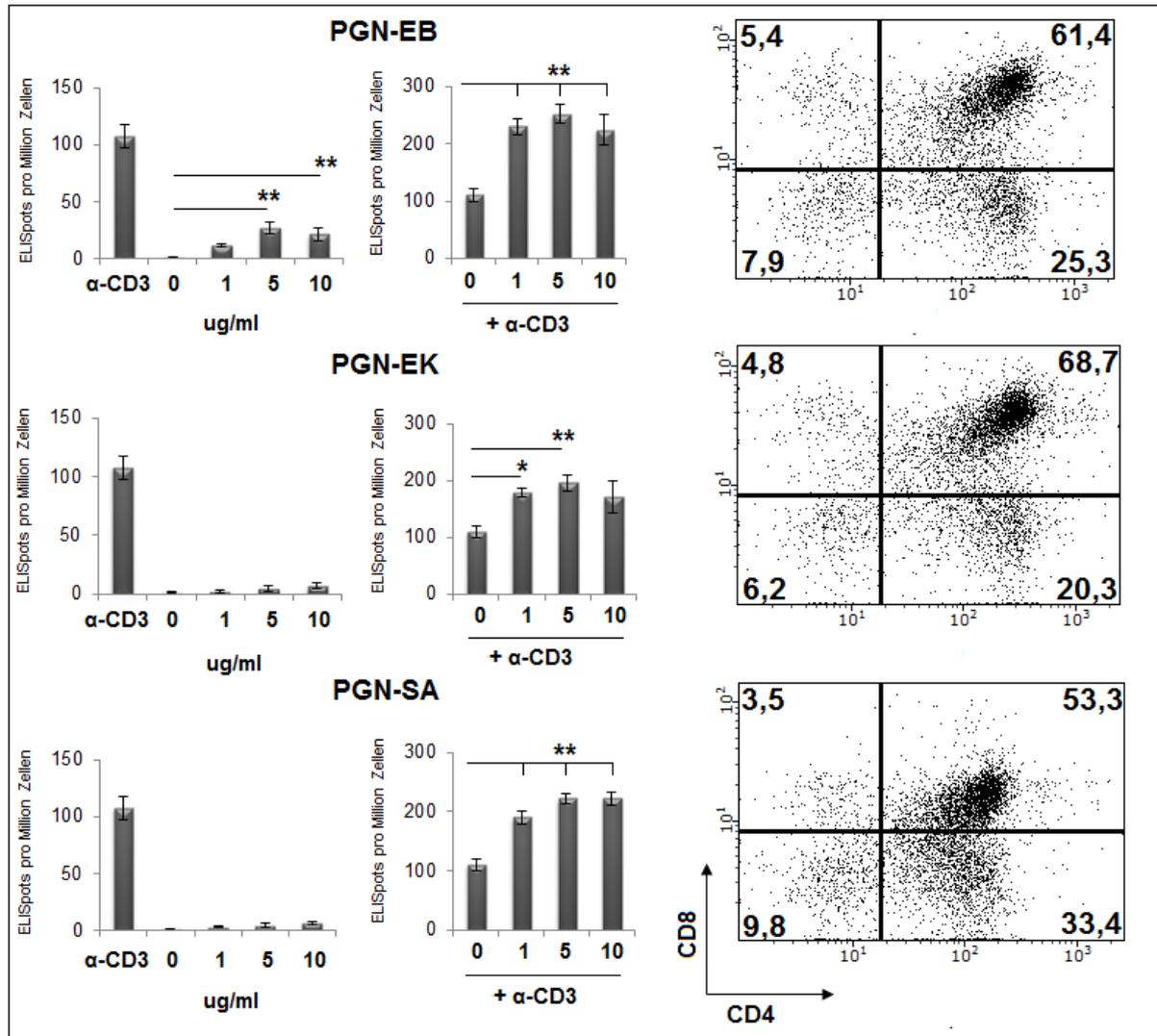


**Abbildung 3.8: Messung der Notch Oberflächenrezeptoren 1-4 von Thymuszellen nach dem Einfluss von Bakterien.** Thymuszellen von weiblichen C57.BL/6 Mäusen wurden für 48 h mit 1  $\mu$ g/ml  $\alpha$ -CD3, 10<sup>8</sup>/ml HKPA, HKEB und HKSA stimuliert. Nach Färbung der Oberflächen mit CD4, CD8 und Notch 1-4 wurden die Proben durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt sind die Notch-positiven CD4<sup>+</sup>- und CD4<sup>-</sup> Thymozyten in Prozent als *frequency of parent* bezogen auf alle Zellen. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment (n=3).

### 3.1.6 Beeinflussung der IL-17 Produktion durch Peptidoglycane

*In vitro* wurde der Einfluss von verschiedenen Peptidoglycanen auf die IL-17 Produktion von Thymuszellen untersucht. Aus Abb. 3.9 geht hervor, dass PGN-EB zu einer statistisch hoch signifikanten IL-17 Ausschüttung bei höheren Konzentrationen führt. Nach zusätzlicher Aktivierung mit  $\alpha$ -CD3 konnte nach Stimulation mit allen getesteten PGN bereits ab einer Konzentration von 1  $\mu$ g/ml ein statistisch signifikanter Anstieg der IL-17 Sekretion detektiert werden, statistisch hoch signifikant nach Stimulation mit 5  $\mu$ g/ml. Eine Phänotypisierung der Thymuszellen nach 24 stündiger Stimulation mit PGN zeigt, dass über 85 % der Zellen CD4<sup>+</sup>-

T-Zellen sind. Wie schon nach Stimulation mit hitze-getöteten Bakterien zeigte sich, dass die  $CD4^+CD8^-$  T-Zellen den Hauptanteil der IL-17 Produktion übernehmen (siehe Anhang).

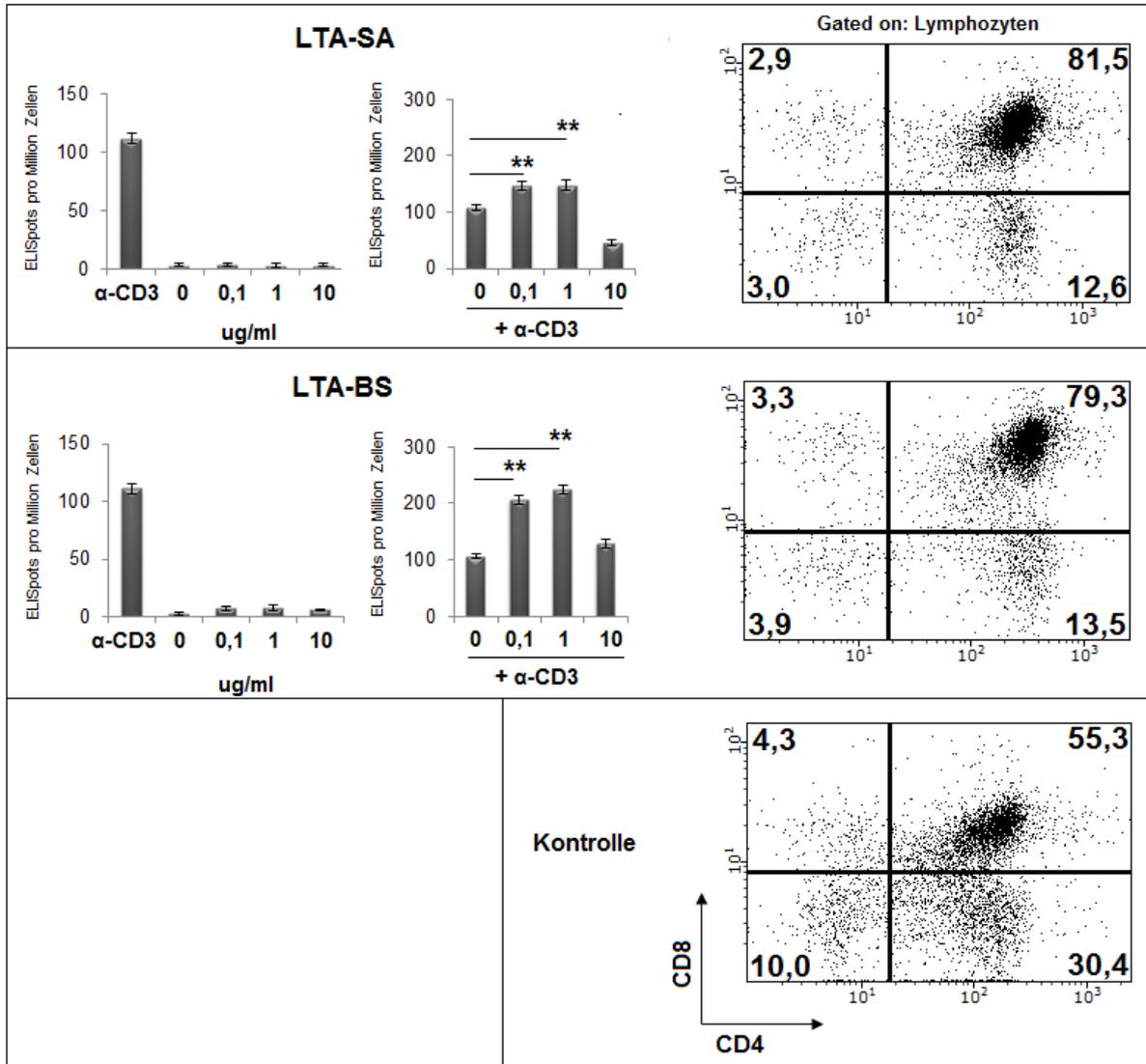


**Abbildung 3.9: Einfluss von Peptidoglycanen auf die IL-17 Sekretion von Thymozyten.** Zellen von weiblichen C57.BL/6 Mäusen (6-8 Wochen) wurden zu  $10^6$ -Zellen pro well ausgesät und mit 0 – 10  $\mu$ g/ml PGN-EB, PGN-EK und PGN-SA in Kombination mit  $\alpha$ -CD3 (1  $\mu$ g/ml) stimuliert. Nach 20 h Inkubationszeit wurde die IL-17-Produktion mittels ELISpot Assay ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM aus zwei unabhängigen Experimenten mit n=5 Mäusen und die prozentualen Anteile  $CD4^+$ -,  $CD8^+$ -,  $CD4^+CD8^+$ - und  $CD4^-CD8^-$  T-Zellen in Prozent als *frequency of parent* bezogen auf alle Zellen. Signifikante Unterschiede sind mit Sternen gekennzeichnet (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ).

### 3.1.7 Beeinflussung der IL-17 Produktion durch Lipoteichonsäuren

Aus Abb. 3.10 geht hervor, dass weder nach Stimulation mit LTA-SA, noch mit LTA-BS eine nachweisbare IL-17 Sekretion beobachtet werden konnte. Nach zusätzlicher Aktivierung mit  $\alpha$ -CD3 konnte bei beiden Lipoteichonsäuren bereits bei einer Konzentration von 0,1  $\mu$ g/ml ein statistisch hoch signifikanter Anstieg der IL-17 Sekretion detektiert werden. Dahingegen hatte

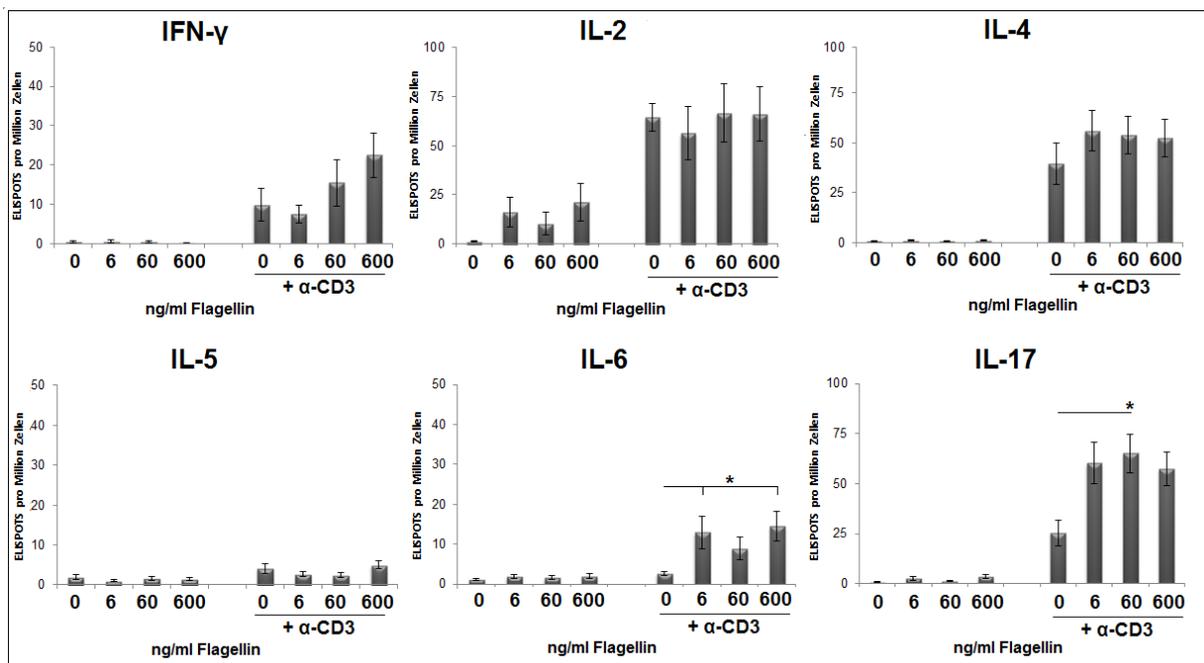
die Stimulation mit höheren Konzentrationen LTA (10  $\mu\text{g/ml}$ ) deutlich verminderte IL-17 Ausschüttungen zur Folge. Eine Phänotypisierung der Thymuszellen nach 24 stündiger Stimulation mit LTA zeigt, dass ca. 80 % der Zellen  $\text{CD4}^+\text{CD8}^+$  sind und der Einfluss von LTA eine Depletion von  $\text{CD4}^+$ -Thymozyten zur Folge hat. Den Hauptanteil der IL-17 Produktion übernehmen wie bei den PGN die  $\text{CD4}^+\text{CD8}^+$ -Zellen (siehe Anhang).



**Abbildung 3.10: Einfluss von Lipoteichonsäuren auf die IL-17 Sekretion von Thymozyten.** Zellen von weiblichen C57.BL/6 Mäusen (6-8 Wochen) wurden zu  $10^6$ -Zellen pro well ausgesät und mit 0 – 10  $\mu\text{g/ml}$  LTA-SA und LTA-BS in Kombination mit  $\alpha\text{-CD3}$  (1  $\mu\text{g/ml}$ ) stimuliert. Nach 20 h Inkubationszeit wurde die IL-17-Produktion mittels ELISpot Assay ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM aus zwei unabhängigen Experimenten mit  $n=5$  Mäusen und die prozentualen Anteile  $\text{CD4}^+$ ,  $\text{CD8}^+$ ,  $\text{CD4}^+\text{CD8}^+$ - und  $\text{CD4}^+\text{CD8}^-$ - T-Zellen in Prozent als *frequency of parent* bezogen auf alle Zellen. Signifikante Unterschiede sind mit Sternen gekennzeichnet (\*\*  $p < 0,01$ ).

### 3.1.8 Beeinflussung der Zytokinproduktion durch Flagellin

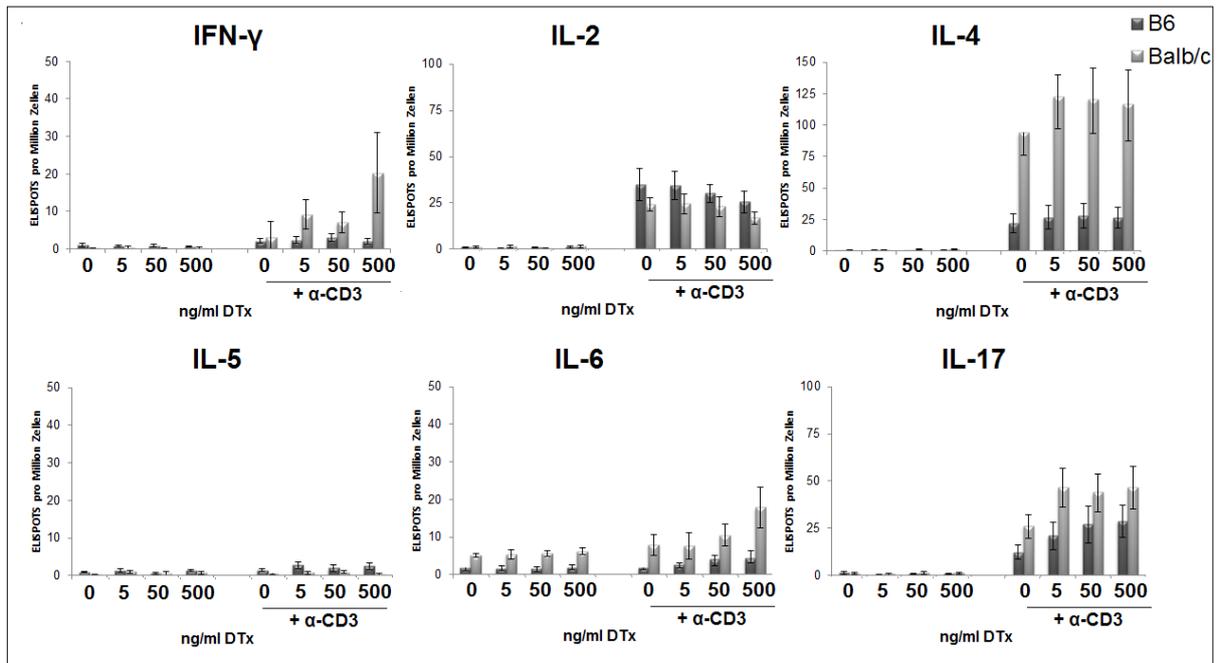
Um eine Beeinflussung Zytokinproduktion von Thymozyten nach Stimulation mit Flagellin zu ermitteln, wurden die Zellen für 20 h mit verschiedenen Konzentrationen Flagellin stimuliert (mit und ohne  $\alpha$ -CD3 Aktivierung). Aus Abb. 3.11 geht hervor, dass keine der getesteten Flagellinkonzentrationen die Zytokinausschüttung statistisch signifikant beeinflusst. Lediglich für das Zytokin IL-2 konnte eine leicht erhöhte, statistisch nicht signifikante Sekretion nach Stimulation mit Flagellin nachgewiesen werden. Während nach gleichzeitiger Koaktivierung mit  $\alpha$ -CD3 ein leichter, statistisch jedoch nicht signifikanter Anstieg der IL-4 und IFN- $\gamma$  Ausschüttung beobachtet werden konnte, führte Stimulation mit Flagellin zu statistisch signifikant erhöhter IL-6 (6 und 600 ng/ml) und IL-17 (60 ng/ml) Sekretion.



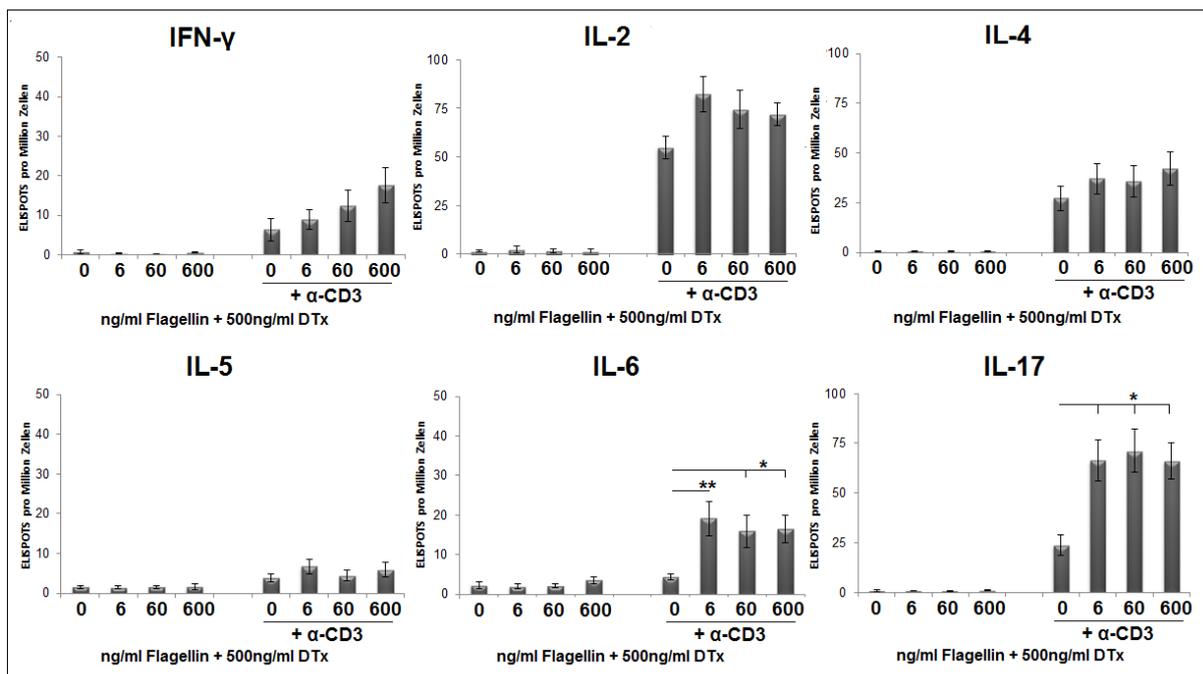
**Abbildung 3.11: Einfluss von Flagellin auf die Zytokinproduktion von Thymozyten.** Zellen von weiblichen C57.BL/6 Mäusen (6-8 Wochen) wurden zu  $10^6$ -Zellen pro well ausgesät und mit 0 – 600 ng/ml Flagellin in Kombination mit  $\alpha$ -CD3 (1  $\mu$ g/ml) stimuliert. Nach 20 h Inkubationszeit wurde die Zytokinsekretion mittels ELISpot Assay ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM aus drei unabhängigen Experimenten mit n=12 Mäusen. Signifikante Unterschiede sind mit Sternen gekennzeichnet (\* p < 0,05).

### 3.1.9 Beeinflussung der Zytokinproduktion durch Diphtherie Toxin

Thymozyten wurden für 20 h mit 0 – 500 ng/ml DTx stimuliert ( $\pm$   $\alpha$ -CD3-Aktivierung). Wie in Abb. 3.12 dargestellt, konnte nach Stimulation mit DTx kein Einfluss auf die Zytokinproduktion nachgewiesen werden.



**Abbildung 3.12: Einfluss von DTx auf die Zytokinproduktion von Thymozyten.** Zellen von weiblichen C57.BL/6 und BALB/c Mäusen (6-8 Wochen) wurden zu  $10^6$ -Zellen pro well ausgesät und mit 0 – 500 ng/ml DTx in Kombination mit  $\alpha$ -CD3 (1  $\mu$ g/ml) stimuliert. Nach 20 h Inkubationszeit wurde die Zytokinsekretion mittels ELISpot Assay ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM aus zwei unabhängigen Experimenten mit n=8 Mäusen.



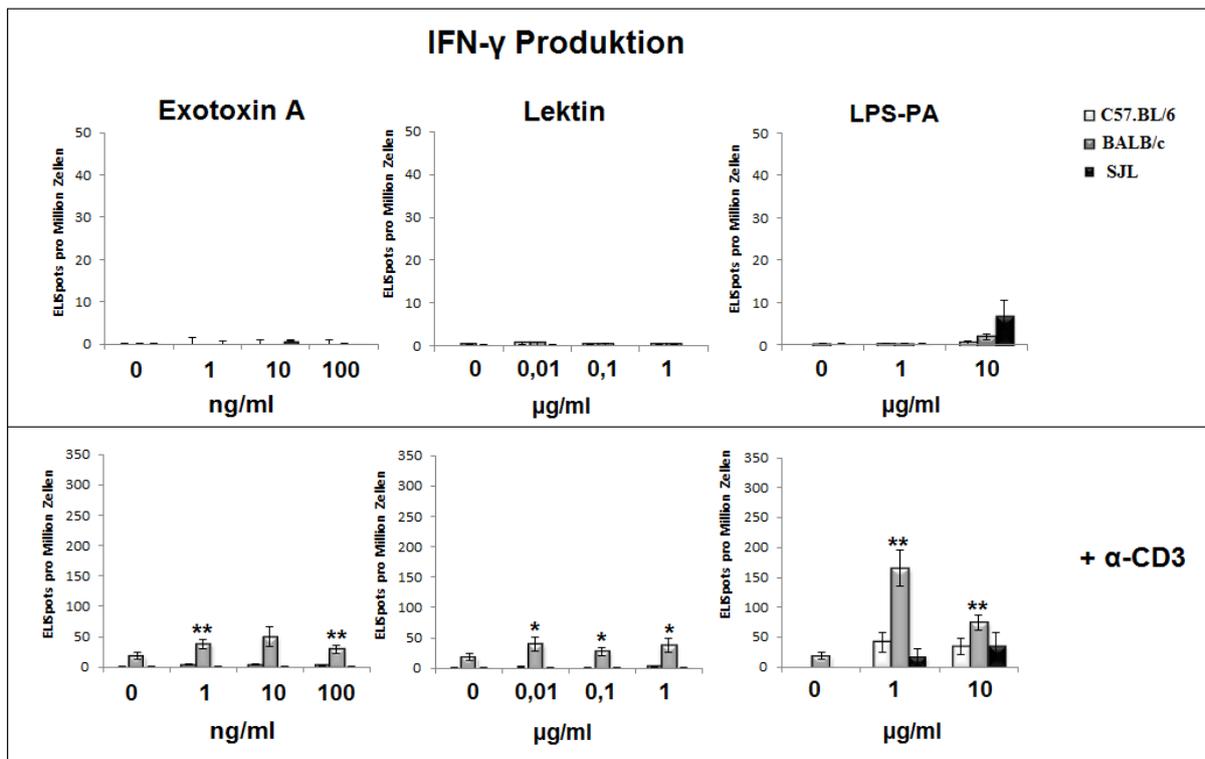
**Abbildung 3.13: Einfluss von Flagellin in Kombination mit DTx auf die Zytokinproduktion von Thymozyten.** Zellen von weiblichen C57.BL/6 und BALB/c Mäusen (6-8 Wochen) wurden zu  $10^6$ -Zellen pro well ausgesät und mit 6 - 600 ng/ml Flagellin und 500 ng/ml DTx in Kombination mit  $\alpha$ -CD3 (1  $\mu$ g/ml) stimuliert. Nach 20 h Inkubationszeit wurde die Zytokinsekretion mittels ELISpot Assay ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM aus drei unabhängigen Experimenten mit n=12 Mäusen. Signifikante Unterschiede sind mit Sternen gekennzeichnet (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ).

Nach gleichzeitiger Koaktivierung mit  $\alpha$ -CD3 konnte ein nicht signifikanter Anstieg der IFN- $\gamma$ -, IL-4-, IL-6- und IL-17- Produktion beobachtet werden. Zudem war der kostimulatorische Effekt von DTx in BALB/c mehr ausgeprägter als in C57.BL/6 Mäusen.

Eine zusätzliche Aktivierung mit Flagellin zeigte keinen, statistisch signifikanten additiven Effekte auf die Zytokinproduktion von Thymuszellen (Abb.3.13). Jedoch konnte nach zusätzlicher Stimulation mit DTx für alle getesteten Konzentrationen eine statistisch signifikant erhöhte IL-6- und IL-17- Ausschüttung detektiert werden im Vergleich zur Stimulation mit Flagellin (Abb. 3.11).

### 3.1.10 Beeinflussung der IFN- $\gamma$ Produktion durch Zellwandbestandteile von *P. aeruginosa*

*In vitro* wurde der Einfluss von Exo A, Lektin und LPS von *P. aeruginosa* auf die IFN- $\gamma$  Produktion von Thymuszellen untersucht. Aus Abb. 3.14 geht hervor, dass nur Stimulation mit LPS-PA die IFN- $\gamma$  Produktion in SJL-Mäusen erhöht, jedoch statistisch nicht signifikant.

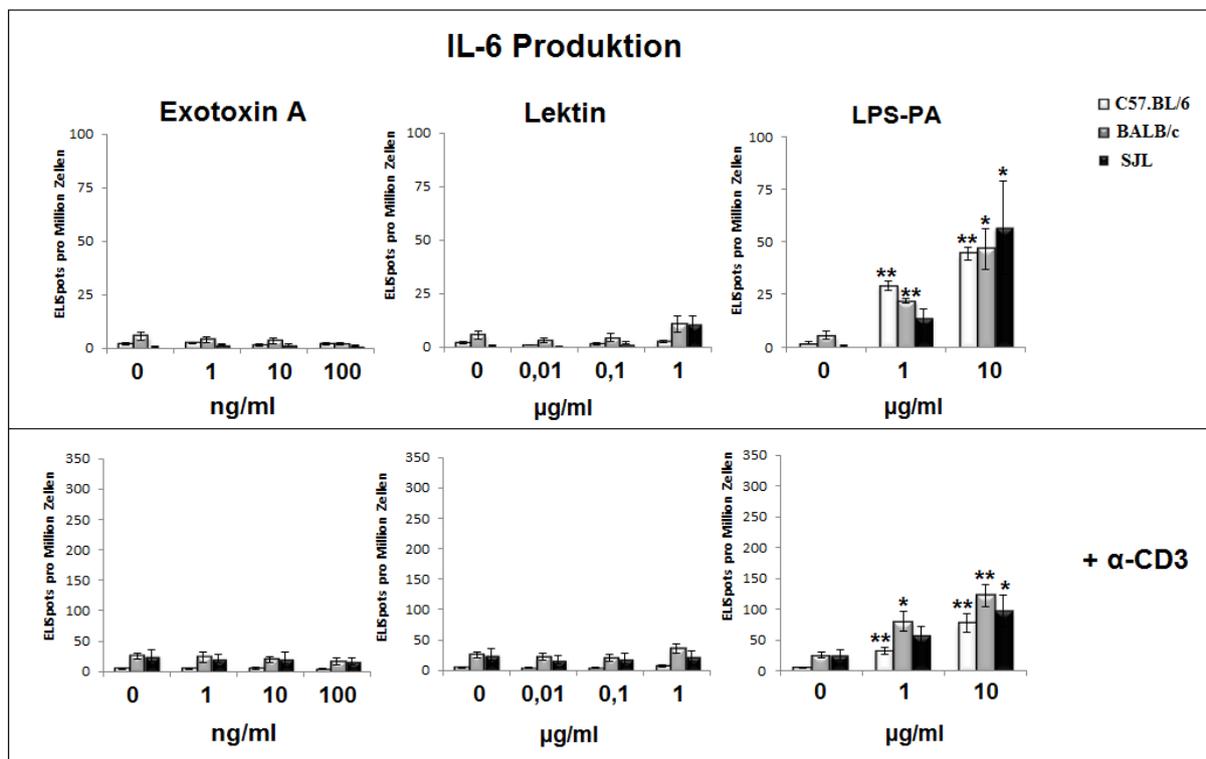


**Abbildung 3.14: Einfluss Exo A, Lektin und LPS-PA auf die IFN- $\gamma$  Produktion von Thymozyten.** Zellen von weiblichen C57.BL/6, BALB/c und SJL Mäusen (6-8 Wochen) wurden zu  $10^6$ -Zellen pro well ausgesät und mit Exo A (0 – 100 ng/ml), Lektin (0 – 1  $\mu$ g/ml) und LPS-PA (0 – 10  $\mu$ g/ml) in Kombination mit  $\alpha$ -CD3 (1  $\mu$ g/ml) stimuliert. Nach 24 h Inkubationszeit wurde die IFN- $\gamma$  Sekretion mittels ELISpot Assay ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM aus zwei unabhängigen Experimenten mit n=4-8 Mäusen (ohne  $\alpha$ -CD3 n=4; mit  $\alpha$ -CD3 n=8). Signifikante Unterschiede sind mit Sternen gekennzeichnet (\* p < 0,05; \*\* p < 0,01).

Nach Aktivierung mit  $\alpha$ -CD3 konnte eine statistisch signifikant erhöhte IFN- $\gamma$  Sekretion bei alle getesteten Antigenen in BALB/c Mäusen detektiert werden. Zudem konnte nach Stimulation mit LPS-PA ein geringer nicht signifikanter kostimulatorischer Effekt in C57.BL/6 und BALB/c Mäusen ermittelt werden.

### 3.1.11 Beeinflussung der IL-6 Produktion durch Zellwandbestandteile von *P. aeruginosa*

Wie in Abb. 3.15 dargestellt, führte Stimulation mit LPS zu einer konzentrationsabhängigen, statistisch hoch signifikanten Ausschüttung von IL-6 in C57.BL/6 und BALB/c Mäusen. Nach Aktivierung mit  $\alpha$ -CD3 konnte nochmals eine statistisch signifikant erhöhte IL-6 Sekretion bei 10  $\mu$ g/ml LPS in allen getesteten Mausstämmen ermittelt werden. Nach Stimulation mit Exo A und Lektin konnten hingegen keine statistisch signifikant erhöhten IL-6-Sekretionen nachgewiesen werden.

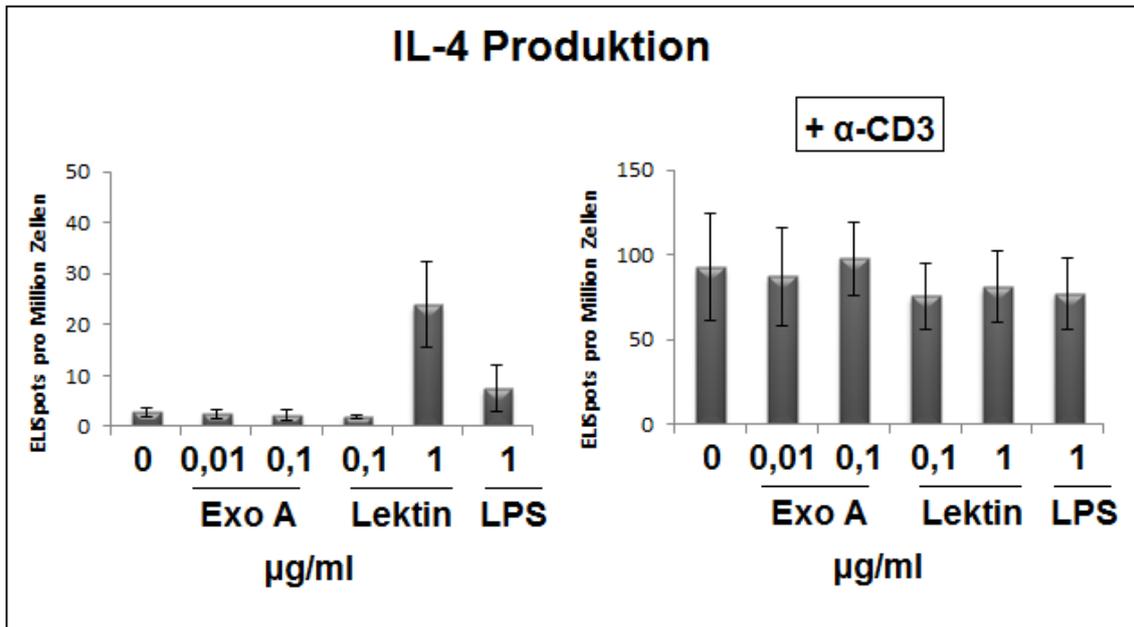


**Abbildung 3.15: Einfluss Exo A, Lektin und LPS-PA auf die IL-6 Produktion von Thymozyten.** Zellen von weiblichen C57.BL/6, BALB/c und SJL Mäusen (6-8 Wochen) wurden zu  $10^6$ -Zellen pro well ausgesät und mit Exo A (0 – 100 ng/ml), Lektin (0 – 1  $\mu$ g/ml) und LPS-PA (0 – 10  $\mu$ g/ml) in Kombination mit  $\alpha$ -CD3 (1  $\mu$ g/ml) stimuliert. Nach 24 h Inkubationszeit wurde die IL-6 Sekretion mittels ELISpot Assay ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM aus zwei unabhängigen Experimenten mit n=4-8 Mäusen (ohne  $\alpha$ -CD3 n=4; mit  $\alpha$ -CD3 n=8). Signifikante Unterschiede sind mit Sternen gekennzeichnet (\* p < 0,05; \*\* p < 0,01).

### 3.1.12 Beeinflussung der IL-4-Produktion durch Zellwandbestandteile von

#### *P. aeruginosa*

Aus Abb. 3.16 geht hervor, dass Stimulation mit Lektin und LPS eine, statistisch nicht signifikante IL-4 Sekretion zur Folge hatte. Nach gleichzeitiger Stimulation mit  $\alpha$ -CD3 konnte hingegen keine erhöhte IL-4 Antwort detektiert werden.

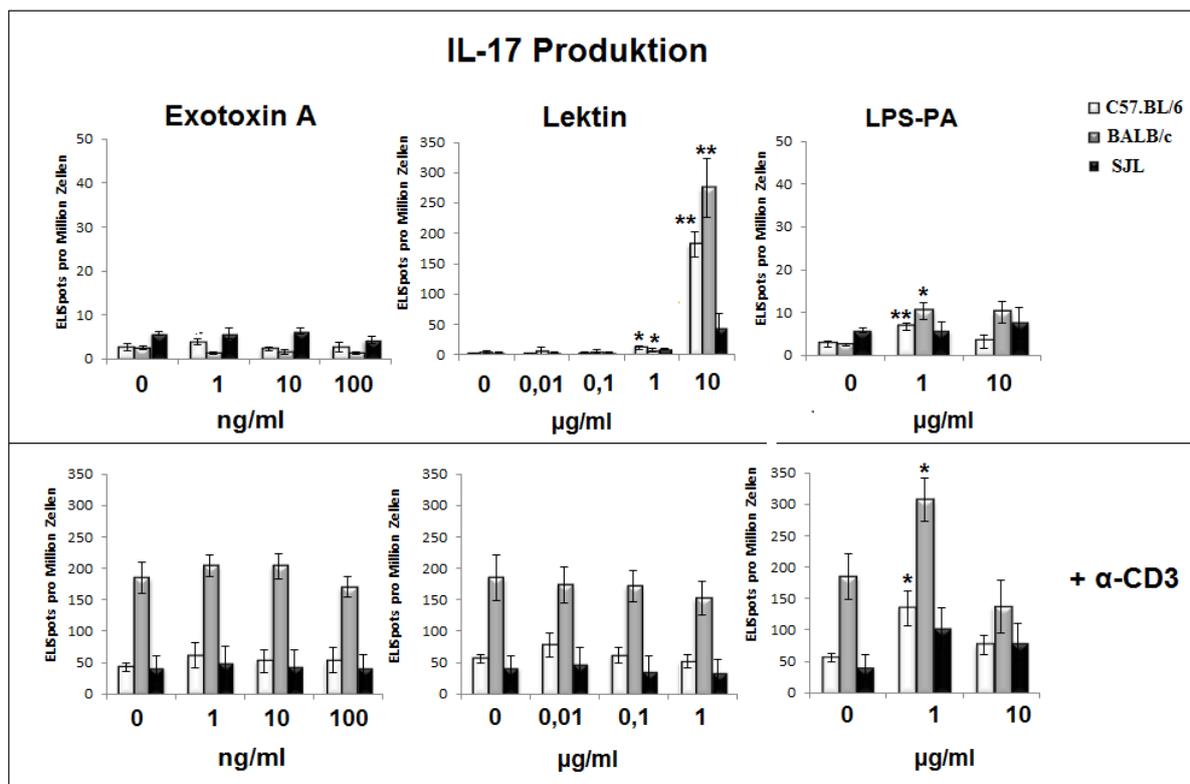


**Abbildung 3.16:** Einfluss Exo A, Lektin und LPS-PA auf die IL-4 Produktion von Thymozyten. Zellen von weiblichen C57.BL/6 (6-8 Wochen) wurden zu  $10^6$ -Zellen pro well ausgesät und mit Exo A (10 - 100 ng/ml), Lektin (0,1 – 1  $\mu$ g/ml) und LPS-PA (1  $\mu$ g/ml) in Kombination mit  $\alpha$ -CD3 (1  $\mu$ g/ml) stimuliert. Nach 24 h Inkubationszeit wurde die IL-4 Sekretion mittels ELISpot Assay ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM aus zwei unabhängigen Experimenten mit n=4 Mäusen.

### 3.1.13 Beeinflussung der IL-17-Produktion durch Zellwandbestandteile von

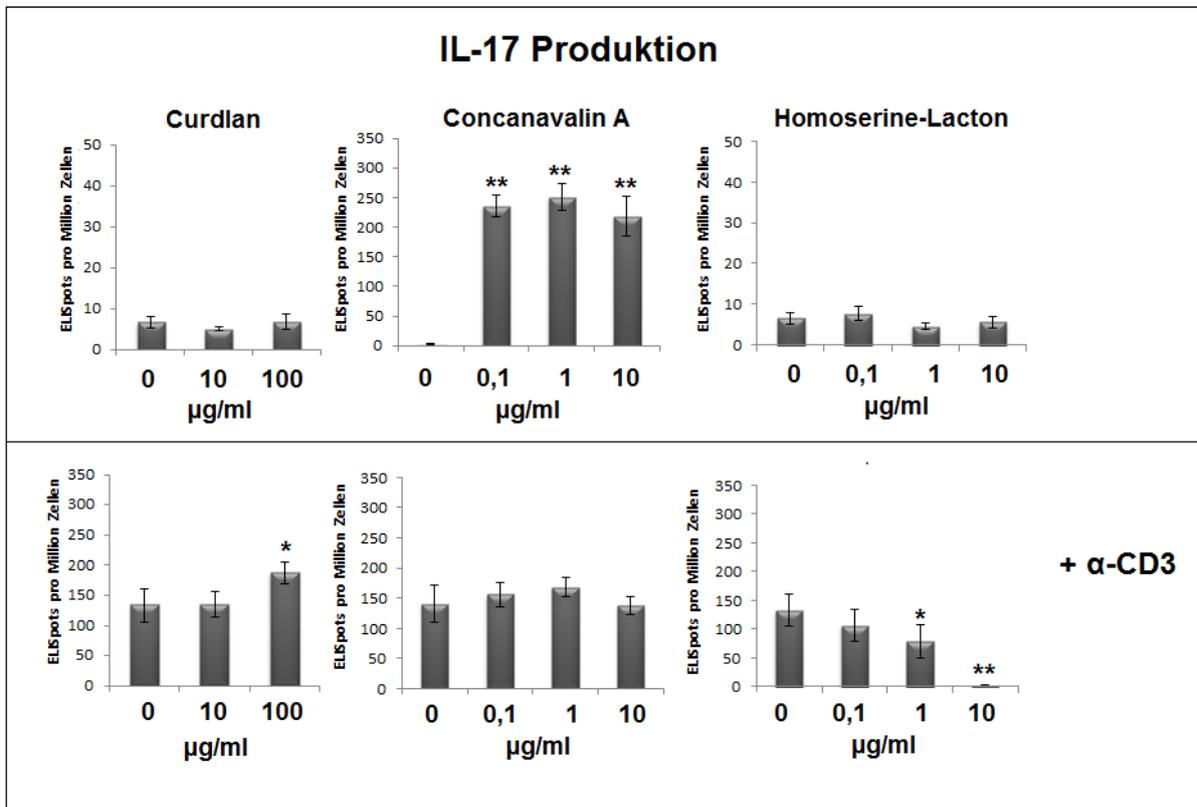
#### *P. aeruginosa*

Wie in Abb. 3.17 dargestellt, konnte eine statistisch hoch signifikante IL-17-Sekretion nach Stimulation mit 10  $\mu$ g/ml Lektin in Thymuszellen von C57.BL/6 und BALB/c Mäusen ermittelt werden. Zudem konnte eine leicht erhöhte, bei 1  $\mu$ g/ml statistisch signifikante IL-17 Ausschüttung nach Stimulation mit 1  $\mu$ g/ml LPS detektiert werden. Nach Koaktivierung mit  $\alpha$ -CD3 konnte hingegen nur nach Stimulation mit 1  $\mu$ g/ml LPS ein statistisch signifikanter Anstieg der IL-17 Sekretion in C57.BL/6 und BALB/c Mäusen ermittelt werden. Des Weiteren konnte für Stimulation mit 1 – 10 ng/ml Exo A ein leichter kostimulatorischer Effekt in BALB/c Mäusen detektiert werden, jedoch statistisch nicht signifikant. Ein weiteres Zellwandbestandteil, das Homo-Serinlacton, führte hingegen zu einer statistisch signifikanten Inhibition der IL-17-Sekretion bei einer Konzentration von 1  $\mu$ g/ml (Abb. 3.18).



**Abbildung 3.17: Einfluss Exo A, Lektin und LPS-PA auf die IL-17 Produktion von Thymozyten.** Zellen von weiblichen C57.BL/6, BALB/c und SJL Mäusen (6-8 Wochen) wurden zu  $10^6$ -Zellen pro well ausgesät und mit Exo A (0 – 100 ng/ml), Lektin (0 – 1 µg/ml) und LPS-PA (0 – 10 µg/ml) in Kombination mit α-CD3 (1 µg/ml) stimuliert. Nach 24 h Inkubationszeit wurde die IL-17 Sekretion mittels ELISpot Assay ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM aus zwei unabhängigen Experimenten mit n=4-8 Mäusen (ohne α-CD3 n=4; mit α-CD3 n=8). Signifikante Unterschiede sind mit Sternen gekennzeichnet (\* p < 0,05; \*\* p < 0,01).

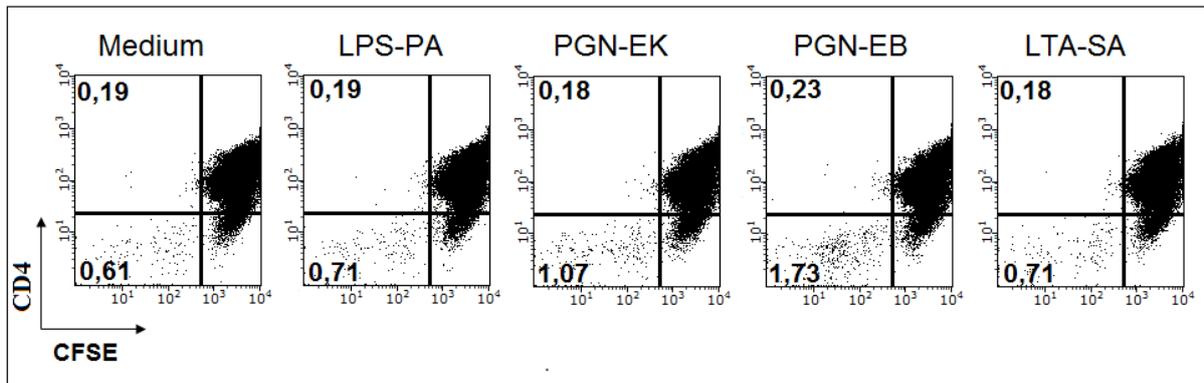
Zur genaueren Untersuchung der durch Stimulation mit Lektin induzierten IL-17-Ausschüttung wurden weitere Antigene getestet. Stimulation mit Curdlan AL, ein lineares beta-1,3-glucan, dessen stimulatorischer Effekt über den Dectin-1 Rezeptor vermittelt wird führte lediglich in Kombination mit gleichzeitiger α-CD3-Aktivierung bei einer Konzentration von 100 µg/ml zu einer statistisch signifikant erhöhten IL-17 Sekretion (Abb. 3.18). Stimulation mit Con A, einem pflanzlichen Lektin aus der Jackbohne hatte bei allen getesteten Konzentrationen eine statistisch hoch signifikante IL-17-Ausschüttung zur Folge. Wie auch schon nach Stimulation Lektin, hatte eine gleichzeitige Koaktivierung mit α-CD3 keinen zusätzlichen Effekt.



**Abbildung 3.18: Einfluss von Curdlan AL, Concanavalin A und Acyl-Homoserin-Lacton auf die IL-17 Produktion von Thymozyten.** Zellen von weiblichen C57.BL/6 (6-8 Wochen) wurden zu  $10^6$ -Zellen pro well ausgesät und mit Curdlan (0 – 100 µg/ml), Con A (0 – 10 µg/ml) und HSL (0 – 10 µg/ml) in Kombination mit α-CD3 (1 µg/ml) stimuliert. Nach 24 h Inkubationszeit wurde die IL-17 Sekretion mittels ELISpot Assay ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM aus zwei unabhängigen Experimenten mit n=8 Mäusen. Signifikante Unterschiede sind mit Sternchen gekennzeichnet (\* p < 0,05; \*\* p < 0,01).

### 3.1.14 Zellwandbestandteile haben keinen proliferationsfördernden Effekt auf DP-Thymuszellen

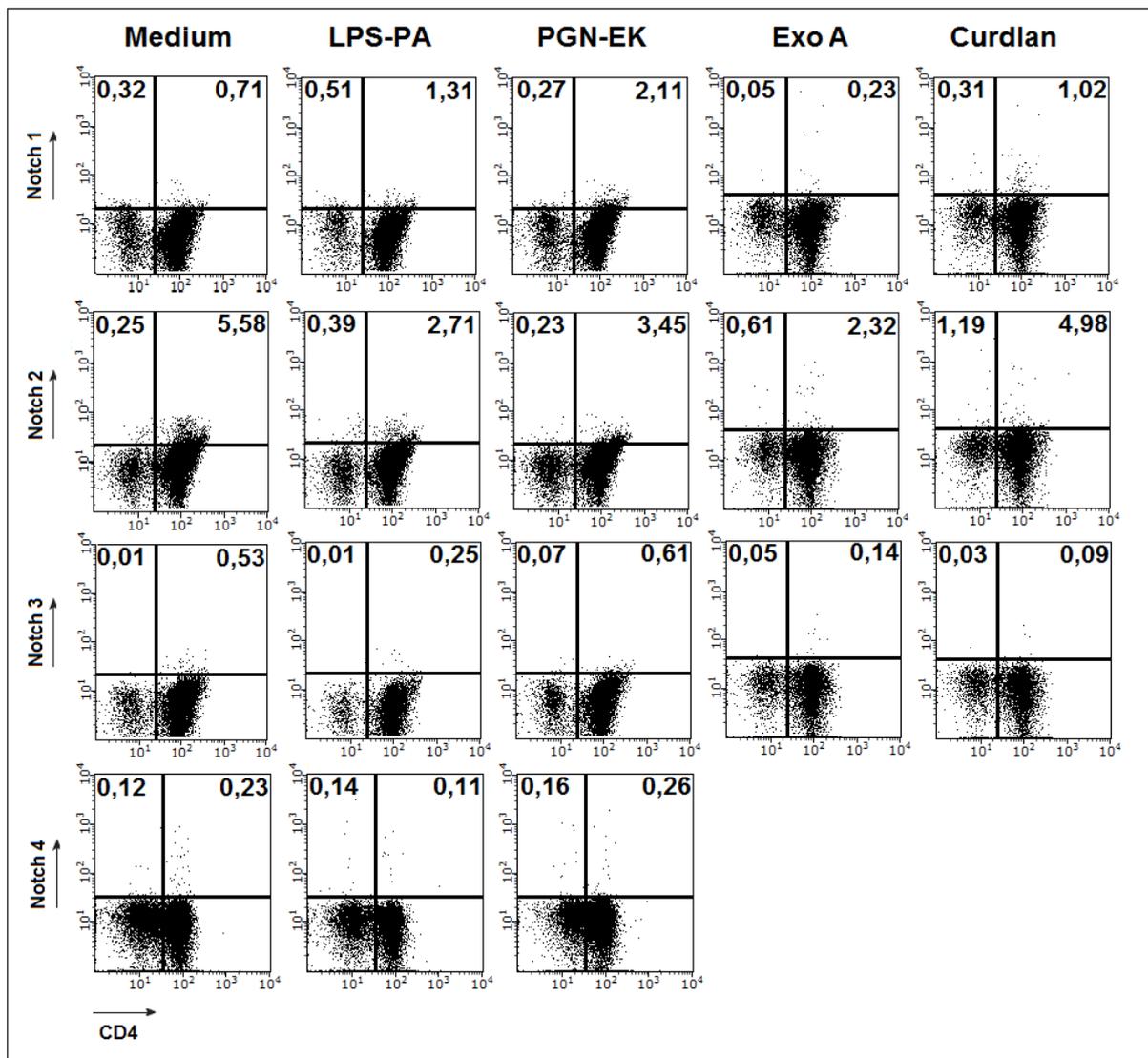
Zur Untersuchung des Einflusses von verschiedenen Zellwandbestandteilen auf die Proliferation von Thymuszellen wurden die Zellen mit CFSE gefärbt und für 72 h mit verschiedenen Antigenen inkubiert. Für kein getestetes Zellwandbestandteil konnte ein proliferationsfördernder Effekt von  $CD4^+$  (inklusive  $CD4^+CD8^-$ ) – Thymuszellen ermittelt werden (Abb. 3.19). Für die Subpopulation der DN-Thymozyten konnte lediglich für die beiden PGN eine leicht erhöhte Proliferationsrate nachgewiesen werden.



**Abbildung 3.19: Messung der Proliferation von Thymuszellen nach Stimulation mit verschiedenen Zellwandbestandteilen.** Thymuszellen von weiblichen C57.BL/6 Mäusen wurden mit CFSE gefärbt und für 72 h mit LPS-PA (1 µg/ml), PGN-EK (5 µg/ml), PGN-EB (5 µg/ml) und LTA-SA (1 µg/ml) stimuliert. Nach Färbung der Oberflächen mit CD4 und CD8 wurden die Proben durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt ist die Proliferationsrate von CD4<sup>+</sup>- und CD4<sup>-</sup>- Thymozyten in Prozent als *frequency of parent* bezogen auf alle Zellen. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment (n=3).

### 3.1.15 Bakterielle Bestandteile führen zu einer Senkung der Notch2-Aktivität von DP-Thymuszellen

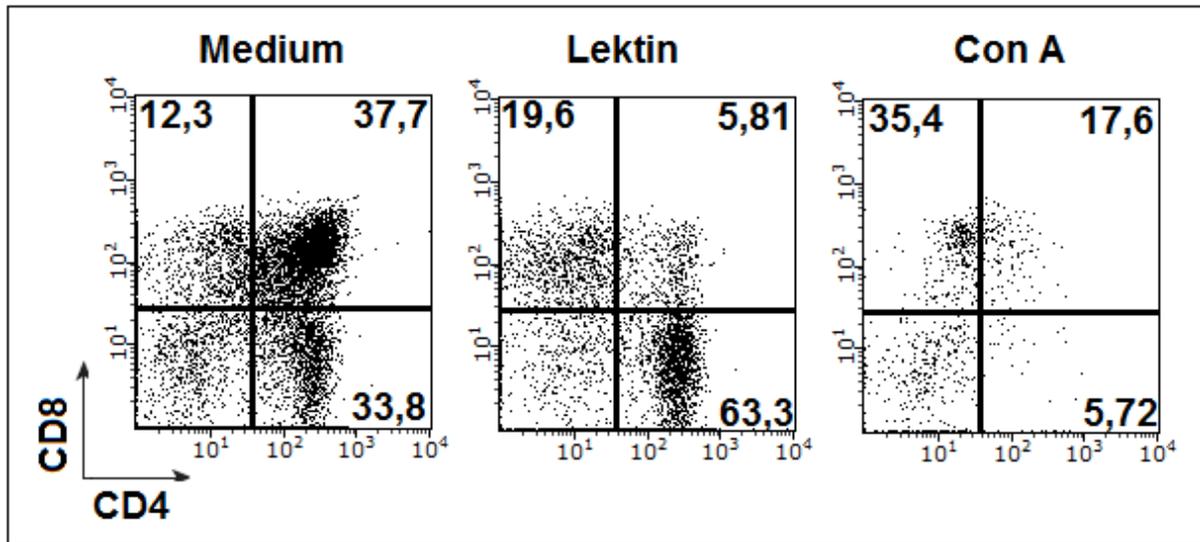
Die wurden Zellen für 48 h mit verschiedenen Zellwandbestandteilen und dem Dectin-1 Ligand Curdlan stimuliert und die Anzahl der vorhandenen Notch-Rezeptoren mittels FACS-Analyse bestimmt. Wie in Abb. 3.20 dargestellt, konnte lediglich ein geringer Einfluss auf den Notch-Rezeptor 2 ermittelt werden. LPS-PA, PGN-EK und Exo A führten zu einer Senkung der Notch2<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>- Thymuszellen. Stimulation mit Curdlan hingegen zeigte keinen Einfluss auf die Notch2<sup>+</sup>- Zellen. Wie nach Stimulation mit Bakterien konnte auch nach Stimulation mit Zellwandbestandteilen keine veränderte Anzahl der Notch-Rezeptoren 1,3 und 4 der CD4<sup>+</sup>- Thymuszellen ermittelt werden.



**Abbildung 3.20:** Analyse der Notch Oberflächenrezeptoren 1-4 von Thymuszellen nach dem Einfluss von Zellwandbestandteilen und Curdlan. Thymuszellen von weiblichen C57.BL/6 Mäusen wurden für 48 h mit LPS-PA (1 µg/ml), PGN-EK (5 µg/ml), Exo A (1 µg/ml) und Curdlan (100 µg/ml) stimuliert. Nach Färbung der Oberflächen mit CD4, CD8 und Notch 1-4 wurden die Proben durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt sind die Notch<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>- und Notch<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup> Thymozyten in Prozent als *frequency of parent* bezogen auf alle Zellen. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment (n=3).

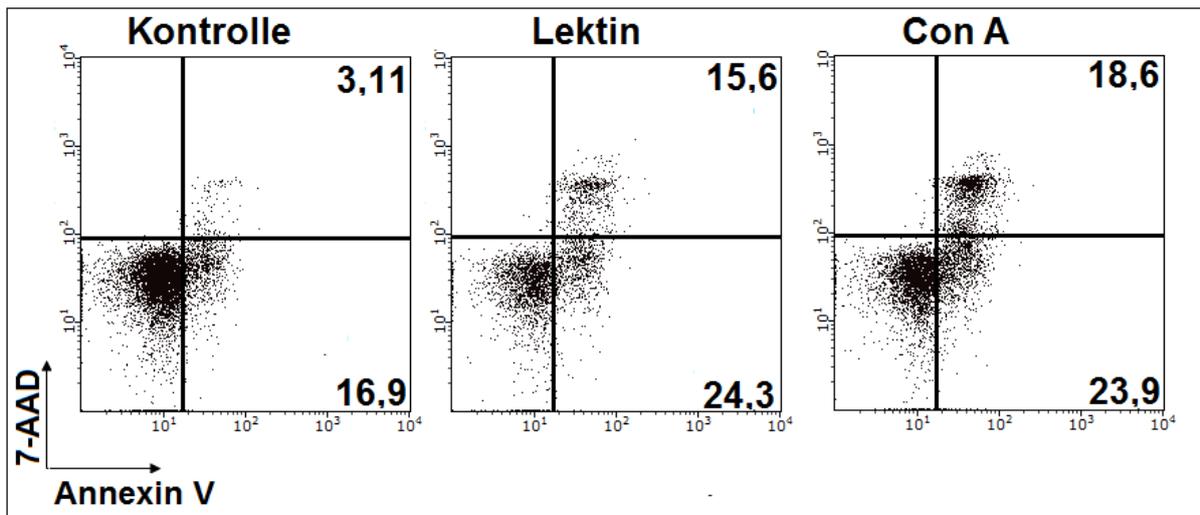
### 3.1.16 Beeinflussung der Zellvitalität durch Stimulation mit Lektin und Con A

Zur näheren Untersuchung des Einflusses auf die Zellvitalität wurden Thymuszellen mit Lektin und Con A für 24h stimuliert und hinsichtlich ihrer phänotypischen Veränderung der Subpopulationen untersucht. Aus Abb. 3.21 geht hervor, dass Stimulation mit Lektin und Con A zu einer Depletion von CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> T-Zellen führt. Zudem hat Stimulation mit Con A, im Gegensatz zu Lektin eine Depletion der CD4<sup>+</sup> Thymozyten zur Folge.



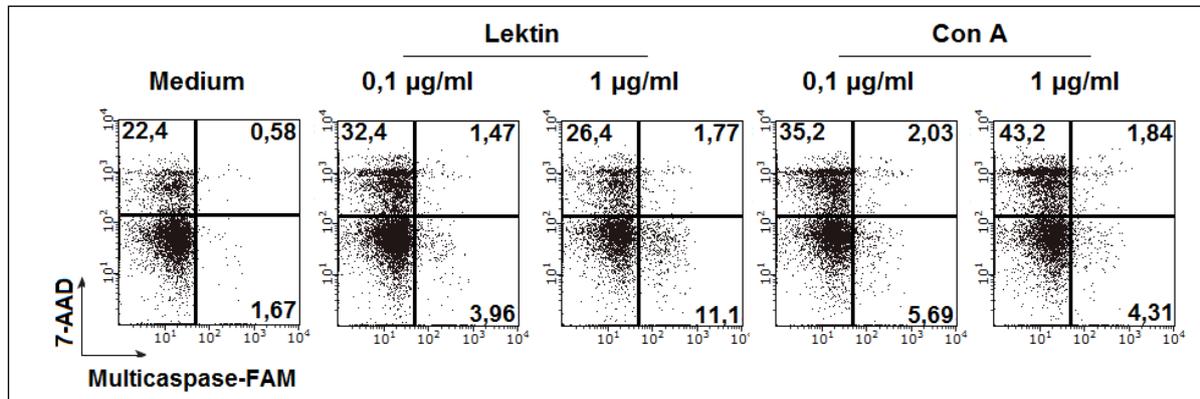
**Abbildung 3.21: FACS-Analyse der Oberflächenmoleküle CD4 und CD8 nach Stimulation mit Lektin und Con A.** Thymuszellen von weiblichen C57.BL/6 Mäusen (6-8 Wochen) wurden mit Lektin und Con A (1 µg/ml) für 24 h stimuliert. Nach Färbung mit Fixable Viability Dye® 660 wurden die Oberflächen mit CD4 und CD8 gefärbt und durchflusszytometrisch bestimmt. Dargestellt sind die prozentualen Anteile CD4<sup>+</sup>-, CD8<sup>+</sup>-, CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>- und CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>- T-Zellen als *frequency of parent* bezogen auf alle Zellen nach dem Ausschluss toter Zellen. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment (n=3).

Nach Stimulation mit niedrigen Konzentrationen Lektin und Con A (0,1 µg/ml) konnte bereits nach 4 h eine deutliche höhere Anzahl früh-apoptotischer Zellen (Annexin-V<sup>+</sup>) und spät-apoptotischer/nekrotischer Zellen (Annexin-V<sup>+</sup> 7-AAD<sup>+</sup>) ermittelt werden (Abb. 3.22).



**Abbildung 3.22: Annexin-Assay nach Stimulation mit Lektin und Con A.** Thymuszellen von weiblichen C57.BL/6 Mäusen (6-8 Wochen) wurden mit Lektin und Con A (0,1 µg/ml) für 4 h stimuliert. Nach Färbung mit Annexin V und 7-AAD wurden die Zellen durchflusszytometrisch bestimmt. Dargestellt sind die prozentualen Anteile der früh-apoptotischen Zellen (Annexin V<sup>+</sup>) und der spät-apoptotischen, toten Zellen (Annexin V<sup>+</sup> 7-AAD<sup>+</sup>) Zellen als *frequency of parent* bezogen auf alle Zellen. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment (n=3).

Eine zentrale Rolle in der Vermittlung der Apoptose spielen Caspase-Enzyme. Die Multicaspase-FAM bindet innerhalb der Zelle kovalent an ein breites Spektrum von Caspasen, die während der Apoptose aktiviert werden. Wie in Abb. 3.23 dargestellt, konnten nach 4 h Stimulation mit Lektin und Con A bereits erhöhte Anteile an Caspase<sup>+</sup>-Zellen detektiert werden, am deutlichsten nach Stimulation mit 1 µg/ml Lektin (11,1 %) im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle (1,67 %). Zudem führte Stimulation mit Lektin und Con A zu einer deutlich höheren Anzahl toter/nekrotischer Zellen (7-AAD<sup>+</sup>).

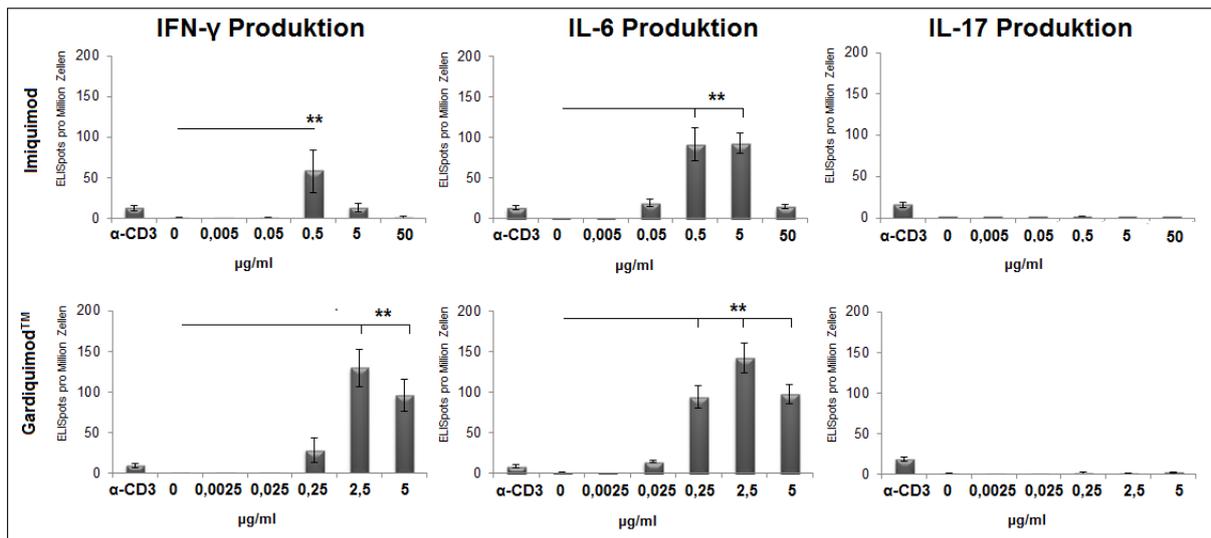


**Abbildung 3.23: Caspase-Assay nach Stimulation mit Lektin und Con A.** Thymuszellen von weiblichen C57.BL/6 Mäusen (6-8 Wochen) wurden mit Lektin und Con A (0,1 – 1 µg/ml) für 4 h stimuliert. Nach Färbung mit Multicaspase-FAM und 7-AAD wurden die Zellen durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt sind die prozentualen Anteile der toten Zellen (7-AAD<sup>+</sup>), der Caspase-FAM<sup>+</sup>-Zellen und der toten Caspase-FAM<sup>+</sup>-Zellen als *frequency of parent* bezogen auf alle Zellen. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment (n=4).

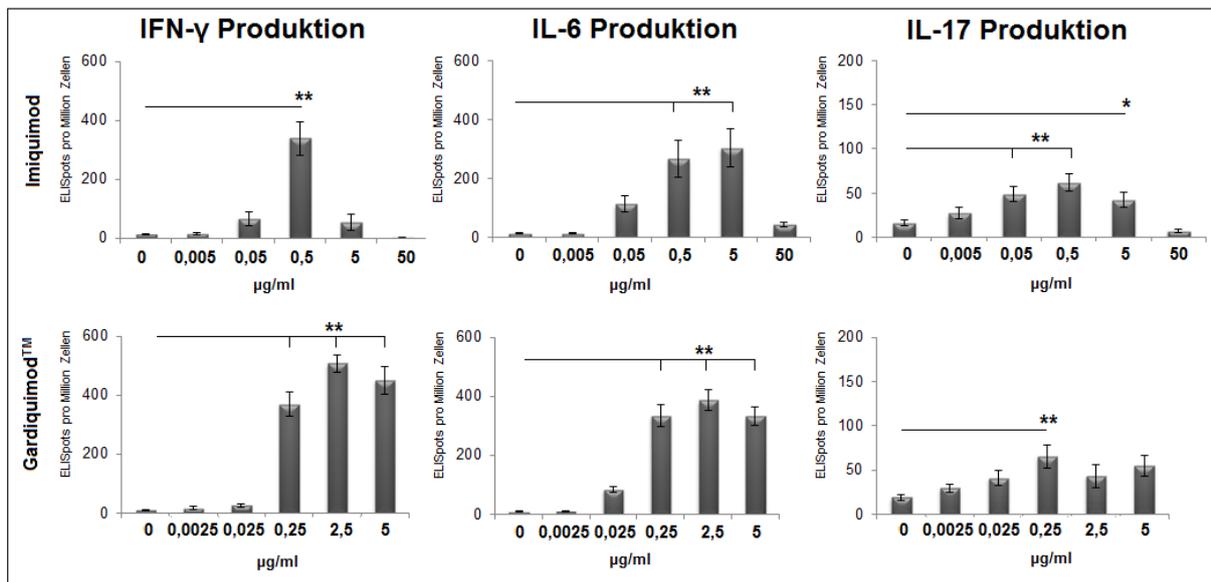
### 3.1.17 Beeinflussung der Zytokinproduktion durch die TLR7-Liganden Imiquimod und Gardiquimod®

*In vitro* wurde der Einfluss von Imiquimod und Gardiquimod® auf die Zytokinproduktion von Thymuszellen untersucht. Wie in Abb. 3.24 dargestellt, konnte nach Stimulation mit 0,5 µg/ml Imiquimod und 2,5 – 5 µg/ml Gardiquimod® ein statistisch hoch signifikanter Anstieg des IFN-γ Sekretion detektiert werden. Zudem hatte Stimulation mit 0,5 – 5 µg/ml Imiquimod und 0,25 – 5 µg/ml Gardiquimod® eine statistisch hoch signifikante IL-6 Ausschüttung zur Folge. Für das Zytokin IL-17 konnten hingegen keine stimulatorischen Effekte ermittelt werden.

Zur Untersuchung kostimulatorischer Effekte von Imiquimod und Gardiquimod® auf die Zytokinproduktion wurden die Thymuskulturen zusätzlich mit α-CD3 stimuliert. Dabei konnten nach Stimulation mit 0,5 µg/ml Imiquimod und 0,25 – 5 µg/ml Gardiquimod® statistisch hoch signifikant erhöhte IFN-γ Sekretionen nachgewiesen werden, mit deutlich höheren Spot-Zahlen im Vergleich zu ohne α-CD3-Aktivierung (Abb. 3.25).



**Abbildung 3.24: Einfluss von Imiquimod und Gardiquimod® auf die Zytokinproduktion von Thymuszellen.** Thymuszellen von weiblichen C57.BL/6 Mäusen (6-8 Wochen) wurden zu  $10^6$ -Zellen pro well ausgesät und mit Imiquimod (0,005 – 50 µg/ml) und Gardiquimod® (0,0025 – 5 µg/ml) stimuliert. Nach 20 h Inkubationszeit wurde IFN- $\gamma$ , IL-6 und IL-17 Produktion mittels ELISpot Assay ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM aus zwei unabhängigen Experimenten mit n=6 Mäusen. Signifikante Unterschiede sind mit Sternen gekennzeichnet (\* p < 0,05; \*\* p < 0,01).

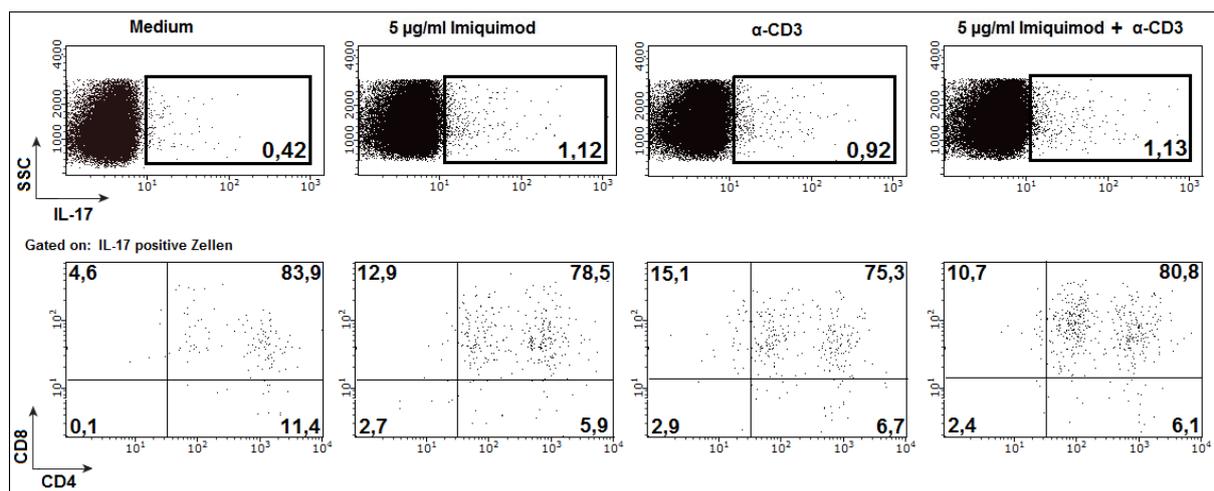


**Abbildung 3.25: Einfluss von Imiquimod und Gardiquimod® auf die Zytokinproduktion von Thymuszellen nach gleichzeitiger Aktivierung mit  $\alpha$ -CD3.** Thymuszellen von weiblichen C57.BL/6 Mäusen (6-8 Wochen) wurden zu  $10^6$ -Zellen pro well ausgesät und mit Imiquimod (0,005 – 50 µg/ml) und Gardiquimod (0,0025 – 5 µg/ml) in Kombination mit  $\alpha$ -CD3 (1 µg/ml) stimuliert. Nach 20 h Inkubationszeit wurde IFN- $\gamma$ , IL-6 und IL-17 Produktion mittels ELISpot Assay ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM aus zwei unabhängigen Experimenten mit n=6 Mäusen. Signifikante Unterschiede sind mit Sternen gekennzeichnet (\* p < 0,05; \*\* p < 0,01).

Einen ähnlichen kostimulatorischen Effekt konnte auch für das Zytokin IL-6 ermittelt werden, mit statistisch hoch signifikanten Sekretionen nach Einfluss von 0,5 – 5 µg/ml Imiquimod und

0,25 – 5 µg/ml Gardiquimod®. Auch für das Zytokin IL-17 konnte nach Aktivierung mit  $\alpha$ -CD3 ein konzentrationsabhängiger Anstieg der Sekretion beobachtet werden. Hierbei konnten nach Stimulation mit 0,05 – 0,5 µg/ml Imiquimod und 0,25 µg/ml Gardiquimod® statistisch hoch signifikant erhöhte IL-17-Ausschüttungen detektiert werden.

Aus Abb. 3.26 geht hervor, dass Stimulation mit Imiquimod einen Anstieg der intrazellulären IL-17-Konzentration zur Folge hatte. Zudem konnte gezeigt werden, dass wie nach Stimulation des TLR2 mit Bakterien und Zellwandbestandteilen, auch nach Stimulation des TLR7 der größte Anteil an IL-17 von CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>-Thymozyten produziert und sezerniert wird.

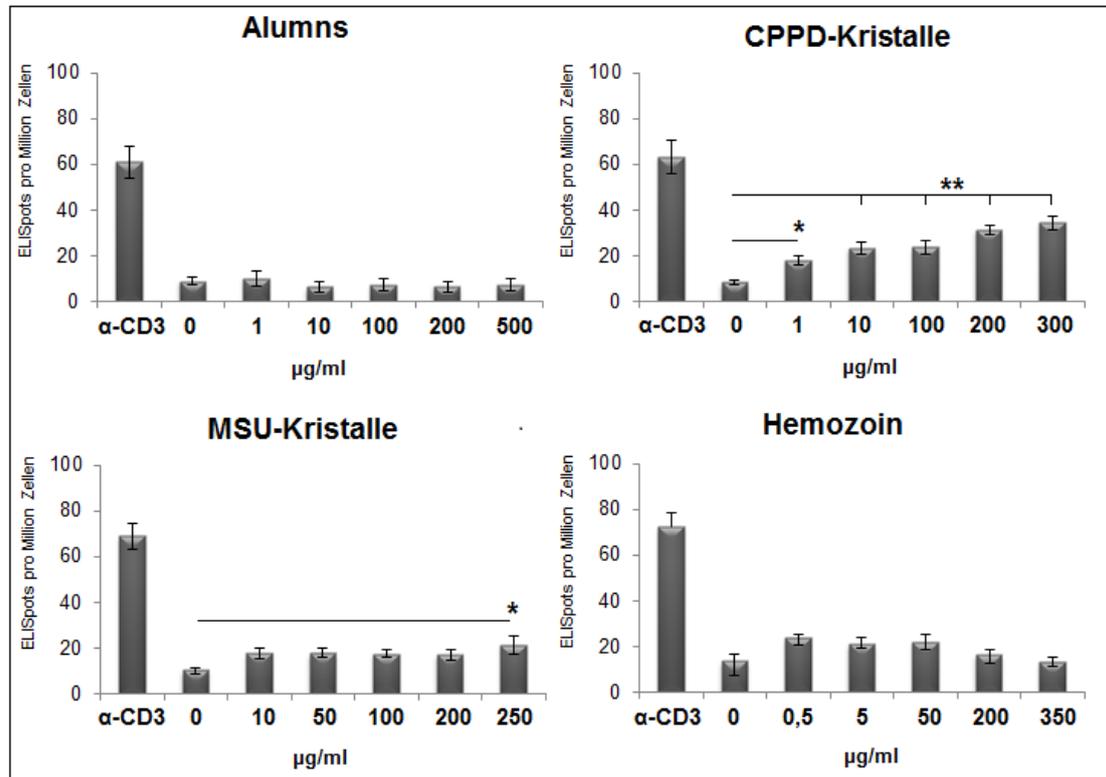


**Abbildung 3.26: Intrazelluläre IL-17-Färbung von Thymuszellen nach Stimulation mit Imiquimod.** Thymuszellen von weiblichen C57.BL/6 Mäusen (6-8 Wochen) wurden mit 5 µg/ml Imiquimod stimuliert ( $\pm$   $\alpha$ -CD3-Aktivierung, 1 µg/ml) und für 20 h stimuliert. 10 h vor Ende der Restimulationszeit wurde Brefeldin A zu den Zellen gegeben. Nach Färbung mit Fixable Viability Dye® 660 wurden die Oberflächen mit CD4 und CD8, sowie das Zytokin IL-17 gefärbt und durchflusszytometrisch bestimmt. Dargestellt sind die IL-17<sup>+</sup>-Zellen in Prozent als *frequency of parent* bezogen auf alle Zellen (obere Reihe) und die prozentualen Anteile der IL-17-produzierenden CD4<sup>+</sup>-, CD8<sup>-</sup>-, CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>- und CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>-T-Zellen (untere Reihe). Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment (n=3).

### 3.1.18 Beeinflussung der IL-17 Produktion durch *Inflammasome Inducers*

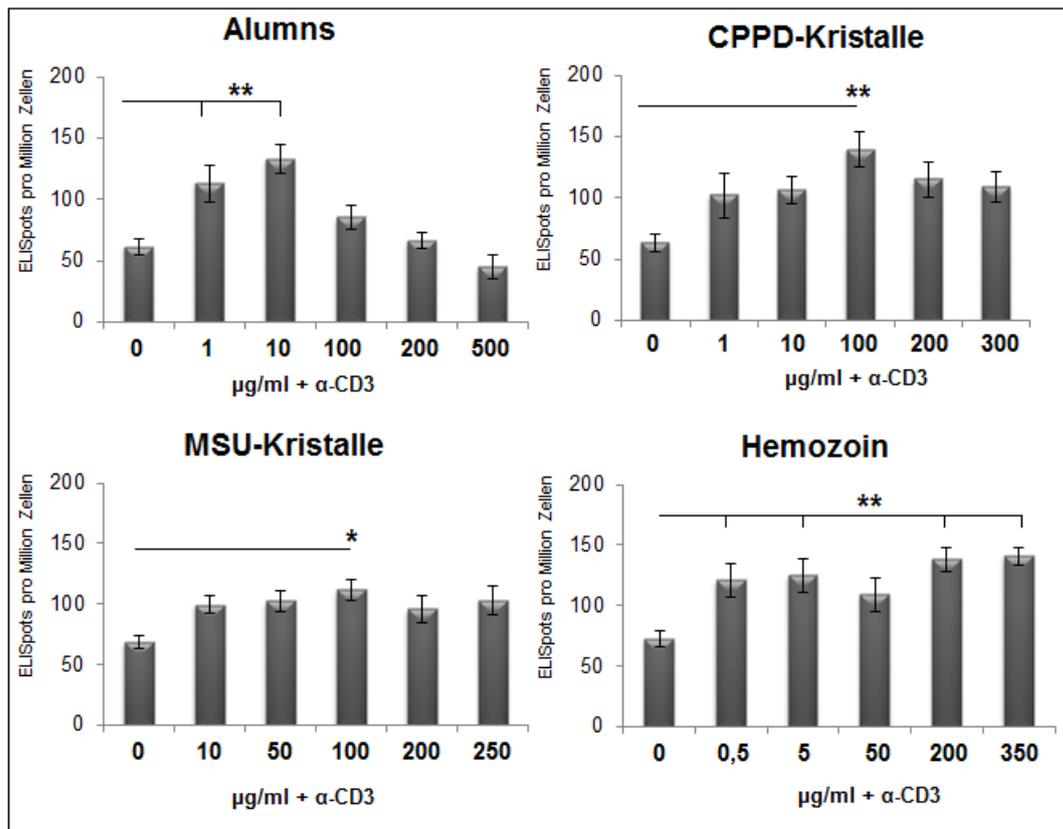
Der Inflammasome-Komplex spielt eine wichtige Rolle in der Erkennung von mikrobiellen Produkten oder endogenen Verbindungen und ist ein entscheidender Bestandteil des unspezifischen Immunsystems. Um einen Einfluss einer Inflammasome-Aktivierung auf die IL-17-Produktion zu ermitteln, wurden Thymuszellen mit verschiedenen *Inflammasome Inducers* stimuliert. Aus Abb. 3.27 geht hervor, dass Stimulation mit CPPD-Kristallen einen konzentrationsabhängigen statistisch hoch signifikanten Anstieg der IL-17 Sekretion zur Folge hatte. Zudem konnte nach Stimulation mit 250 µg/ml MSU-Kristallen eine statistisch

signifikant erhöhte IL-17-Ausschüttung beobachtet werden. Während nach Stimulation mit Hemozoin eine leichte, statistisch jedoch nicht signifikant erhöhte Ausschüttung von IL-17 ermittelt werden konnte, hatte Stimulation mit Alumns keinen Einfluss auf die IL-17 Sekretion.



**Abbildung 3.27: Einfluss von *Inflammasome Inducers* auf die IL-17 Sekretion von Thymuszellen.** Thymuszellen von weiblichen C57.BL/6 Mäusen (6-8 Wochen) wurden zu  $10^6$ -Zellen pro well ausgesät und mit Alumns (0 – 500  $\mu$ g/ml), CPPD-Kristallen (0 – 300  $\mu$ g/ml), MSU-Kristallen (0 – 250  $\mu$ g/ml) und Hemozoin (0 – 350  $\mu$ g/ml) stimuliert. Nach 20 h Inkubationszeit wurde die IL-17-Produktion mittels ELISpot Assay ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM aus zwei unabhängigen Experimenten mit n=7 Mäusen. Signifikante Unterschiede sind mit Sternen gekennzeichnet (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ).

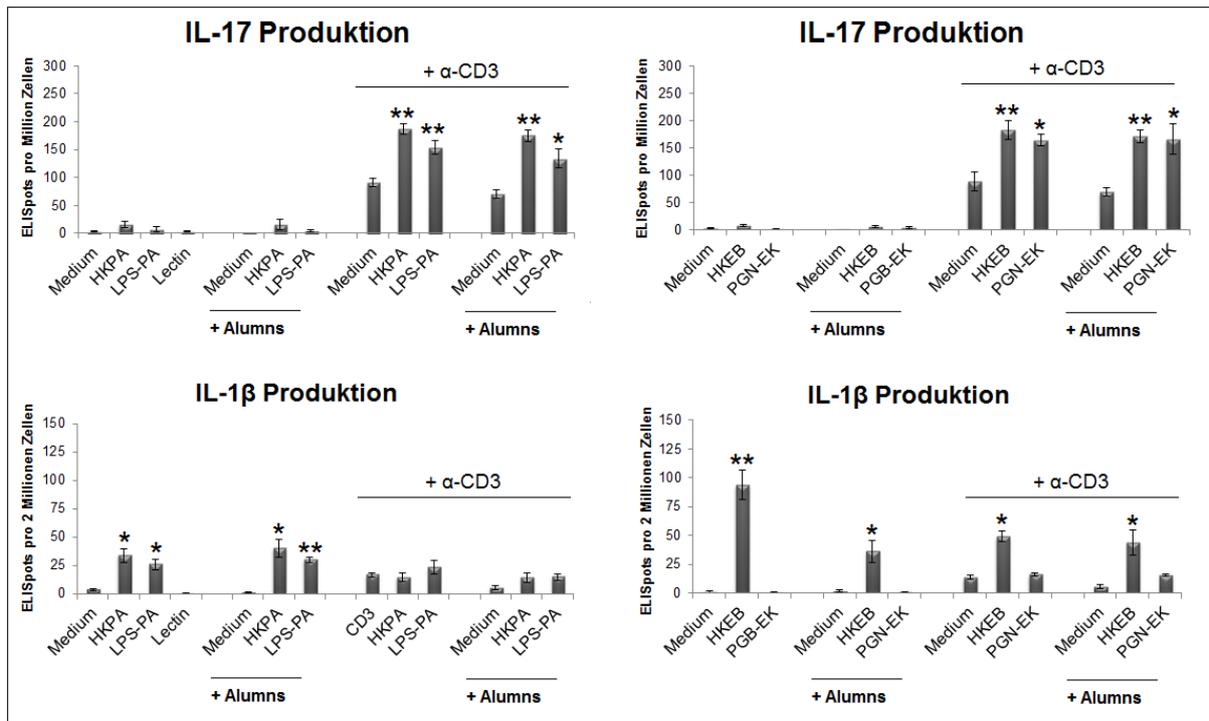
Nach einer zusätzlichen Aktivierung mit  $\alpha$ -CD3 konnte ein deutlicher Anstieg der IL-17 Sekretion beobachtet werden. Bereits nach Stimulation mit niedrigen Konzentrationen Alumns (1 – 10  $\mu$ g/ml) konnte ein statistisch hoch signifikanter Anstieg der IL-17 Sekretion detektiert werden, höhere Konzentrationen hingegen zeigten keinen kostimulatorischen Effekt (Abb. 3.28). Stimulation mit CPPD- und MSU-Kristallen hatte einen konzentrations-abhängigen Anstieg der IL-17 Sekretion zur Folge, statistisch signifikant jedoch nur bei 100  $\mu$ g/ml. Dahingegen konnte nach Stimulation mit Hemozoin sowohl bei niedrigen Konzentrationen (0,5 - 5  $\mu$ g/ml) als auch hohen Konzentrationen (200 – 350  $\mu$ g/ml) eine statistisch hoch signifikant erhöhte IL-17-Ausschüttung detektiert werden.



**Abbildung 3.28:** Einfluss von *Inflammasome Inducers* auf die IL-17 Sekretion von Thymuszellen nach gleichzeitiger Ko-Aktivierung mit  $\alpha$ -CD3. Thymuszellen von weiblichen C57.BL/6 Mäusen (6-8 Wochen) wurden zu  $10^6$ -Zellen pro well ausgesät und mit Alumns (0 – 500  $\mu$ g/ml), CPPD-Kristallen (0 – 300  $\mu$ g/ml), MSU-Kristallen (0 – 250  $\mu$ g/ml) und Hemozoin (0 – 350  $\mu$ g/ml) in Kombination mit  $\alpha$ -CD3 (1  $\mu$ g/ml) stimuliert. Nach 20 h Inkubationszeit wurde die IL-17-Produktion mittels ELISpot Assay ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM aus zwei unabhängigen Experimenten mit n=7 Mäusen. Signifikante Unterschiede sind mit Sternen gekennzeichnet (\* p < 0,05; \*\* p < 0,01).

### 3.1.19 Einfluss von Bakterien in Kombination mit Alumn- Kristallen auf die IL-17 und IL-1 $\beta$ Produktion

Wie in Abb. 3.29 dargestellt, konnte durch zusätzliche Stimulation mit Alumn-Kristallen keine Beeinflussung der durch TLR2- oder TLR4-Stimulation induzierten IL-17 Sekretion detektiert werden. Auch nach zusätzlicher Aktivierung mit  $\alpha$ -CD3 konnte kein zusätzlicher stimulierender Effekt ermittelt werden. Zudem konnte nach Stimulation mit HKPA, HKEB und LPS-PA eine statistisch signifikant erhöhte IL-1 $\beta$  Ausschüttung detektiert werden. Nach kombinierter Stimulation mit Alumn-Kristallen konnte keine zusätzliche Erhöhung der IL-1 $\beta$  Sekretion beobachtet werden, sondern im Falle von HKEB sogar eine verminderte IL-1 $\beta$  Ausschüttung. Zudem zeigte sich, dass eine zusätzliche Aktivierung des TZR mit  $\alpha$ -CD3 keinen Einfluss auf die IL-1 $\beta$  Sekretion von Thymuszellen hat.

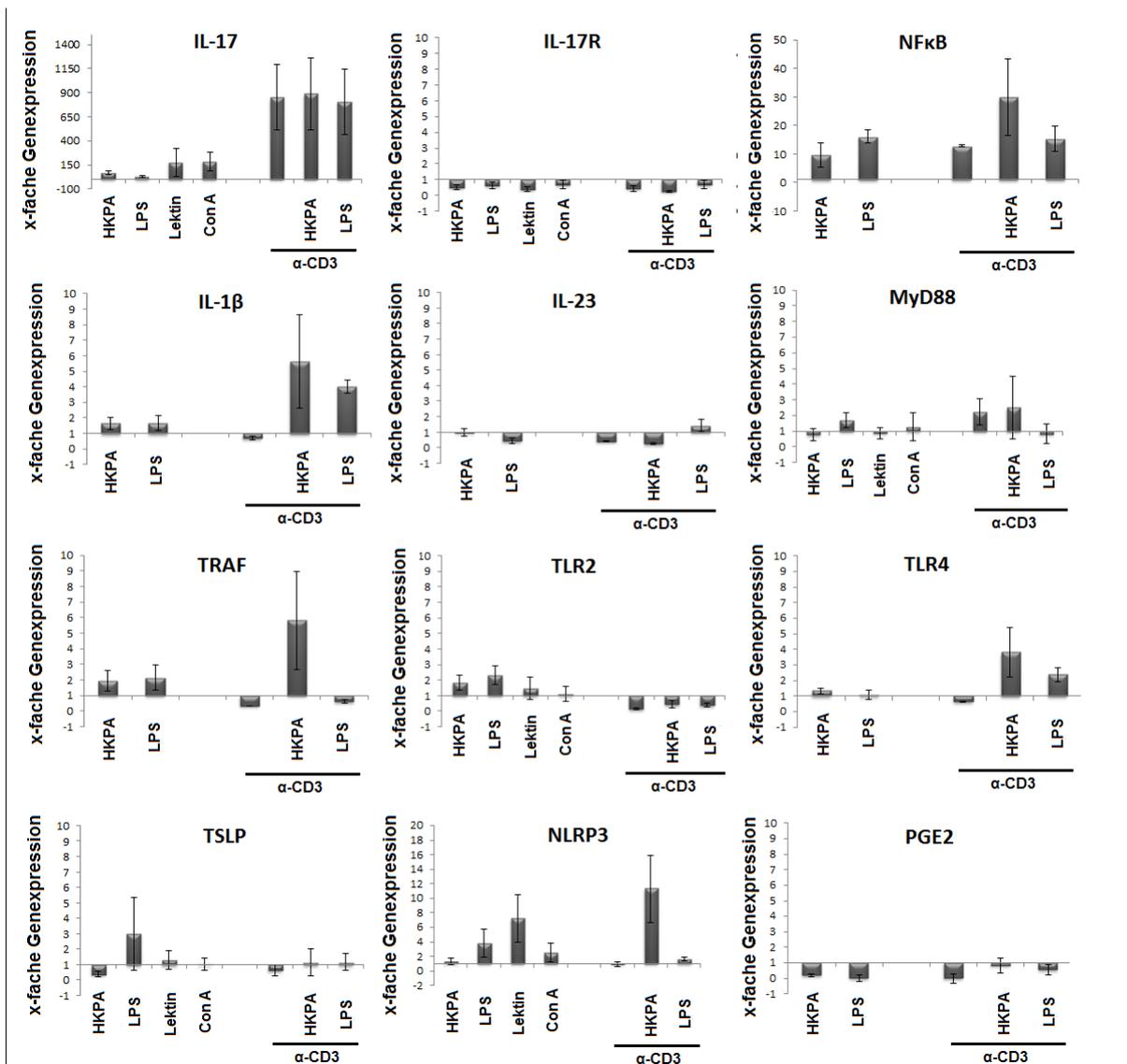


**Abbildung 3.29: Beeinflussung der IL-17 und IL-1 $\beta$  Produktion nach Stimulation mit HKPA, HKEB und deren Zellwandbestandteilen in Kombination mit Alumun-Kristallen.** Thymuszellen von weiblichen C57.BL/6 Mäusen (6-8 Wochen) wurden zu  $10^6$ -  $2 \cdot 10^6$  Zellen pro well ausgesät und mit HKPA ( $10^8$ /ml), HKEB ( $10^8$ /ml), Lektin ( $1 \mu\text{g/ml}$ ), LPS-PA ( $1 \mu\text{g/ml}$ ) und PGN-EB ( $5 \mu\text{g/ml}$ ) in Kombination mit  $\alpha$ -CD3 ( $1 \mu\text{g/ml}$ ) und Alumuns ( $10 \mu\text{g/ml}$ ) stimuliert. Nach 24 h Inkubationszeit wurde die Zytokinproduktion mittels ELISpot Assay ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM aus zwei unabhängigen Experimenten mit  $n=4$  Mäusen. Signifikante Unterschiede sind mit Sternen gekennzeichnet (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ).

### 3.1.20 PCR

Abschließend wurde der Einfluss von HKPA, LPS, Lektin und Con A auf die Genexpression von Thymuszellen untersucht. Wie in Abb. 3.30 dargestellt, konnte eine erhöhte Genexpression von IL-17A mRNA ermittelt werden, am deutlichsten nach Stimulation mit Lektin und Con A. Eine zusätzliche  $\alpha$ -CD3-Aktivierung führte nochmals zu einer deutlich gesteigerten Genexpression von IL-17A, jedoch hatte der Einfluss von HKPA und LPS keine weitere Erhöhung zur Folge. Weiterhin konnten nach Aktivierung mit  $\alpha$ -CD3 und Stimulation mit HKPA und LPS leicht erhöhte Expressionsraten von IL-1 $\beta$  und TLR4 nachgewiesen werden. Dahingegen konnten nach Stimulation mit HKPA und LPS leicht erhöhte Expression von TLR2 nachgewiesen werden, allerdings nicht mehr nach zusätzlicher  $\alpha$ -CD3-Aktivierung. Eine erhöhte Genexpressionsrate von TSLP (*thymic stromal lymphopietin*) konnte nur nach Stimulation mit LPS detektiert werden. Eine gesteigerte Expression konnte auch für TRAF beobachtet werden, jedoch nur nach Stimulation mit HKPA und gleichzeitiger Aktivierung mit  $\alpha$ -CD3. Zudem führte eine  $\alpha$ -CD3-Aktivierung zu einer erhöhten Expression von MyD88.

Nach Stimulation mit HKPA und LPS konnte eine erhöhte Expression von NFκB nachgewiesen werden, die nach Aktivierung mit α-CD3 durch den Einfluss von HKPA nochmals verstärkt wurde. Während Stimulation mit LPS und besonders Lektin eine erhöhte Genexpression von NLRP3 zur Folge hatte, konnte durch den Einfluss von HKPA lediglich nach Aktivierung mit α-CD3 eine erhöhte Expression beobachtet werden. Dahingegen konnte keine erhöhte Genexpression von IL-17R, IL-23, IRAK4 und IRF3 nach Stimulation mit HKPA und LPS (± α-CD3) nachgewiesen werden. Für PGE2 (Prostaglandin E2) wurden sogar verminderte Expressionen nach Stimulation mit allen getesteten Antigenen ermittelt.

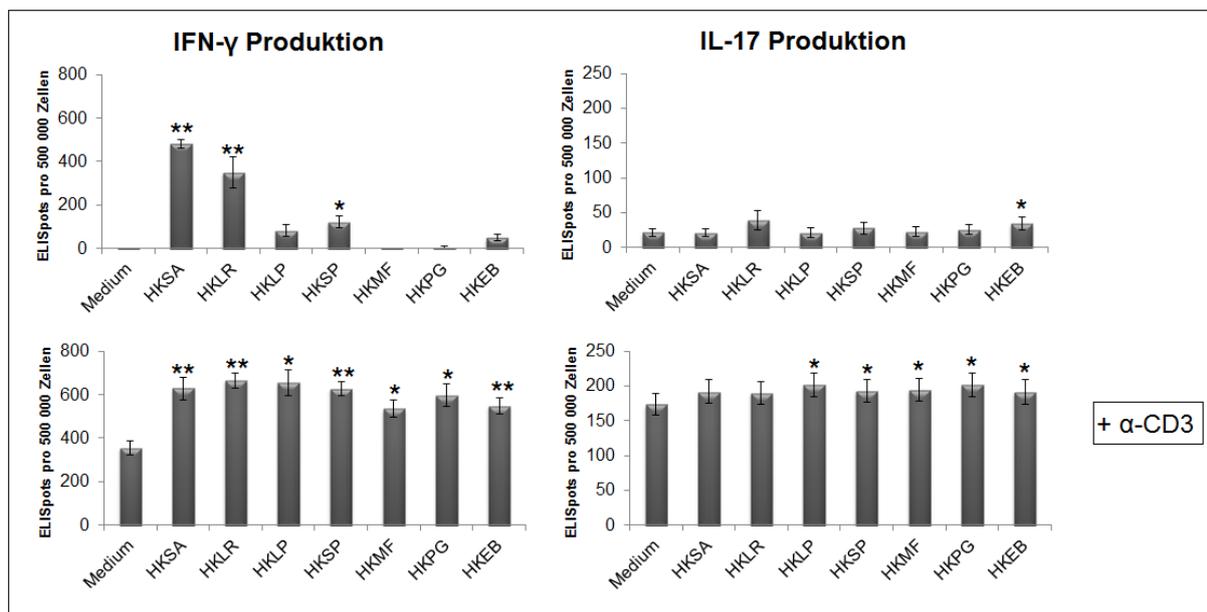


**Abbildung 3.30: Genexpressionsanalyse von Thymuszellen nach Stimulation mit HKPA, LPS und Lektin.** Thymuszellen von weiblichen C57.BL/6 Mäusen (6-8 Wochen) wurden mit HKPA ( $10^8$ /ml), LPS-PA ( $1 \mu\text{g/ml}$ ), Lektin ( $1 \mu\text{g/ml}$ ) und Con A ( $1 \mu\text{g/ml}$ ) in Kombination mit α-CD3 ( $1 \mu\text{g/ml}$ ) stimuliert. Nach 48 h Inkubationszeit wurde die RNA isoliert, cDNA synthetisiert und zur qRT-PCR mit verschiedenen Primern verwendet. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM der x-fachen relativen Genexpressionsrate eines Zielgens von n=3 Mäusen bezogen auf eine unstimulierte Kontrollprobe.

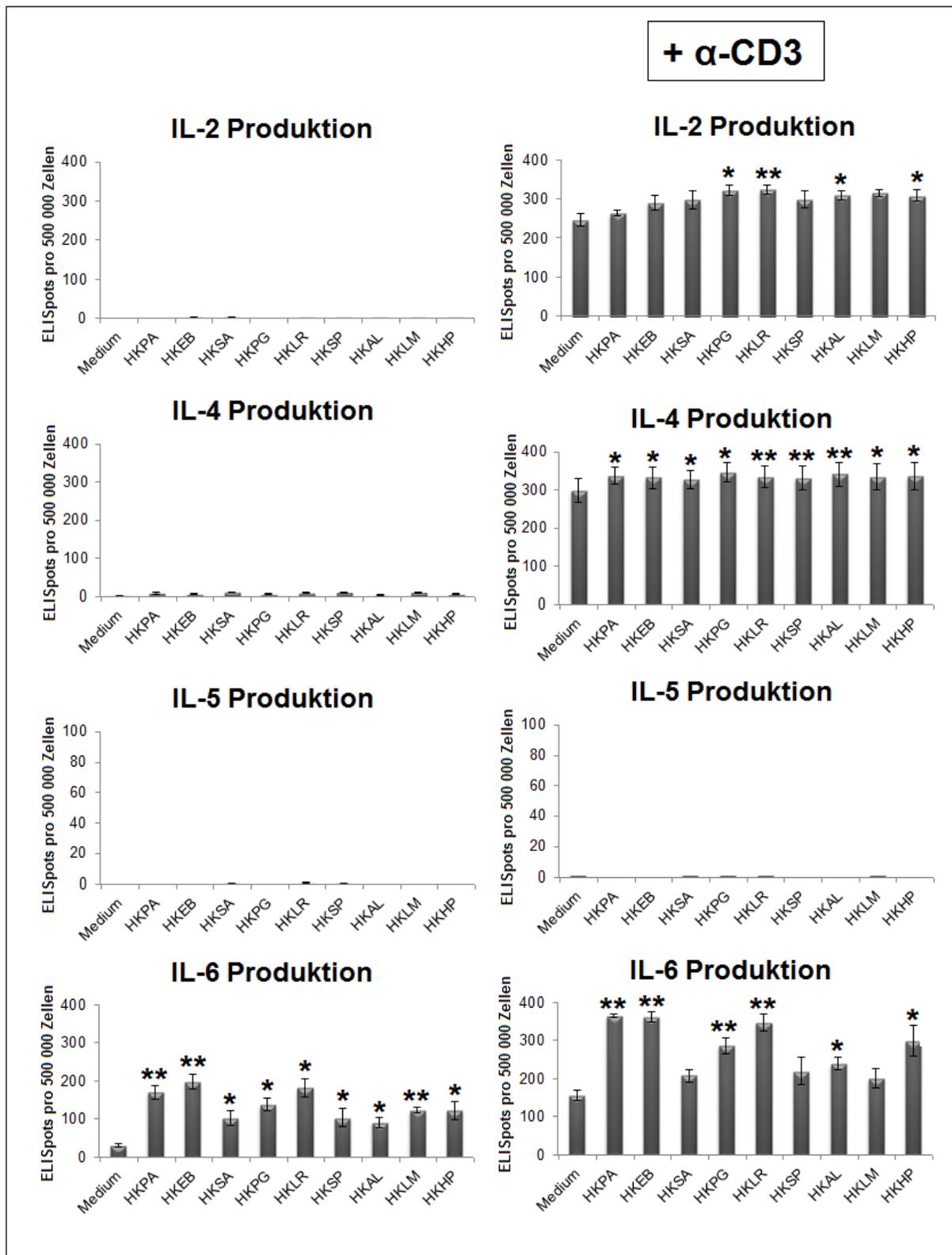
## 3.2 Beeinflussung der Zytokinproduktion von Milzzellen

### 3.2.1 Einfluss von Bakterien auf die Zytokinproduktion von Milzzellen

*In vitro* wurde der Einfluss von verschiedenen hitze-getöteten Bakterien auf die Produktion pro- und anti-inflammatorischer Zytokine von Milzzellen untersucht. Aus Abb. 3.31 geht hervor, dass Stimulation mit HKSA und HKLR zu einer statistisch hoch signifikant erhöhten IFN- $\gamma$ -Produktion führte. Stimulation mit HKSP hatte eine statistisch signifikante Induktion von IFN- $\gamma$  zur Folge. Nach Koaktivierung mit  $\alpha$ -CD3 konnte für alle getesteten Bakterien eine statistisch signifikante Erhöhung der IFN- $\gamma$  Sekretion ermittelt werden, statistisch hoch signifikant jedoch nur nach Stimulation mit HKSA, HKLR, HKSP und HKEB. Dahingegen konnte nur eine geringe Beeinflussung der IL-17 Ausschüttung ermittelt werden. Lediglich nach Stimulation mit HKLR, HKSP und HKEB konnten leichte stimulatorische Effekte detektiert werden, statistisch signifikant jedoch nur nach Stimulation mit HKEB. Nach zusätzlicher Aktivierung mit  $\alpha$ -CD3 konnte nach Stimulation mit HKLP, HKSP, HKMF, HKPG und HKEB eine leicht erhöhte, statistisch signifikante IL-17 Sekretion beobachtet werden.

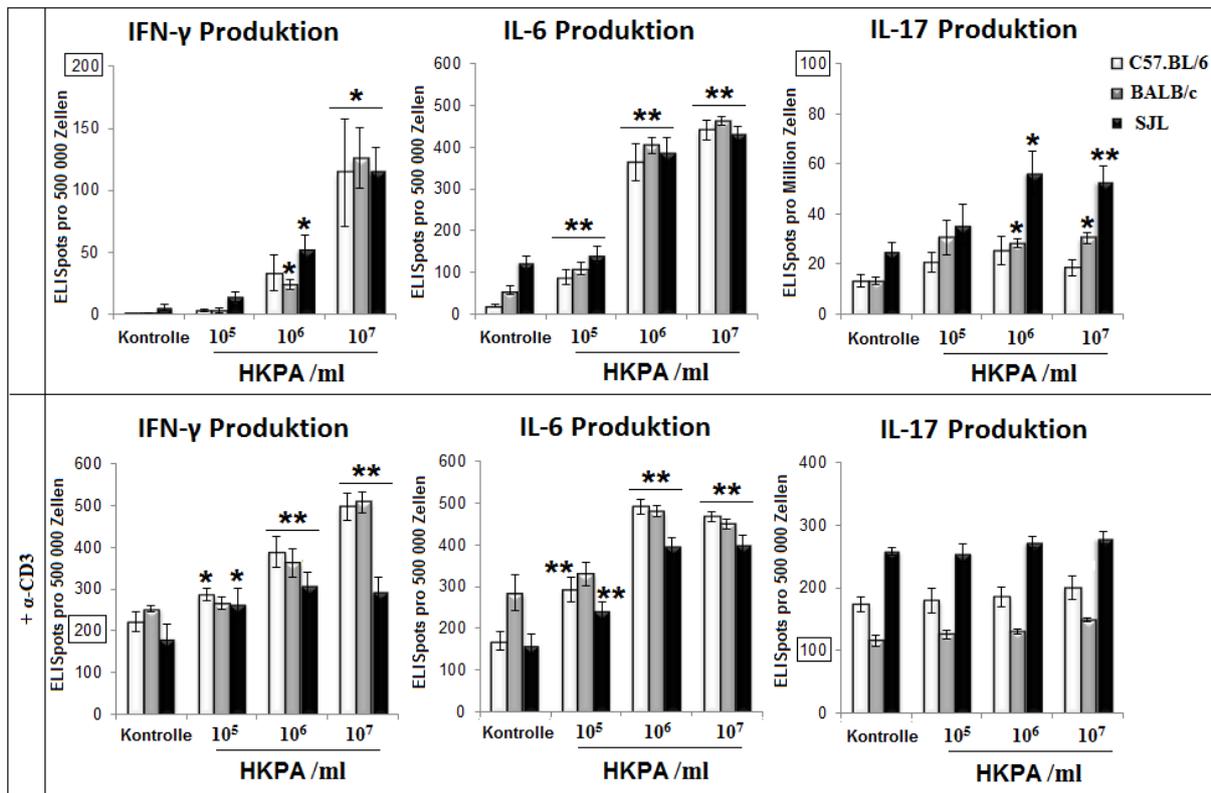


**Abbildung 3.31: Einfluss von hitze-getöteten Bakterien auf die IFN- $\gamma$  und IL-17 Produktion.** Milzzellen von weiblichen C57.BL/6 Mäusen (6-8 Wochen) wurden zu  $5 \cdot 10^5$ -Zellen pro well ausgesät und mit  $10^7$ /ml HKMF,  $10^7$ /ml HKLP bzw.  $10^8$ /ml HKEB, HKLR, HKPG, HKSA und HKSP in Kombination mit  $\alpha$ -CD3 (1  $\mu$ g/ml) stimuliert. Nach 20 h Inkubationszeit wurde die IFN- $\gamma$  und IL-17 Produktion mittels ELISpot Assay ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM aus drei unabhängigen Experimenten mit n=6 Mäusen. Signifikante Unterschiede sind mit Sternen gekennzeichnet (\* p < 0,05; \*\* p < 0,01).



**Abbildung 3.32: Einfluss von hitze-getöteten Bakterien auf die IL-2, IL-4, IL-5 und IL-6 Produktion.** Milzzellen von weiblichen C57.BL/6 Mäusen (6-8 Wochen) wurden zu  $5 \cdot 10^5$ -Zellen pro well ausgesät und mit  $10^7$ /ml HKAL,  $10^7$ /ml HKHP bzw.  $10^8$ /ml HKPA, HKEB, HKLR, HKPG, HKSA, HKSP und HKLM in Kombination mit  $\alpha$ -CD3 (1  $\mu$ g/ml) stimuliert. Nach 20 h Inkubationszeit wurde die Zytokinproduktion mittels ELISpot Assay ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM aus zwei unabhängigen Experimenten mit n=4 Mäusen. Signifikante Unterschiede sind mit Sternen gekennzeichnet (\* p < 0,05; \*\* p < 0,01).

Dahingegen hatte die Stimulation mit Bakterien keinen Einfluss auf die IL-2- und IL-4-Produktion (Abb. 3.32). Nach  $\alpha$ -CD3-Aktivierung konnten hingegen bei allen Bakterien leicht erhöhte IL-2-Sekretionen beobachtet werden, statistisch signifikant jedoch nur nach Stimulation mit HKPG, HKLR, HKAL und HKHP. Für das Zytokin IL-4 konnte bei allen getesteten Bakterien ein statistisch signifikanter kostimulatorischer Effekt detektiert werden. Hinsichtlich der IL-5-Induktion konnte kein stimulatorischer Effekt ermittelt werden, auch nicht nach zusätzlicher Koaktivierung mit  $\alpha$ -CD3. Des Weiteren konnte eine deutliche, statistisch signifikante IL-6 Induktion nach Stimulation mit allen getesteten Bakterien nachgewiesen werden, statistisch hoch signifikant nach Stimulation mit HKPA und HKEB. Eine zusätzliche  $\alpha$ -CD3-Aktivierung verstärkte den kostimulatorischen Effekt und führte zu statistisch hoch signifikanten IL-6-Ausschüttungen nach Stimulation mit HKPA, HKEB, HKPG und HKLR bzw. statistisch signifikanten nach Stimulation mit HKAL und HKHP.

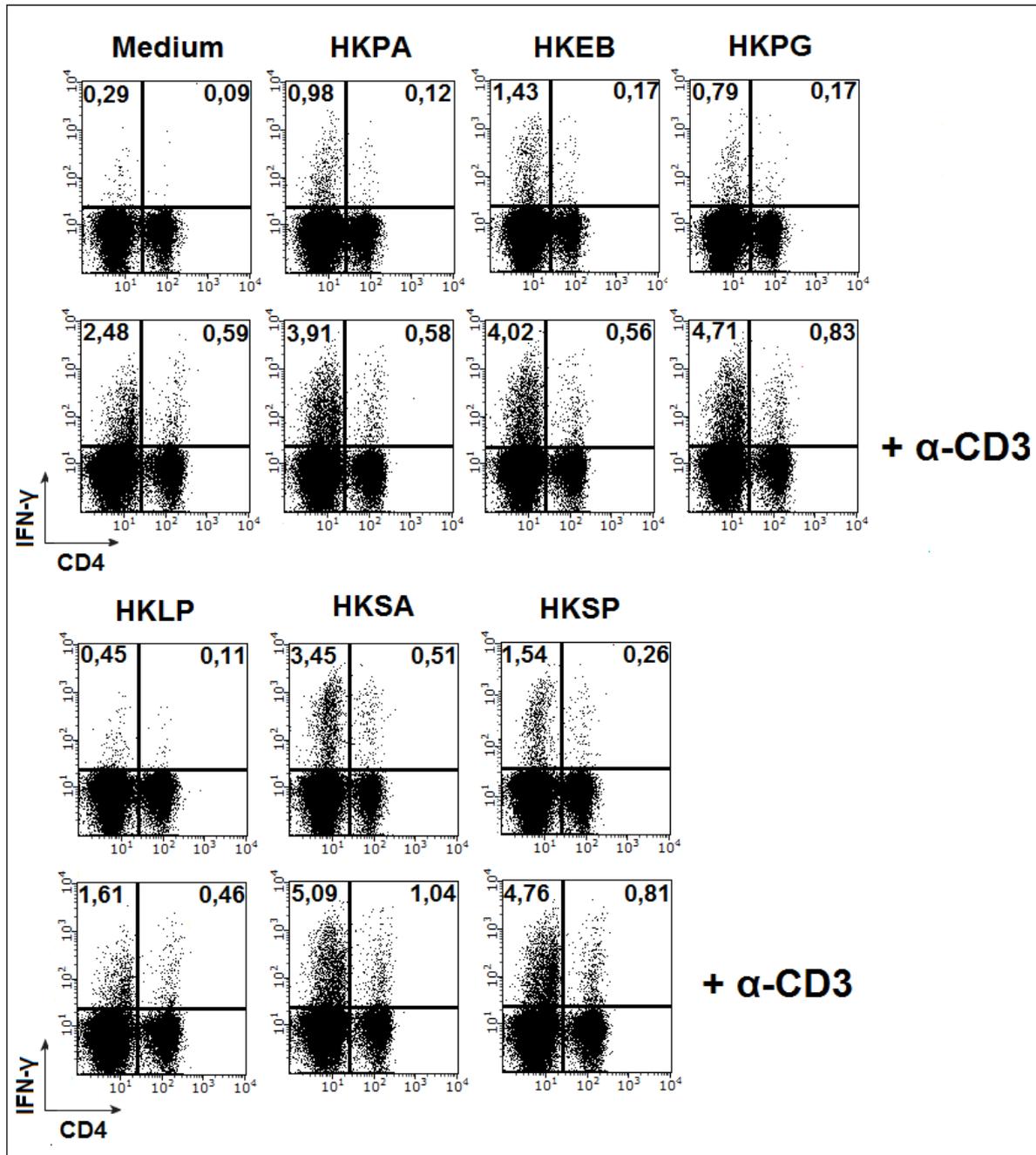


**Abbildung 3.33: Konzentrationsabhängigkeit der Zytokinantwort nach Stimulation mit HKPA.** Milzzellen von weiblichen C57.BL/6, BALB/c und SJL Mäusen (6-8 Wochen) wurden zu  $5 \cdot 10^5$ -Zellen pro well ausgesät und mit  $10^5 - 10^7$  HKPA  $\pm$   $\alpha$ -CD3 (1  $\mu$ g/ml) stimuliert. Nach 20 h Inkubationszeit wurde die Zytokinproduktion mittels ELISpot Assay ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM aus zwei unabhängigen Experimenten mit 4-8 Mäusen (ohne  $\alpha$ -CD3 n=4; mit  $\alpha$ -CD3 n=8). Signifikante Unterschiede sind mit Sternchen gekennzeichnet (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ).

Um einen speziesabhängigen Effekt hinsichtlich der Zytokinausschüttung von Milzzellen genauer zu untersuchen, wurden drei genetisch unterschiedliche Mausstämme mit verschiedenen Konzentrationen HKPA stimuliert. Wie aus Abb. 3.33 hervorgeht, konnte speziesunabhängig ein statistisch signifikanter, konzentrationsabhängiger Anstieg der IFN- $\gamma$  Sekretion nach Stimulation mit HKPA ermittelt werden. Eine gleichzeitige Koaktivierung mit  $\alpha$ -CD3 führte zu einer deutlichen, statistisch hoch signifikant erhöhten IFN- $\gamma$  Ausschüttung, unabhängig von dem getesteten Mausstamm. Bereits nach Stimulation mit  $10^5$  HKPA/ml konnte ein statistisch hoch signifikanter Anstieg der IL-6 Sekretion beobachtet werden, die bei zunehmender HKPA-Konzentration nochmals deutlich anstieg. Nach  $\alpha$ -CD3-Aktivierung konnte lediglich nach Stimulation mit  $10^5$  HKPA/ml ein kostimulatorischer Effekt detektiert werden, auch nur in C57.BL/6 und SJL-Mäusen. Hinsichtlich der IL-17 Produktion konnte kein so stark ausgeprägter Einfluss beobachtet werden. Nach Stimulation mit  $10^6$  und  $10^7$  HKPA/ml konnte eine leicht erhöhte, statistisch signifikante IL-17 Sekretion nachgewiesen werden, jedoch nur in BALB/c und SJL-Mäusen. Nach zusätzlicher Koaktivierung mit  $\alpha$ -CD3 konnten zwar deutlich höhere IL-17-Sekretionen detektiert werden, jedoch konnte kein kostimulatorischer Effekt der getesteten Konzentration nachgewiesen werden.

### **3.2.2 Die meisten IFN- $\gamma$ produzierenden Milzzellen sind CD4 negativ**

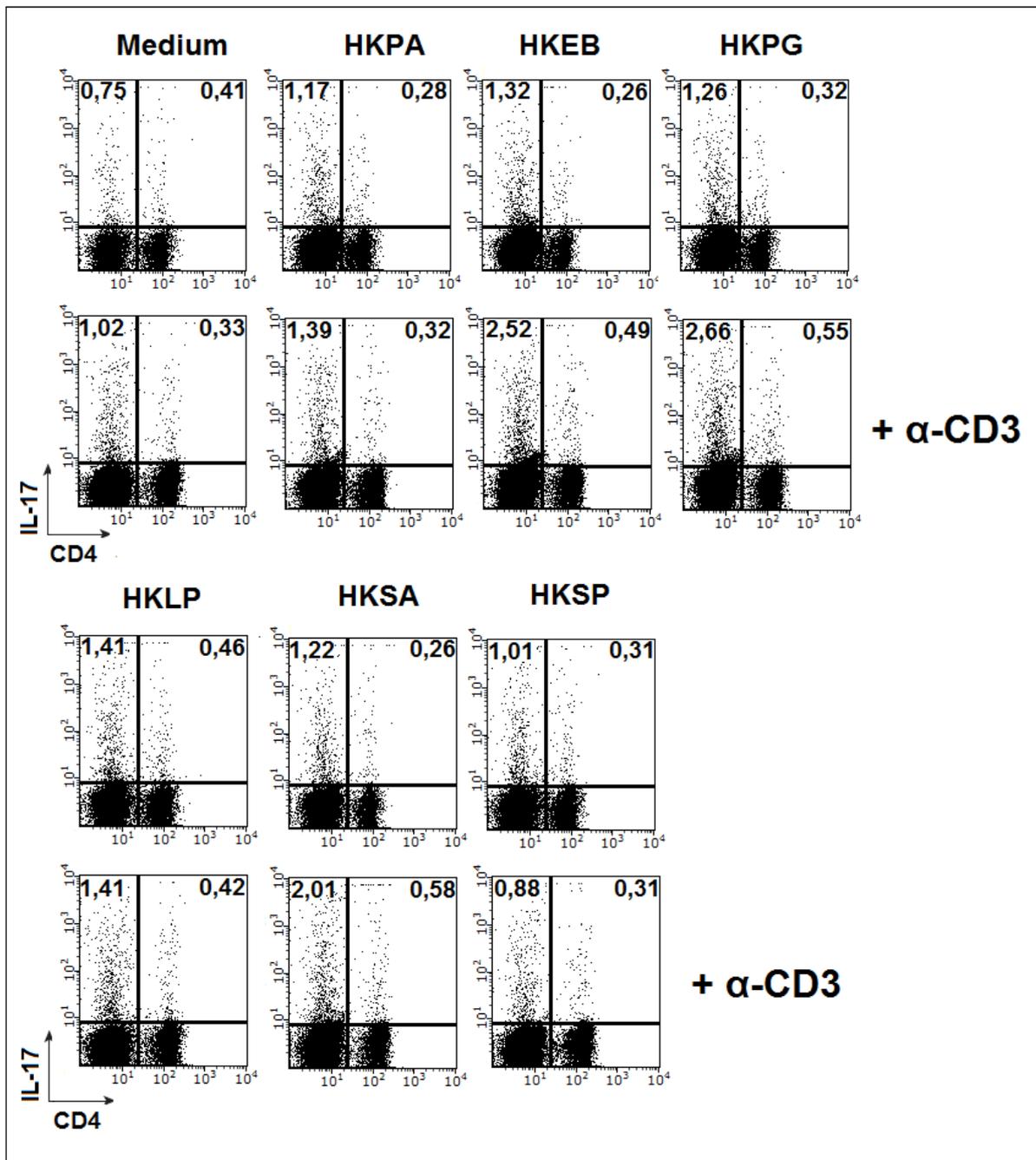
Zur näheren Untersuchung der IFN- $\gamma$  produzierenden Subpopulationen wurden Milzzellen mit verschiedenen Bakterien in Kombination mit  $\alpha$ -CD3 für 16 h inkubiert und die intrazelluläre IFN- $\gamma$  Konzentration mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Wie in Abb. 3.34 dargestellt, konnte nach Stimulation mit allen getesteten Bakterien ein Anstieg der intrazellulären IFN- $\gamma$  Konzentration von CD4<sup>+</sup>- T-Zellen und CD4<sup>-</sup>- Milzzellen detektiert werden, mit der deutlichsten Steigerung nach Einfluss von HKSA (CD4<sup>+</sup>: 0,51% CD4<sup>-</sup>: 3,45%) im Vergleich zur Kontrolle (CD4<sup>+</sup>: 0,09% CD4<sup>-</sup>: 0,29%). Eine zusätzliche Aktivierung mit  $\alpha$ -CD3 führte zwar zu einer Erhöhung der intrazellulären IFN- $\gamma$  Konzentration von CD4<sup>+</sup>- T-Zellen, jedoch konnte nur nach Stimulation mit HKPG (0,83%), HKSA (1,04%) und HKSP (0,81%) ein kostimulatorischer Effekt im Vergleich zur  $\alpha$ -CD3-Kontrolle (0,59%) ermittelt werden. Dahingegen konnte ein deutlicher Anstieg der IFN- $\gamma$  Konzentration CD4<sup>-</sup>- Milzzellen nach  $\alpha$ -CD3-Aktivierung (2,48%) im Vergleich zur Kontrolle (0,29%) beobachtet werden. Weiterhin führte eine zusätzliche Stimulation mit HKPA (3,91%), HKEB (4,02%), HKPG (4,71%), HKSA (5,09%) und HKSP (4,76%) zu einer deutlichen Erhöhung der intrazellulären IFN- $\gamma$  Konzentration von CD4<sup>-</sup>-Milzzellen.



**Abbildung 3.34: Intrazelluläre IFN- $\gamma$  Färbung von Milzzellen nach Stimulation mit Bakterien.** Milzzellen von weiblichen C57.BL/6 Mäusen (6-8 Wochen) wurden mit  $10^8$ /ml HKPA, HKEB, HKPG, HKLP, HKSA und HKSP für 20 h stimuliert ( $\pm$   $\alpha$ -CD3-Aktivierung, 1  $\mu$ g/ml). 4 h vor Ende der Restimulationszeit wurde Brefeldin A zu den Zellen gegeben. Nach Färbung mit *Fixable Viability Dye*® 660 wurden die Oberflächen mit CD4 und CD8, sowie das Zytokin IFN- $\gamma$  gefärbt und durchflusszytometrisch bestimmt. Dargestellt sind die IFN- $\gamma$  positiven Zellen von CD4<sup>+</sup>- und CD4<sup>-</sup>- Zellen in Prozent als *frequency of parent* bezogen auf alle Zellen nach dem Ausschluss toter Zellen. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment (n=4).

### 3.2.3 Einfluss von Bakterien auf die intrazelluläre IL-17 Konzentration von Milzzellen

Wie aus Abb. 3.35 hervorgeht, hatte die Stimulation mit Bakterien keinen Einfluss auf die intrazelluläre IL-17 Konzentration von CD4<sup>+</sup>- T-Zellen.



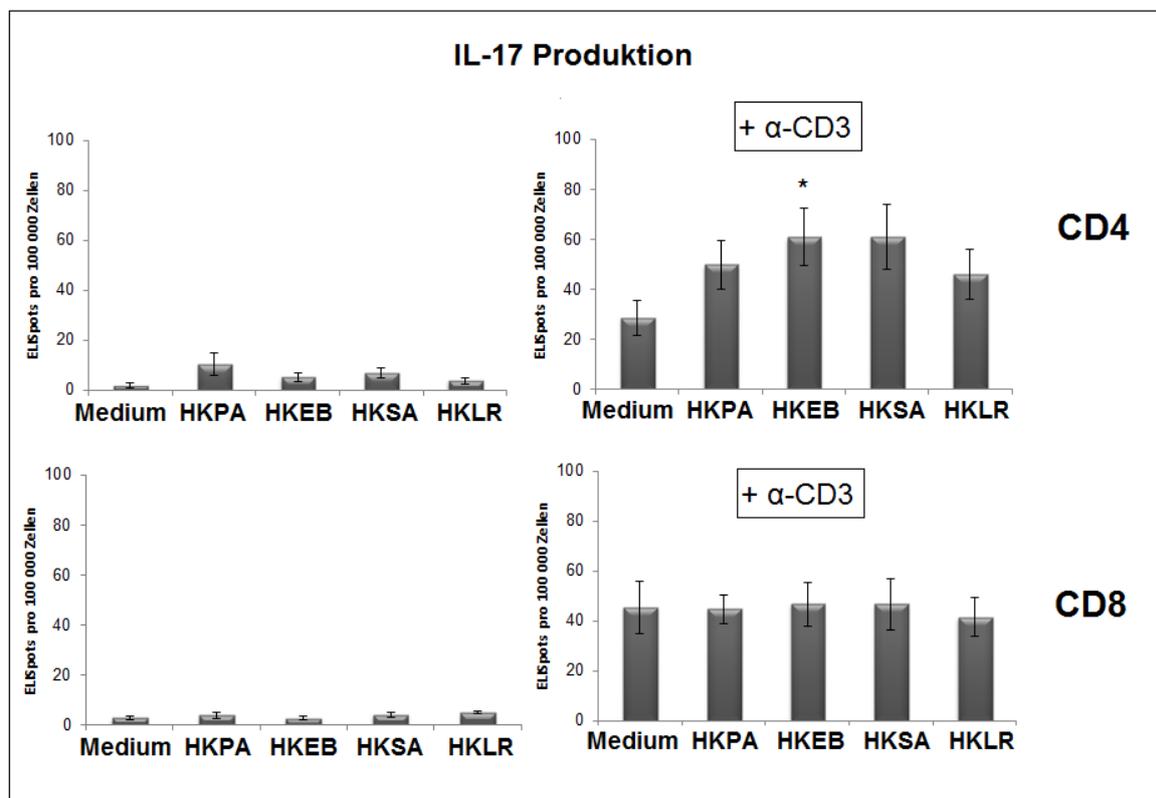
**Abbildung 3.35: Intrazelluläre IL-17 Färbung nach Stimulation mit hitze-getöteten Bakterien.** Milzzellen von weiblichen C57.BL/6 Mäusen (6-8 Wochen) wurden mit  $10^8$ /ml HKPA, HKEB, HKPG, HKLP, HKSA und HKSP für 20 h stimuliert ( $\pm$   $\alpha$ -CD3-Aktivierung, 1  $\mu$ g/ml). 4 h vor Ende der Restimulationszeit wurde Brefeldin A zu den Zellen gegeben. Nach Färbung mit *Fixable Viability Dye*<sup>®</sup> 660 wurden die Oberflächen mit CD4 und CD8, sowie das Zytokin IL-17 gefärbt und durchflusszytometrisch bestimmt. Dargestellt sind die IL-17<sup>+</sup> - CD4<sup>+</sup> - und CD4<sup>-</sup> - Zellen in Prozent als *frequency of parent* bezogen auf alle Zellen nach dem Ausschluss toter Zellen. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment (n=4).

Nach zusätzlicher Aktivierung mit  $\alpha$ -CD3 konnte nach Stimulation mit HKEB (0,49%), HKPG (0,55%) und HKSA (0,58%) ein geringer kostimulatorischer Effekt im Vergleich zur Kontrolle (0,33 %) ermittelt werden. Dahingegen konnte ein Anstieg der intrazellulären IL-

IL-17-Konzentration von CD4<sup>+</sup>- Milzzellen nach Einfluss von allen getesteten Bakterien beobachtet werden. Eine Koaktivierung mit  $\alpha$ -CD3 führte nochmals zu einer deutlichen Steigerung der IL-17 Konzentration nach Stimulation mit HKEB (2,52%), HKPG (2,66%) und HKSA (2,01%), bzw. einer geringeren Steigerung nach Stimulation mit HKPA (1,39%) und HKLP (1,41%) im Vergleich zur  $\alpha$ -CD3 Kontrolle (1,02%).

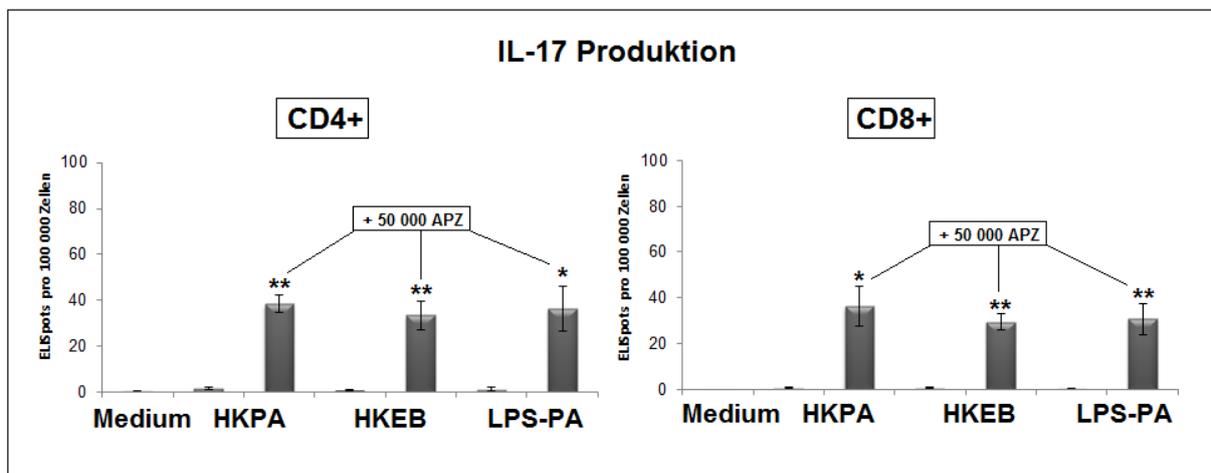
### 3.2.4 Einfluss von Bakterien auf die IL-17-Produktion von CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>- T-Zellen

Wie in Abb. 3.36 dargestellt, konnten nach Stimulation mit hitze-getöteten Bakterien nur geringe, statistisch nicht signifikante IL-17-Sekretionen von CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>- T-Zellen detektiert werden. Nach einer zusätzlichen Aktivierung mit  $\alpha$ -CD3 konnte hingegen nach Stimulation mit allen getesteten Bakterien eine erhöhte IL-17-Sekretion von CD4<sup>+</sup>- T-Zellen nachgewiesen werden, statistisch signifikant jedoch nur nach Stimulation mit HKEB. Für CD8<sup>+</sup>- T-Zellen konnte hingegen kein kostimulatorischer Effekt nach  $\alpha$ -CD3-Aktivierung beobachtet werden.



**Abbildung 3.36: Einfluss von hitze-getöteten Bakterien auf die IL-17 Produktion von isolierten CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>- T-Zellen.** CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>- T-Zellen wurden mittels MACS-Separation aus Milzzellen von weiblichen C57.BL/6 Mäusen (6-8 Wochen) isoliert, zu 10<sup>5</sup>-Zellen pro well ausgesät und mit 10<sup>8</sup>/ml HKPA, HKEB, HKSA und HKLR in Kombination mit  $\alpha$ -CD3 (1  $\mu$ g/ml) stimuliert. Nach 48 h Inkubationszeit wurde die IL-17 Produktion mittels ELISpot Assay ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM aus drei unabhängigen Experimenten mit n=6 Mäusen. Signifikante Unterschiede sind mit Sternen gekennzeichnet (\* p < 0,05).

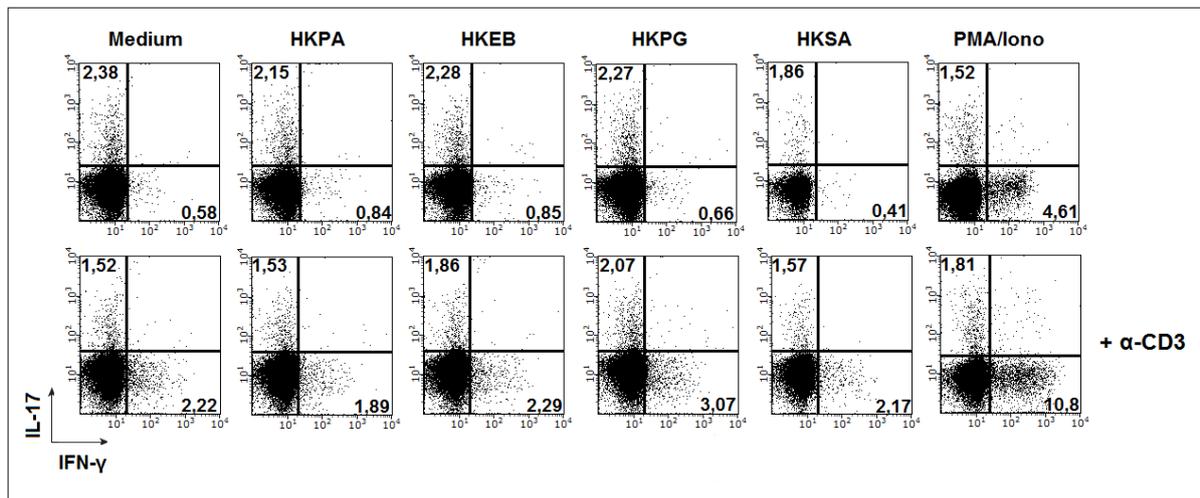
Nach gleichzeitiger Kultivierung mit 50 000 APZ konnte nach Stimulation mit HKPA und HKEB sowohl bei CD4<sup>+</sup>-, als auch bei CD8<sup>+</sup>- T-Zellen ein statistisch signifikanter Anstieg der IL-17 Sekretion beobachtet werden (Abb. 3.37). Durch die statistisch signifikant erhöhte IL-17 Sekretion nach Stimulation mit LPS konnte zudem gezeigt werden, dass die IL-17 Sekretion von CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>- T-Zellen nicht abhängig von einer Antigenpräsentation über den TLR2 ist.



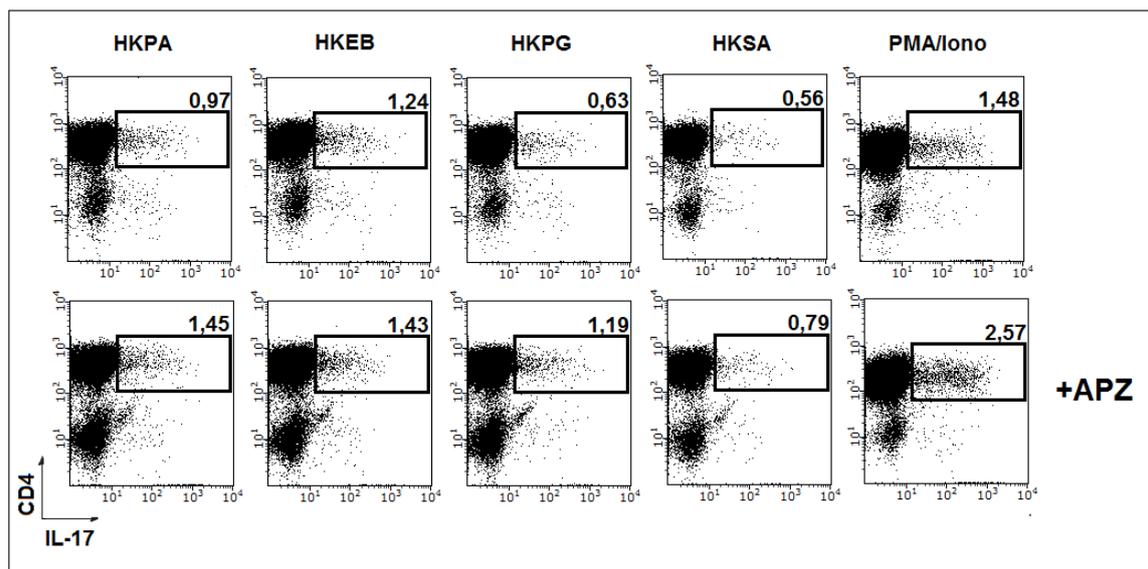
**Abbildung 3.37: Einfluss von HKPA, HKEB und LPS auf die IL-17 Produktion von CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>- T-Zellen in Abhängigkeit von APZ.** CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>- T-Zellen, isoliert aus Milzzellen von weiblichen C57.BL/6 Mäusen (6-8 Wochen) wurden zu 10<sup>5</sup>-Zellen pro well ausgesät und nach Zugabe von 50 000 APZ mit HKPA (10<sup>8</sup>/ml), HKEB (10<sup>8</sup>/ml) und LPS (1 µg/ml) stimuliert. Nach 24 h Inkubationszeit wurde die IL-17 Produktion mittels ELISpot Assay ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM aus drei unabhängigen Experimenten mit n=6 Mäusen. Signifikante Unterschiede sind mit Sternen gekennzeichnet (\* p < 0,05; \*\* p < 0,01).

### 3.2.5 Beeinflussung der intrazellulären IL-17 und IFN-γ Konzentration von isolierten CD4<sup>+</sup>- T-Zellen durch Stimulation mit Bakterien

Die Stimulation mit Bakterien hatte bereits nach 5 h einen leichten Abfall der intrazellulären IL-17 Konzentration von CD4<sup>+</sup>- T-Zellen zur Folge (Abb. 3.38). Eine mögliche Ursache hierfür ist die Sekretion von IL-17 aus der Zelle nach Kontakt mit einem Bakterium. Dahingegen konnte eine leicht erhöhte IFN-γ Konzentration ermittelt werden, außer nach Stimulation mit HKSA. Nach gleichzeitiger Aktivierung des TZR mit α-CD3 konnte für alle getesteten Bakterien ein leichter Anstieg der IL-17<sup>+</sup>- Zellen detektiert werden, jedoch war der prozentuale Anteil von IL-17 geringer als der Anteil der unstimulierten Mediumkontrolle. Vergleicht man die Zahl der IFN-γ<sup>+</sup>- Zellen nach Stimulation mit Bakterien mit der Positivkontrolle PMA/Iono (10,8 %), so wird deutlich, dass Bakterien (HKPG: 3,07 %) auch nach α-CD3-Aktivierung (α-CD3: 2,22 %) nur einen minimalen kostimulatorischen Effekt auf IFN-γ produzierende CD4<sup>+</sup>- T-Zellen ausüben.



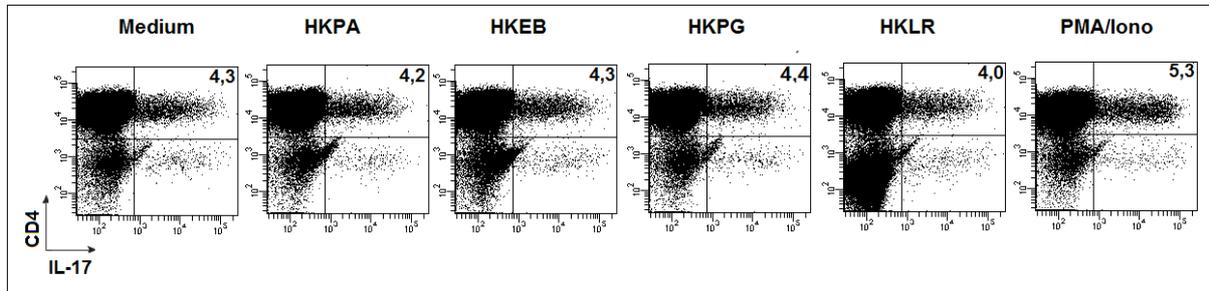
**Abbildung 3.38: Intrazelluläre IFN- $\gamma$  und IL-17 Färbung von isolierten CD4<sup>+</sup>- T-Zellen nach Stimulation mit hitze-getöteten Bakterien.** CD4<sup>+</sup>- T-Zellen, isoliert aus Milzzellen von weiblichen C57.BL/6 Mäusen (6-8 Wochen) wurden mit 10<sup>8</sup>/ml HKPA, HKEB, HKPG, HKLP, HKSA und PMA/Iono (50 ng/ml, 1  $\mu$ g/ml) für 5 h stimuliert ( $\pm$   $\alpha$ -CD3-Aktivierung, 1  $\mu$ g/ml). 4 h vor Ende der Restimulationszeit wurde Brefeldin A zu den Zellen gegeben. Nach Färbung mit *Fixable Viability Dye*® 660 wurden die Oberflächen mit CD4, sowie die Zytokine IFN- $\gamma$  und IL-17 gefärbt und durchflusszytometrisch bestimmt. Dargestellt sind die IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>- und IL-17<sup>+</sup>- Zellen in Prozent als *frequency of parent* bezogen auf alle CD4<sup>+</sup>- T-Zellen nach dem Ausschluss toter Zellen. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment (n=4).



**Abbildung 3.39: Intrazelluläre IL-17 Färbung von isolierten CD4<sup>+</sup>- T-Zellen nach Stimulation mit hitze-getöteten Bakterien in Kombination mit APZ.** CD4<sup>+</sup>- T-Zellen, isoliert aus Milzzellen von weiblichen C57.BL/6 Mäusen (6-8 Wochen) wurden mit 10<sup>8</sup>/ml HKPA, HKEB, HKPG, HKLP, HKSA und PMA/Iono (50 ng/ml, 1  $\mu$ g/ml) für 16 h stimuliert ( $\pm$  50 000 APZ). 4 h vor Ende der Restimulationszeit wurde Brefeldin A zu den Zellen gegeben. Nach Färbung mit *Fixable Viability Dye*® 660 wurden die Oberflächen mit CD4, sowie das Zytokin IL-17 gefärbt und durchflusszytometrisch bestimmt. Dargestellt sind die IL-17<sup>+</sup>- Zellen in Prozent als *frequency of parent* bezogen auf alle CD4<sup>+</sup>- T-Zellen nach dem Ausschluss toter Zellen. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment (n=3).

Zusätzliche Kultivierung mit 50 000 APZ für 24 h führte lediglich zu einer erhöhten Anzahl an IL-17<sup>+</sup>- Zellen im Vergleich zu CD4<sup>+</sup>- T-Zellen ohne APZ (Abb. 3.39).

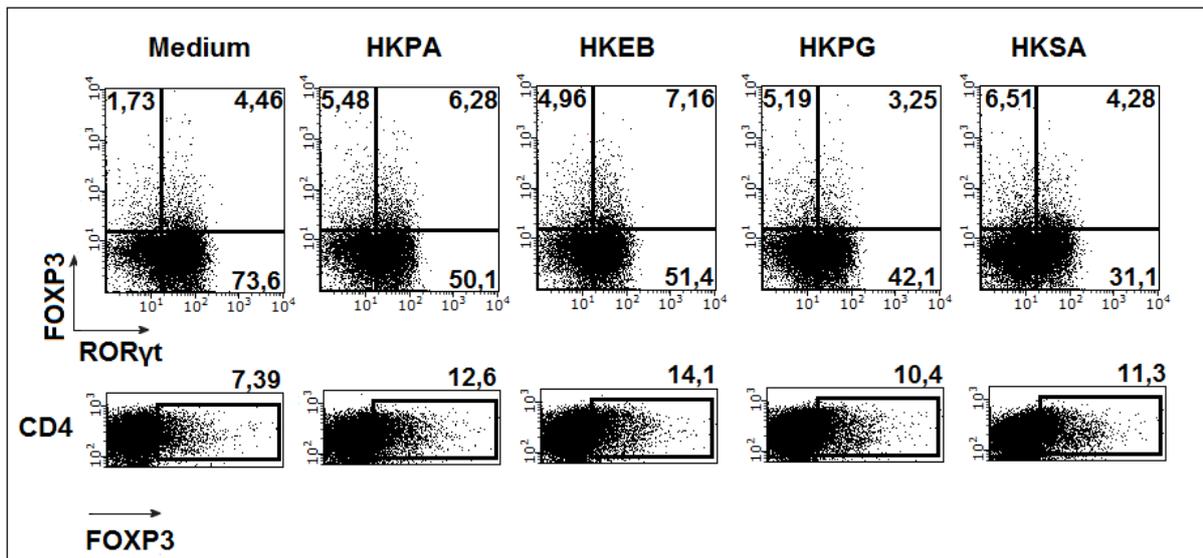
Auch nach Stimulation von Th17-polarisierten CD4<sup>+</sup>- T-Zellen mit verschiedenen Bakterien konnte nur eine geringe Beeinflussung der intrazellulären IL-17 Konzentration ermittelt werden (Abb. 3.40). Die Stimulation mit hitze-getöteten Bakterien führt somit nicht zu einer Erhöhung der Zahl der IL-17-produzierenden CD4<sup>+</sup>- T-Zellen, sondern fördert eher die Freisetzung des Zytokins.



**Abbildung 3.40: Intrazelluläre IL-17 Färbung von Th17-polarisierten CD4<sup>+</sup>- T-Zellen nach Stimulation mit hitze-getöteten Bakterien.** CD4<sup>+</sup>- T-Zellen, isoliert aus Milzzellen von weiblichen C57.BL/6 Mäusen (6-8 Wochen) wurden unter Th17-Bedingungen kultiviert und nach 5 Tagen mit 10<sup>8</sup>/ml HKPA, HKEB, HKPG, HKLR und PMA/Iono (50 ng/ml, 1 µg/ml) für 5 h stimuliert (± α-CD3-Aktivierung, 1 µg/ml). 4 h vor Ende der Restimulationszeit wurde Brefeldin A zu den Zellen gegeben. Nach Färbung mit *Fixable Viability Dye*® 660 wurden die Oberflächen mit CD4, sowie das Zytokin IL-17 gefärbt und durchflusszytometrisch bestimmt. Dargestellt sind die IL-17<sup>+</sup>- Zellen in Prozent als *frequency of parent* bezogen auf CD4<sup>+</sup>- T-Zellen nach dem Ausschluss toter Zellen. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment (n=4).

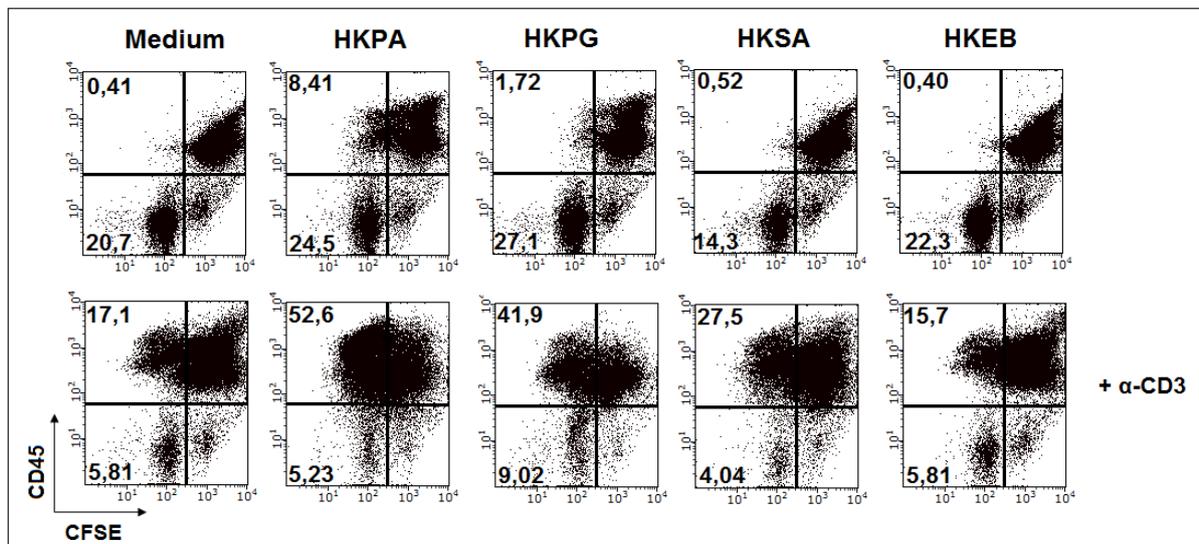
### 3.2.6 Beeinflussung von FOXP3 und RORγt durch Kultivierung mit verschiedenen Bakterien während der Th17-Polarisierung von CD4<sup>+</sup>- T-Zellen

Es konnte eine deutlich erhöhte Anzahl FOXP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>- T-Zellen nach Kultivierung mit Bakterien ermittelt werden. Dabei konnte vor allem bei RORγt<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>- T-Zellen ein Anstieg von FOXP3 nach Kultivierung mit Bakterien beobachtet werden (Abb. 3.41). Zudem konnte eine deutliche Beeinflussung der RORγt<sup>+</sup>- Zellen festgestellt werden. Lag der Anteil von RORγt<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>- T-Zellen nach 72 h Th17-Polarisierung noch bei 73,6 %, so konnten nach gleichzeitiger Kultivierung lediglich 50,1 % RORγt<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>- T-Zellen für HKPA, 51,4 % für HKEB, 42,1 % für HKPG und 31,1 % für HKSA detektiert werden.



**Abbildung 3.41: Intrazelluläre FOXP3 und RORγt Färbung von Th17-polarisierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen nach Stimulation mit hitze-getöteten Bakterien.** CD4<sup>+</sup> T-Zellen, isoliert aus Milzzellen von weiblichen C57.BL/6 Mäusen (6-8 Wochen) wurden unter Th17-Bedingungen zusammen mit 10<sup>8</sup>/ml HKPA, HKEB, HKPG und HKLR für 72 h kultiviert. Nach Färbung mit *Fixable Viability Dye*® 660 wurden die Oberflächen mit CD4, sowie die Transkriptionsfaktoren FOXP3 und RORγt gefärbt und durchflusszytometrisch bestimmt. Dargestellt sind die FOXP3<sup>+</sup>, RORγt<sup>+</sup> und FOXP3<sup>+</sup>RORγt<sup>+</sup> Zellen in Prozent als *frequency of parent* bezogen auf alle CD4<sup>+</sup> T-Zellen nach dem Ausschluss toter Zellen (obere Reihe) und die Gesamtzahl FOXP3<sup>+</sup> Zellen (untere Reihe). Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment (n=3).

### 3.2.7 Einfluss von Bakterien auf die Zellproliferation von Milzzellen

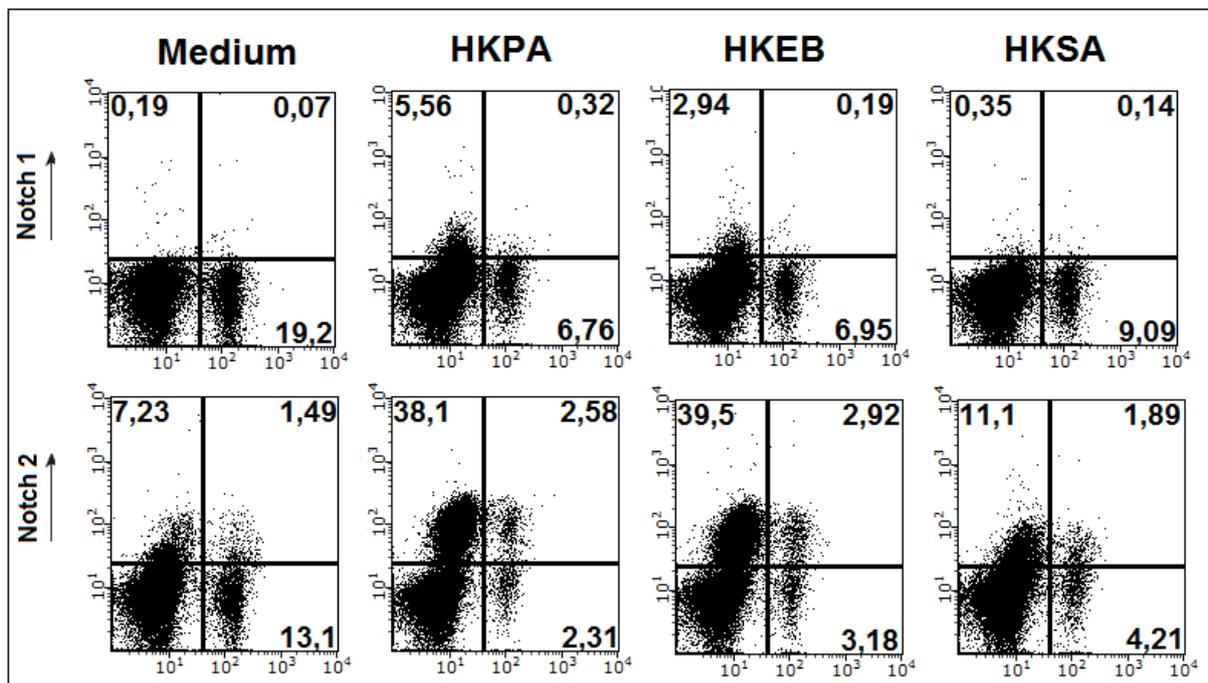


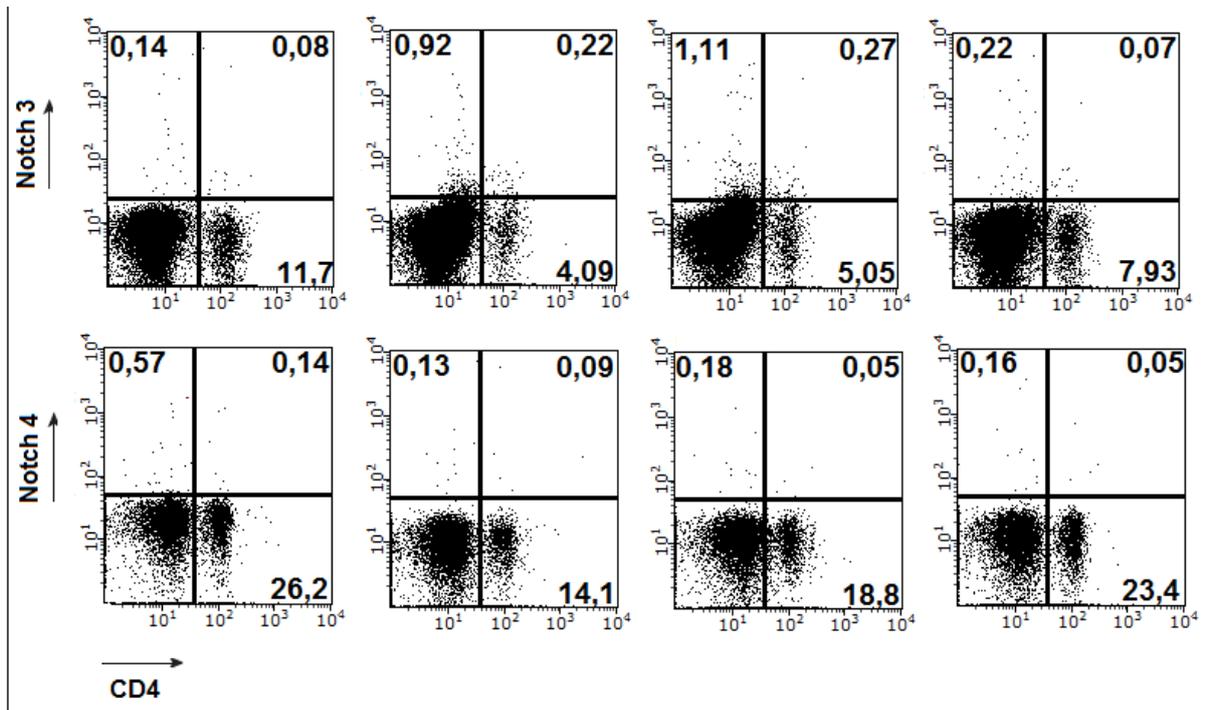
**Abbildung 3.42: Messung der Proliferation von Milzzellen nach Stimulation mit hitze-getöteten Bakterien.** Milzzellen von weiblichen C57.BL/6 Mäusen wurden mit CFSE gefärbt und für 72 h mit 10<sup>8</sup>/ml HKPA, HKPG, HKSA und HKEB stimuliert. Nach Färbung der Oberflächen mit CD45 wurden die Proben durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt ist die Proliferationsrate von CD45<sup>+</sup> und CD45<sup>-</sup> Milzzellen in Prozent als *frequency of parent* bezogen auf alle Zellen. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment (n=3).

Lediglich nach Stimulation mit HKPA (8,41 %) konnte ein deutlicher proliferationsfördernder Effekt von CD45<sup>+</sup>- Milzzellen im Vergleich zur Mediumkontrolle (0,41 %) ermittelt werden (Abb. 3.42). Für die Subpopulation der CD45<sup>-</sup>- Milzzellen konnte hingegen eine erhöhte Proliferation nach Stimulation mit HKPA (24,5 %), HKPG (27,1 %) und HKEB (22,3 %), bzw. eine gesenkte Proliferationsrate nach Stimulation mit HKSA (14,3 %) im Vergleich zur Mediumkontrolle (20,7 %) ermittelt werden. Dahingegen konnte nach gleichzeitiger Aktivierung mit  $\alpha$ -CD3 ein deutlicher Einfluss auf die Proliferation beobachtet werden. So führte Stimulation mit HKPA (52,6 %), HKPG (41,9 %) und HKSA (27,5 %) zu einer deutlich erhöhten Proliferationsrate im Vergleich zur Mediumkontrolle (17,1 %).

### 3.2.8 Beeinflussung der Notch-Rezeptoren durch Stimulation mit Bakterien

Im Gegensatz zu Thymuszellen, konnte in CD4<sup>-</sup>- Milzzellen eine erhöhte Anzahl Notch 1<sup>+</sup>- Zellen nach Stimulation mit HKPA (5,56 %) und HKEB (2,94 %) im Vergleich zur Mediumkontrolle (0,19 %) beobachtet werden (Abb. 3.43). Zudem konnte eine deutliche Erhöhung der Notch2<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup> Zellen nach Stimulation mit HKPA (38,1 %) und HKEB (39,1 %) im Vergleich zur Kontrolle (7,23 %) ermittelt werden. Auch bei CD4<sup>+</sup>- T-Zellen konnte eine leicht erhöhte Anzahl Notch2<sup>+</sup>- Zellen nachgewiesen werden, jedoch führte die Stimulation mit den Bakterien zu einer Minimierung der CD4<sup>+</sup>- T-Zellen, so dass z.B. im Fall von HKPA über die Hälfte der CD4<sup>+</sup>-T-Zellen auch Notch2<sup>+</sup> sind. Während nach Einfluss von HKPA und HKEB noch eine leichte Erhöhung der Notch3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>- Zellen beobachtet werden konnte, beeinflusste kein Bakterium die Zahl Notch4<sup>+</sup>- Zellen.



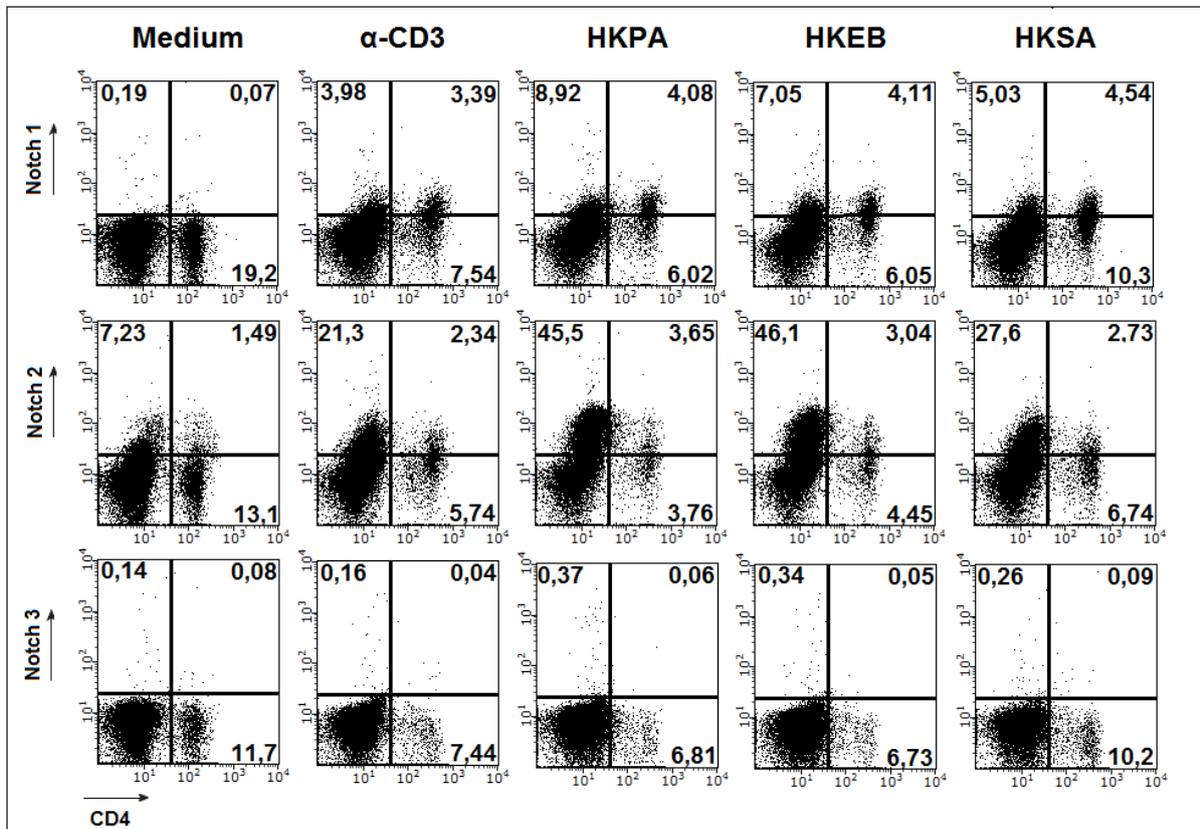


**Abbildung 3.43: Analyse der Notch Oberflächenrezeptoren 1-4 nach dem Einfluss von Bakterien.** Milzzellen von weiblichen C57.BL/6 Mäusen wurden für 48 h mit  $10^8$ /ml HKPA, HKEB und HKSA stimuliert. Nach Färbung der Oberflächen mit CD4, CD8 und Notch 1-4 wurden die Proben durchfluss-zytometrisch analysiert. Dargestellt sind die CD4<sup>+</sup>- T-Zellen, die Notch<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>- und Notch<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>- Zellen in Prozent als *frequency of parent* bezogen auf alle Zellen. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment (n=3).

Nach zusätzlicher Aktivierung mit  $\alpha$ -CD3 konnte nochmals eine leichte Erhöhung der Notch1<sup>+</sup>- und Notch2<sup>+</sup>- Zellen beobachtet werden, allerdings konnte kein kostimulatorischer Effekt durch Einfluss von Bakterien festgestellt werden (Abb. 3.44).

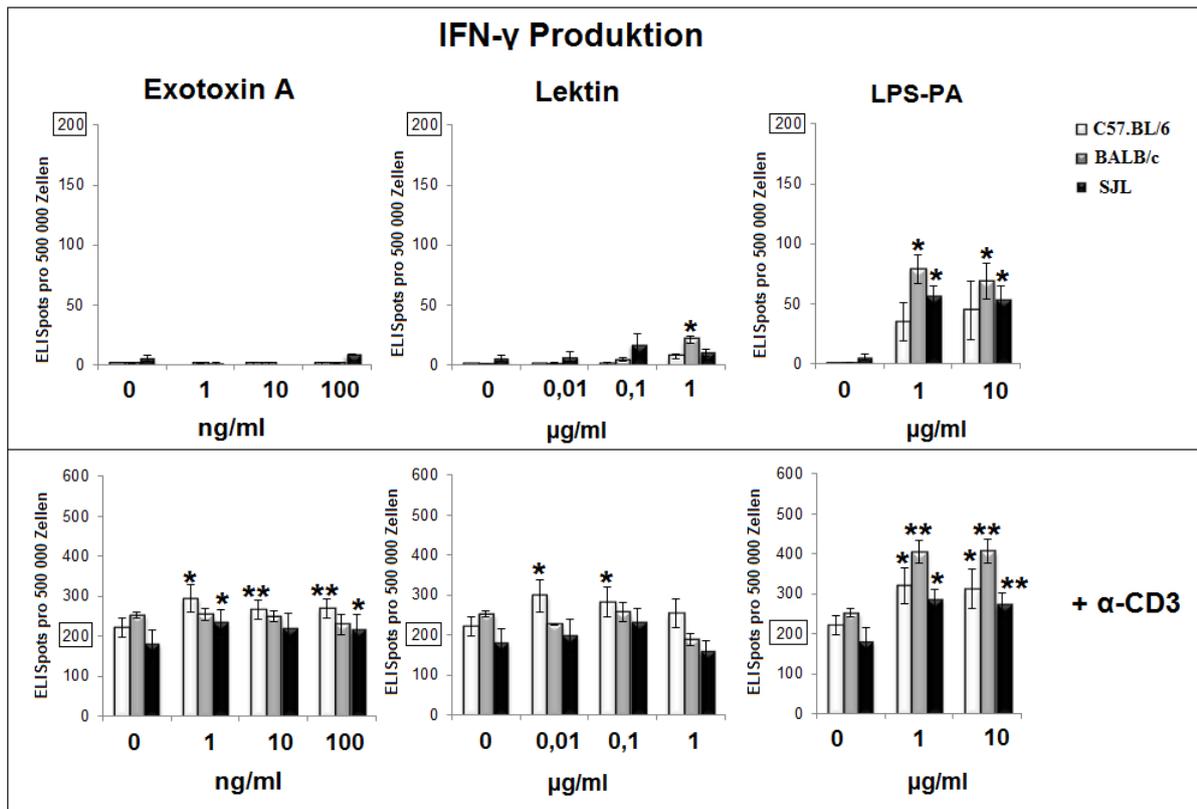
### 3.2.9 Einfluss von Zellwandbestandteilen auf die IFN- $\gamma$ Produktion von Milzzellen

Wie in Abb. 3.45 dargestellt, konnte nach Stimulation mit 1 – 10  $\mu$ g/ml LPS ein deutlicher Anstieg der IFN- $\gamma$  Sekretion detektiert werden, statistisch signifikant jedoch nur in BALB/c und SJL Mäusen. Stimulation mit 1  $\mu$ g/ml Lektin hatte eine statistisch signifikant erhöhte IFN- $\gamma$  Sekretion in BALB/c Mäusen zur Folge. Nach gleichzeitiger Koaktivierung mit  $\alpha$ -CD3 konnte eine statistisch signifikant erhöhte IFN- $\gamma$  Sekretion in C57.BL/6 und BALB/c Mäusen nach Stimulation mit 1 ng/ml Exo A beobachtet werden, statistisch hoch signifikant ab 10 ng/ml Exo A in C57.BL/6 Mäusen. Stimulation mit Lektin hatte lediglich bei einer Konzentration von 0,01 und 0,1  $\mu$ g/ml eine statistisch signifikant erhöhte IFN- $\gamma$  Sekretion in C57.BL/6 Mäusen zur Folge. Dahingegen konnte nach Stimulation mit LPS (1 und 10  $\mu$ g/ml) eine statistisch signifikant erhöhte IFN- $\gamma$  Ausschüttung in allen getesteten Mausstämmen ermittelt werden.

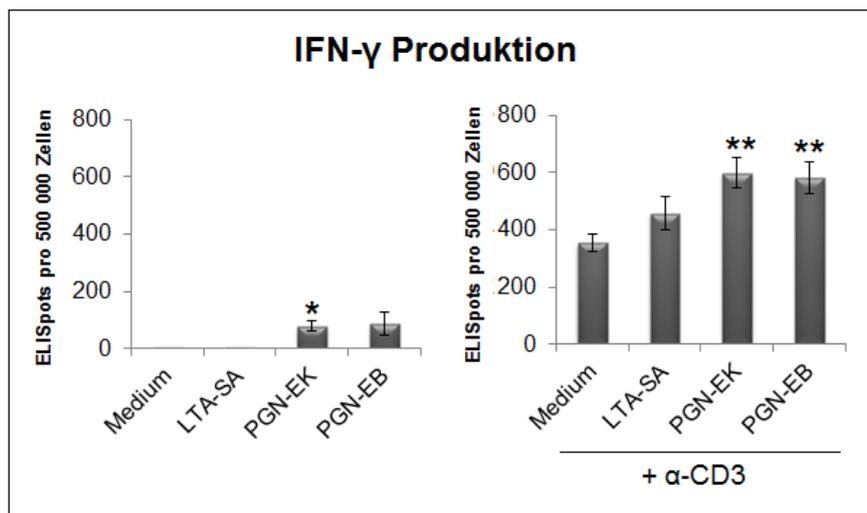


**Abbildung 3.44: Analyse der Notch Oberflächenrezeptoren 1-3 nach dem Einfluss von Bakterien und gleichzeitiger  $\alpha$ -CD3 Aktivierung.** Milzzellen von weiblichen C57.BL/6 Mäusen wurden für 48 h mit  $10^8$ /ml HKPA, HKEB und HKSA in Kombination mit  $\alpha$ -CD3 (1  $\mu$ g/ml) stimuliert. Nach Färbung der Oberflächen mit CD4, CD8 und Notch 1-3 wurden die Proben durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt sind die CD4<sup>+</sup>- T-Zellen, die Notch<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>- und Notch<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>- Zellen in Prozent als *frequency of parent* bezogen auf alle Zellen. Gezeigt ist e in repräsentatives Experiment (n=3).

Lediglich nach einer Koaktivierung mit  $\alpha$ -CD3 konnte nach Stimulation mit LTA-SA ein leichter Anstieg der IFN- $\gamma$  Sekretion beobachtet werden, jedoch statistisch nicht signifikant (Abb. 3.46). Dahingegen konnte für beide getestete PGN eine erhöhte IFN- $\gamma$  Ausschüttung detektiert werden, statistisch signifikant nach Stimulation mit PGN-EK. Eine gleichzeitige Stimulation mit  $\alpha$ -CD3 hatte eine statistisch hoch signifikante Erhöhung der IFN- $\gamma$  Sekretion nach Stimulation mit beiden getesteten PGN zur Folge.



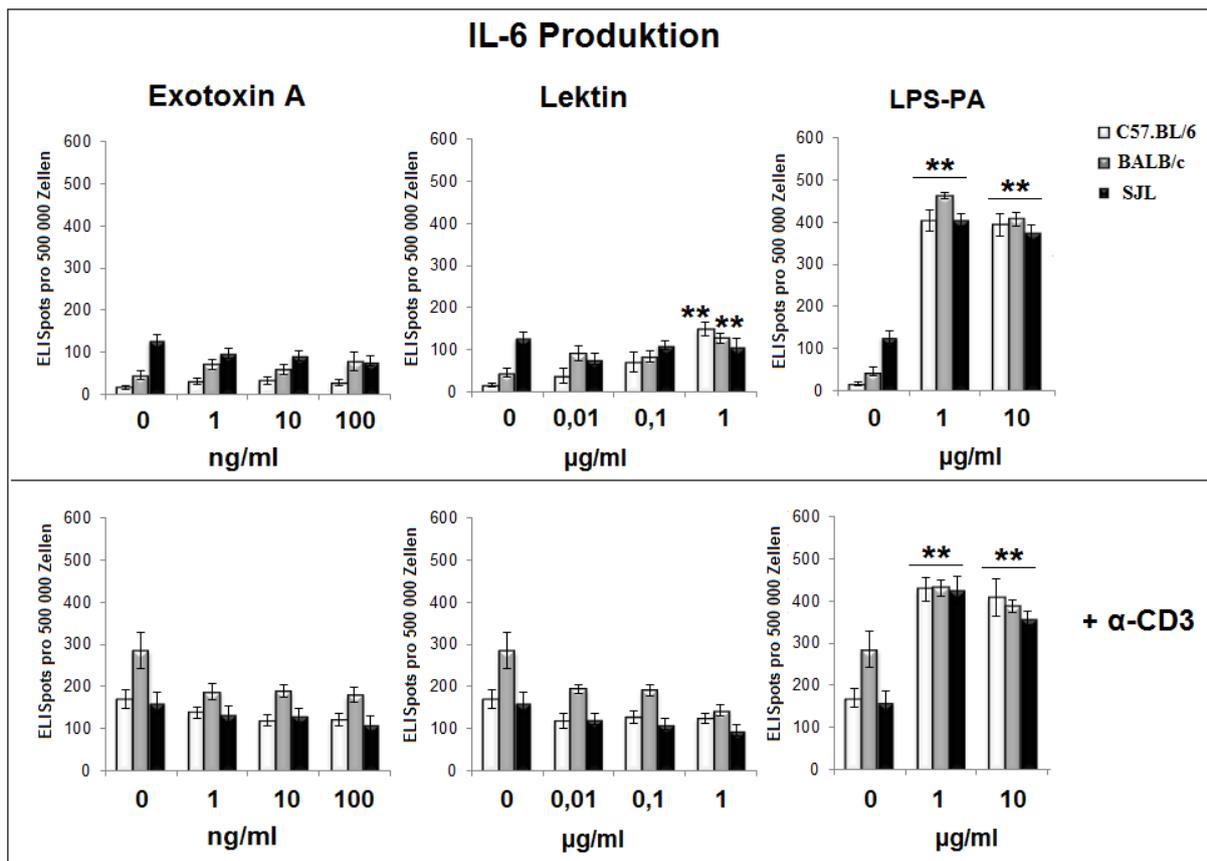
**Abbildung 3.45: Einfluss Exo A, Lektin und LPS-PA auf die IFN- $\gamma$  Produktion.** Milzzellen von weiblichen C57.BL/6, BALB/c und SJL Mäusen (6-8 Wochen) wurden zu  $5 \cdot 10^5$ -Zellen pro well ausgesät und mit Exo A (0 – 100 ng/ml), Lektin (0 – 1  $\mu$ g/ml) und LPS-PA (0 – 10  $\mu$ g/ml) in Kombination mit  $\alpha$ -CD3 (1  $\mu$ g/ml) stimuliert. Nach 24 h Inkubationszeit wurde die IFN- $\gamma$  Sekretion mittels ELISpot Assay ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM aus zwei unabhängigen Experimenten mit n=4-8 Mäusen (ohne  $\alpha$ -CD3 n=4; mit  $\alpha$ -CD3 n=8). Signifikante Unterschiede sind mit Sternen gekennzeichnet (\* p < 0,05; \*\* p < 0,01).



**Abbildung 3.46: Einfluss von LTA-SA, PGN-EK und PGN-EB auf die IFN- $\gamma$  Produktion.** Milzzellen von weiblichen C57.BL/6 Mäusen (6-8 Wochen) wurden zu  $5 \cdot 10^5$ -Zellen pro well ausgesät und mit LTA-SA (1  $\mu$ g/ml), PGN-EK (5  $\mu$ g/ml) und PGN-EB (5  $\mu$ g/ml) in Kombination mit  $\alpha$ -CD3 (1  $\mu$ g/ml) stimuliert. Nach 24 h Inkubationszeit wurde die IFN- $\gamma$  Sekretion mittels ELISpot Assay ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM aus zwei unabhängigen Experimenten mit n=4 Mäusen (ohne  $\alpha$ -CD3 n=4; mit  $\alpha$ -CD3 n=8). Signifikante Unterschiede sind mit Sternen gekennzeichnet (\* p < 0,05; \*\* p < 0,01).

### 3.2.10 Einfluss von bakteriellen Bestandteilen auf die IL-6 Produktion von Milzzellen

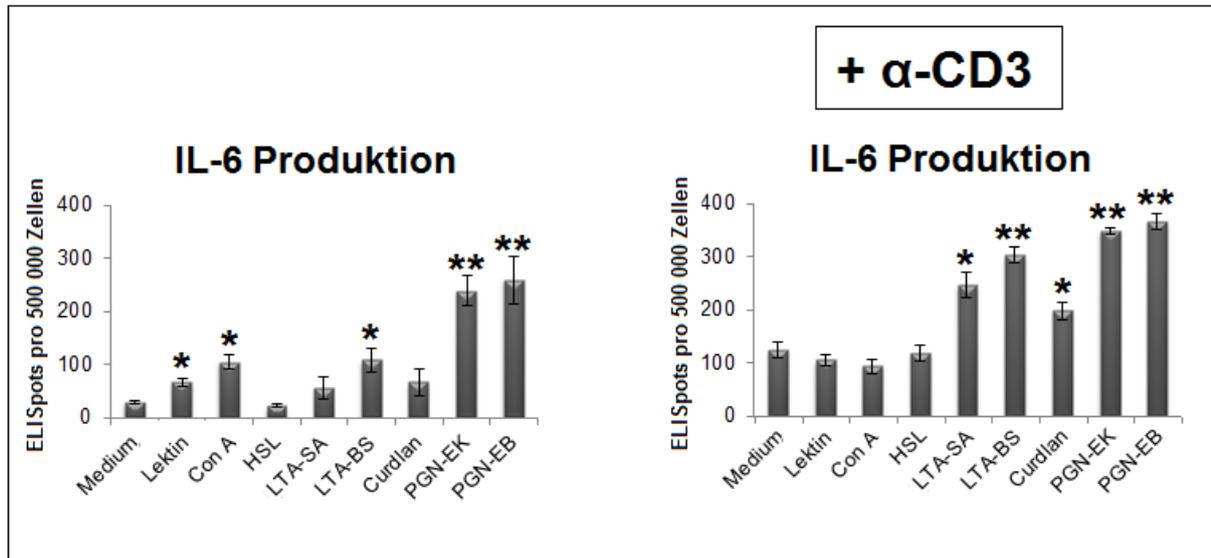
Während Stimulation mit Exo A keinen Einfluss auf die IL-6 Sekretion von Milzzellen hat, konnte nach Stimulation mit Lektin ein Anstieg der IL-6 Sekretion beobachtet werden, statistisch hoch signifikant jedoch nur nach Stimulation mit 1  $\mu\text{g/ml}$  in BALB/c und SJL Mäusen (Abb. 3.47). Stimulation mit 1 und 10  $\mu\text{g/ml}$  LPS führte hingegen in alle getesteten Mausstämmen zu einem deutlichen, statistisch hoch signifikanten Anstieg der IL-6 Sekretion. Nach gleichzeitiger Koaktivierung mit  $\alpha\text{-CD3}$  konnte zwar eine erhöhte IL-6 Ausschüttung in allen getesteten Mausstämmen beobachtet werden, jedoch hatte keines der getesteten Zellwandbestandteile einen kostimulatorischen Effekt.



**Abbildung 3.47: Einfluss Exo A, Lektin und LPS-PA auf die IL-6 Produktion.** Milzzellen von weiblichen C57.BL/6, BALB/c und SJL Mäusen (6-8 Wochen) wurden zu  $5 \cdot 10^5$ -Zellen pro well ausgesät und mit Exo A (0 – 100 ng/ml), Lektin (0 – 1  $\mu\text{g/ml}$ ) und LPS-PA (0 – 10  $\mu\text{g/ml}$ ) in Kombination mit  $\alpha\text{-CD3}$  (1  $\mu\text{g/ml}$ ) stimuliert. Nach 24 h Inkubationszeit wurde die IL-6 Sekretion mittels ELISpot Assay ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM aus zwei unabhängigen Experimenten mit n=4-8 Mäusen. Signifikante Unterschiede sind mit Sternen gekennzeichnet (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ).

In Abb. 3.48 ist der Einfluss weiterer Antigene auf die IL-6 Sekretion von Milzzellen dargestellt. Im direkten Vergleich zu Lektin, hatte die Stimulation mit Con A eine stärkere, statistisch signifikant erhöhte IL-6 Ausschüttung zur Folge. Zudem konnte eine deutlich erhöhte IL-6 Sekretion nach Stimulation mit LTA und PGN beobachtet werden, statistisch

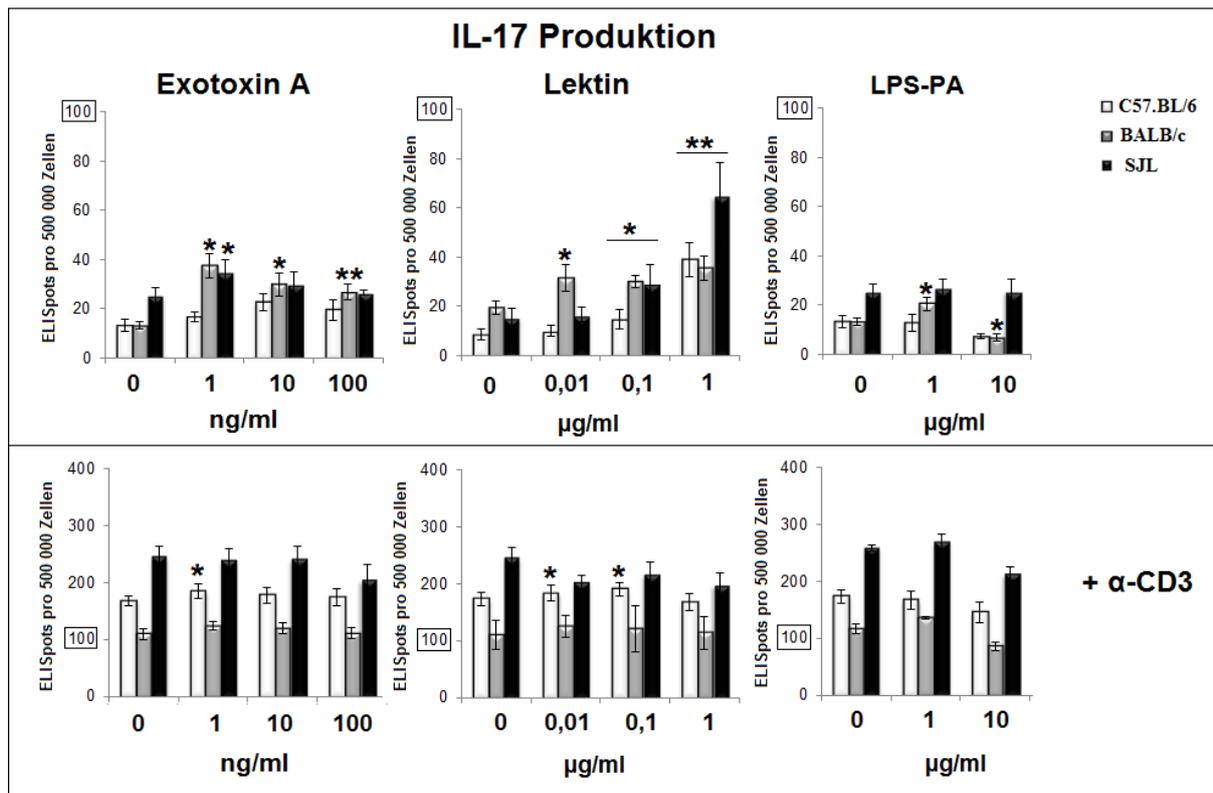
signifikant nach Stimulation mit LTA-BS und statistisch hoch signifikant nach Stimulation mit PGN-EK und PGN-EB. Nach gleichzeitiger Aktivierung mit  $\alpha$ -CD3 resultierte die Stimulation mit LTA-SA und Curdlan AL in statistisch signifikant erhöhter IL-6 Sekretion und die Stimulation mit LTA-BS, PGN-EK und PGN-EB in statistisch hoch signifikant gesteigerter IL-6 Ausschüttung.



**Abbildung 3.48: Einfluss von Zellwandbestandteilen auf die IL-6 Produktion.** Milzzellen von weiblichen C57.BL/6 (6-8 Wochen) wurden zu  $5 \cdot 10^5$ -Zellen pro well ausgesät und mit LPS-PA ( $1 \mu\text{g/ml}$ ), Lektin ( $1 \mu\text{g/ml}$ ), Con A ( $1 \mu\text{g/ml}$ ), HSL ( $1 \mu\text{g/ml}$ ), Exo A ( $1 \mu\text{g/ml}$ ), LTA-SA ( $1 \mu\text{g/ml}$ ), LTA-BS ( $1 \mu\text{g/ml}$ ), Curdlan AL ( $100 \mu\text{g/ml}$ ), PGN-EK ( $5 \mu\text{g/ml}$ ) und PGN-EB ( $5 \mu\text{g/ml}$ ) in Kombination mit  $\alpha$ -CD3 ( $1 \mu\text{g/ml}$ ) stimuliert. Nach 24 h Inkubationszeit wurde die IL-6 Sekretion mittels ELISpot Assay ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM aus zwei unabhängigen Experimenten mit  $n=4$  Mäusen. Signifikante Unterschiede sind mit Sternchen (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ).

### 3.2.11 Einfluss von bakteriellen Bestandteilen auf die IL-17 Produktion von Milzzellen

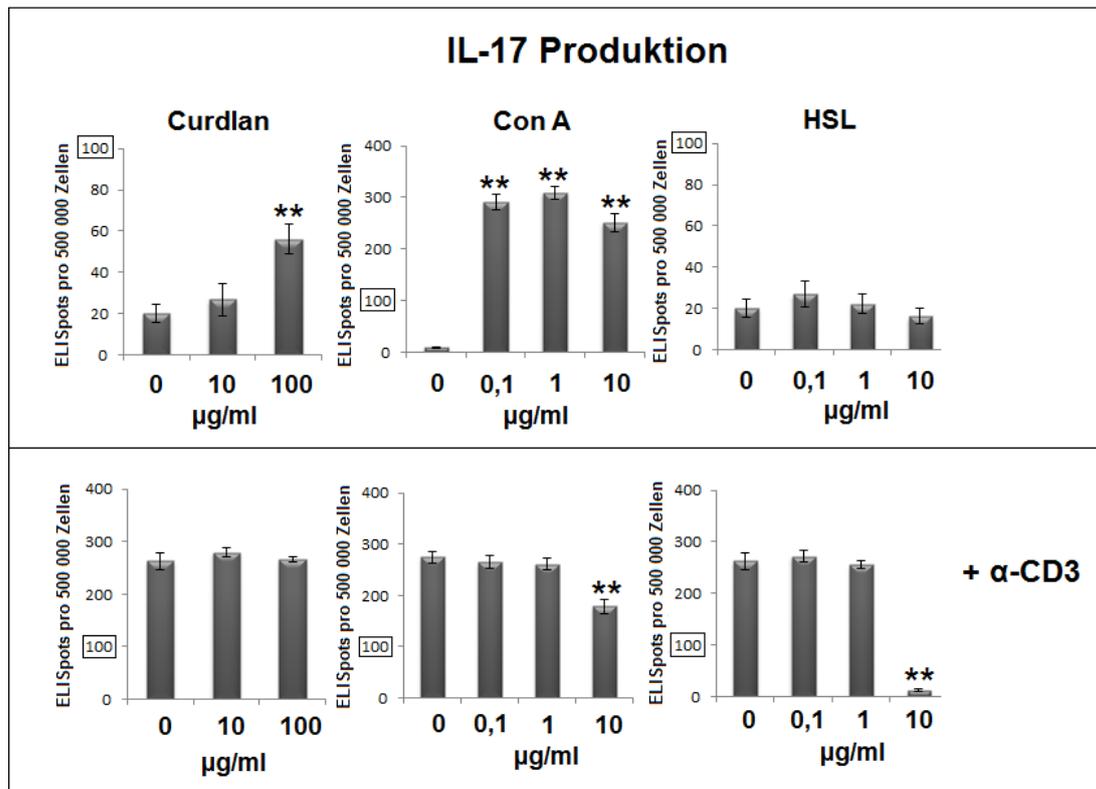
Bereits nach Stimulation mit  $1 \text{ ng/ml}$  Exo A konnte ein statistisch signifikanter Anstieg der IL-17 Sekretion in BALB/c und SJL Mäusen detektiert werden (Abb. 3.49). Höhere Konzentrationen Exo A führten hingegen zu einer leicht verminderten IL-17 Ausschüttung. Stimulation mit Lektin hatte einen konzentrationsabhängigen Anstieg der IL-17 Sekretion zur Folge, statistisch hoch signifikant nach Stimulation mit  $1 \mu\text{g/ml}$  in allen getesteten Mausstämmen. Für LPS konnte lediglich nach Stimulation mit  $1 \mu\text{g/ml}$  in BALB/c Mäusen eine statistisch signifikant erhöhte IL-17 Sekretion ermittelt werden. Dahingegen konnte nach Koaktivierung mit  $\alpha$ -CD3 nur nach Stimulation mit  $1 \text{ ng/ml}$  Exo A und  $0,01 - 0,1 \mu\text{g/ml}$  Lektin ein leichter, statistisch signifikanter erhöhter Anstieg der IL-17 Ausschüttung in C57.BL/6 Mäusen beobachtet werden.



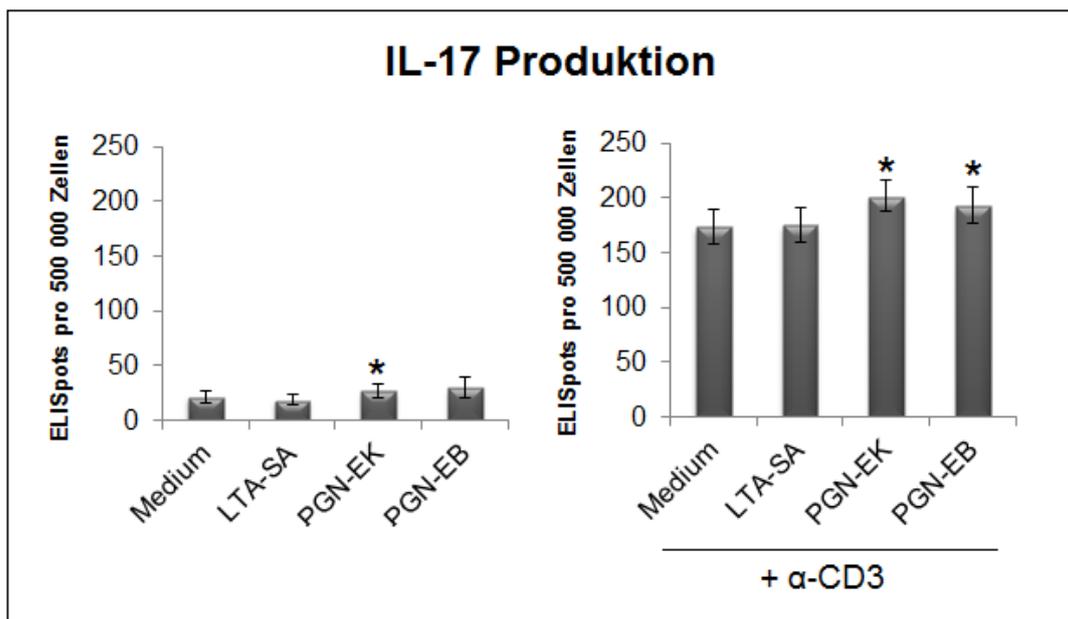
**Abbildung 3.49: Einfluss Exo A, Lektin und LPS-PA auf die IL-17 Produktion.** Milzzellen von weiblichen C57.BL/6, BALB/c und SJL Mäusen (6-8 Wochen) wurden zu  $5 \cdot 10^5$ -Zellen pro well ausgesät und mit Exo A (0 – 100 ng/ml), Lektin (0 – 1 µg/ml) und LPS-PA (0 – 10 µg/ml) in Kombination mit  $\alpha$ -CD3 (1 µg/ml) stimuliert. Nach 24 h Inkubationszeit wurde die IL-17 Sekretion mittels ELISpot Assay ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM aus zwei unabhängigen Experimenten mit n=4-8 Mäusen (ohne  $\alpha$ -CD3 n=4; mit  $\alpha$ -CD3 n=8). Signifikante Unterschiede sind mit Sternen gekennzeichnet (\* p < 0,05; \*\* p < 0,01).

Wie schon in Thymuszellen wurde auch in Milzzellen der Einfluss weiterer Antigene auf die IL-17 Sekretion untersucht. Stimulation mit Curdlan AL führte zu einem konzentrationsabhängigen Anstieg der IL-17 Sekretion, statistisch hoch signifikant nach Stimulation mit 100 µg/ml. (Abb. 3.50). Stimulation mit Con A hatte bei allen getesteten Konzentrationen eine statistisch hoch signifikante IL-17 Ausschüttung zur Folge. Eine gleichzeitige Aktivierung mit  $\alpha$ -CD3 resultierte zwar in einer deutlichen Erhöhung der IL-17 Sekretion, jedoch konnte für kein getestetes Antigen ein kostimulatorischer Effekt ermittelt werden. So führten Stimulation mit höheren Konzentration Con A (10 µg/ml) und HSL (10 µg/ml) zu statistisch hoch signifikant verminderter Ausschüttung von IL-17.

Wie in Abb. 3.51 dargestellt, hatte Stimulation mit LTA keinen Einfluss auf die IL-17 Sekretion von Milzzellen, auch nicht nach gleichzeitiger Kostimulation mit  $\alpha$ -CD3. Dagegen konnte nach Stimulation mit PGN-EK, ein leichter, statistisch signifikanter Anstieg der IL-17 Ausschüttung beobachtet werden. Nach Aktivierung mit  $\alpha$ -CD3 konnte bei beiden getesteten PGN eine statistisch signifikant erhöhte Sekretion von IL-17 detektiert werden.



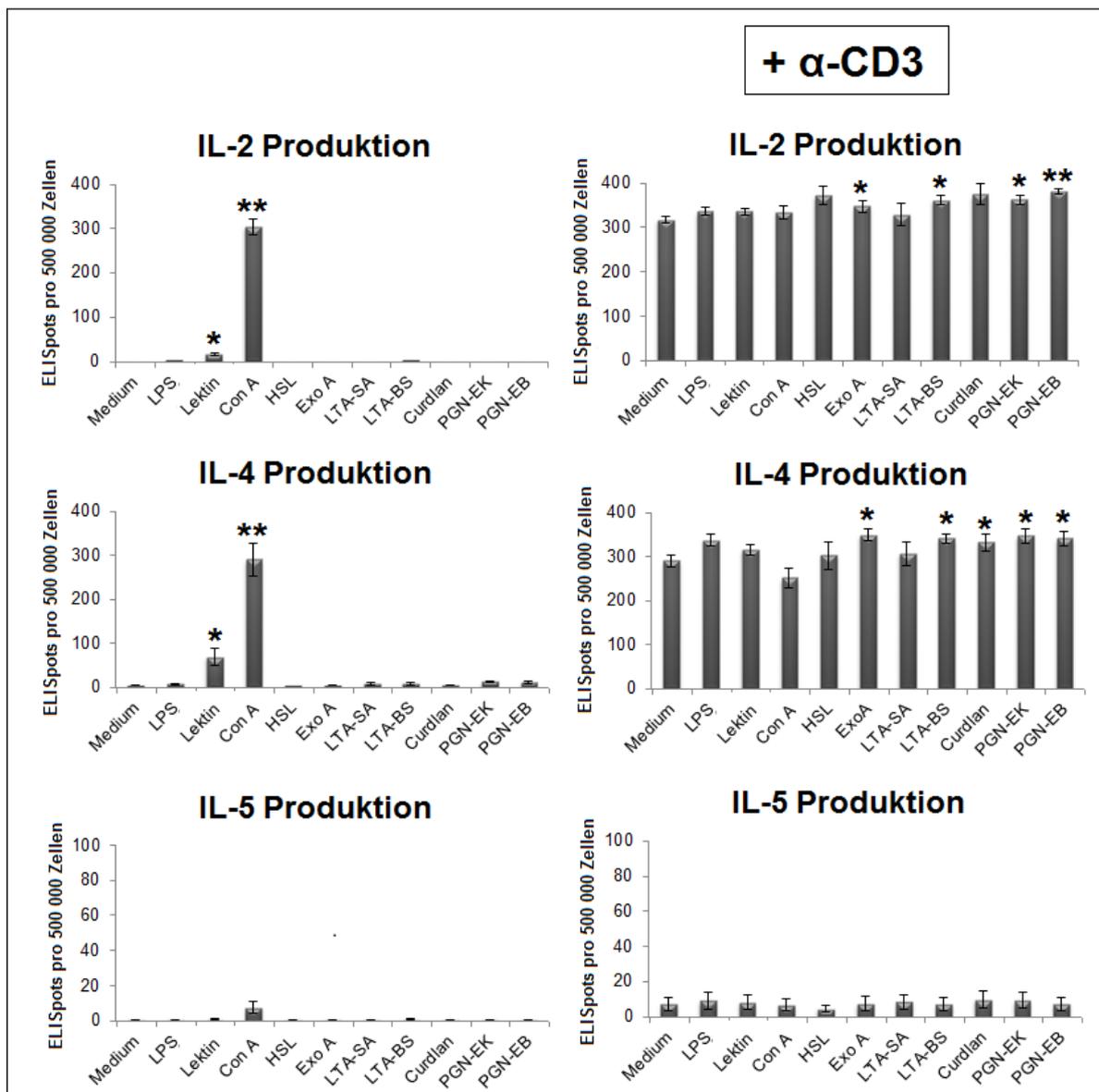
**Abbildung 3.50: Einfluss von Curdlan, Con A und Homo-Serinlacton auf die IL-17 Produktion.** Milzzellen von weiblichen C57.BL/6 wurden zu  $10^6$ -Zellen pro well ausgesät und mit Curdlan (0 – 100 µg/ml), Con A (0 – 10 µg/ml) und HSL (0 – 10 µg/ml) in Kombination mit α-CD3 (1 µg/ml) stimuliert. Nach 24 h wurde die IL-17 Sekretion mittels ELISpot Assay ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM aus zwei Experimenten mit n=8 Mäusen. Signifikante Unterschiede sind mit Sternen gekennzeichnet (\* p < 0,05; \*\* p < 0,01).



**Abbildung 3.51: Einfluss von LTA-SA, PGN-EK und PGN-EB auf die IL-17 Produktion.** Milzzellen von weiblichen C57.BL/6 wurden zu  $5 \cdot 10^5$ -Zellen pro well ausgesät und mit LTA-SA (1 µg/ml), PGN-EK (1 µg/ml) und PGN-EB (5 µg/ml) in Kombination mit α-CD3 (1 µg/ml) stimuliert. Nach 24 h wurde die IL-17 Sekretion mittels ELISpot Assay ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM aus zwei unabhängigen Experimenten mit n=4 Mäusen. Signifikante Unterschiede sind mit Sternen gekennzeichnet (\* p < 0,05; \*\* p < 0,01).

### 3.2.12 Einfluss von bakteriellen Bestandteilen auf die IL-2, IL-4 und IL-5 Produktion

Nach Stimulation mit Lektin und Con A konnte eine statistisch signifikant erhöhte IL-2 und IL-4 Sekretion beobachtet werden. Nach gleichzeitiger Aktivierung mit  $\alpha$ -CD3 konnte ein leichter kostimulatorischer Effekt für fast alle getesteten Zellwandbestandteile ermittelt werden. Statistisch signifikante erhöhte IL-2 und IL-4 Sekretionen konnten nach Stimulation mit Exo A, LTA-BS, PGN-EK und PGN-EB detektiert werden. Stimulation mit Curdlan resultierte zudem in einer erhöhten IL-4 Sekretion. Dahingegen konnte keine Beeinflussung der IL-5 Ausschüttung durch Zellwandbestandteile festgestellt werden.



**Abbildung 3.52: Einfluss auf die IL-2, IL-4, und IL-5 Produktion.** Milzzellen von weiblichen C57.BL/6 Mäusen wurden zu  $5 \cdot 10^5$ -Zellen pro well ausgesät und mit LPS-PA (1  $\mu$ g/ml), Lektin (1  $\mu$ g/ml), Con A (1  $\mu$ g/ml), HSL (1  $\mu$ g/ml), Exo A (1  $\mu$ g/ml), LTA-SA (1  $\mu$ g/ml), LTA-BS (1  $\mu$ g/ml), Curdlan (100  $\mu$ g/ml), PGN-EK (5  $\mu$ g/ml) und PGN-EB (5  $\mu$ g/ml) stimuliert in Kombination mit  $\alpha$ -CD3 (1  $\mu$ g/ml). Nach 20 h wurde die Zytokinproduktion mittels ELISpot ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM aus zwei Experimenten mit n=4 Mäusen. Signifikante Unterschiede sind mit Sternen gekennzeichnet (\* p < 0,05; \*\* p < 0,01).

### 3.2.13 Einfluss von PGN-EK, LTA-SA und LPS-PA auf die intrazelluläre IFN- $\gamma$ und IL-17 Konzentration

Lediglich nach Stimulation mit PGN-EK konnte ein leichter Anstieg der intrazellulären IFN- $\gamma$  Konzentration von CD4<sup>+</sup>- T-Zellen beobachtet werden (Abb. 3.53).

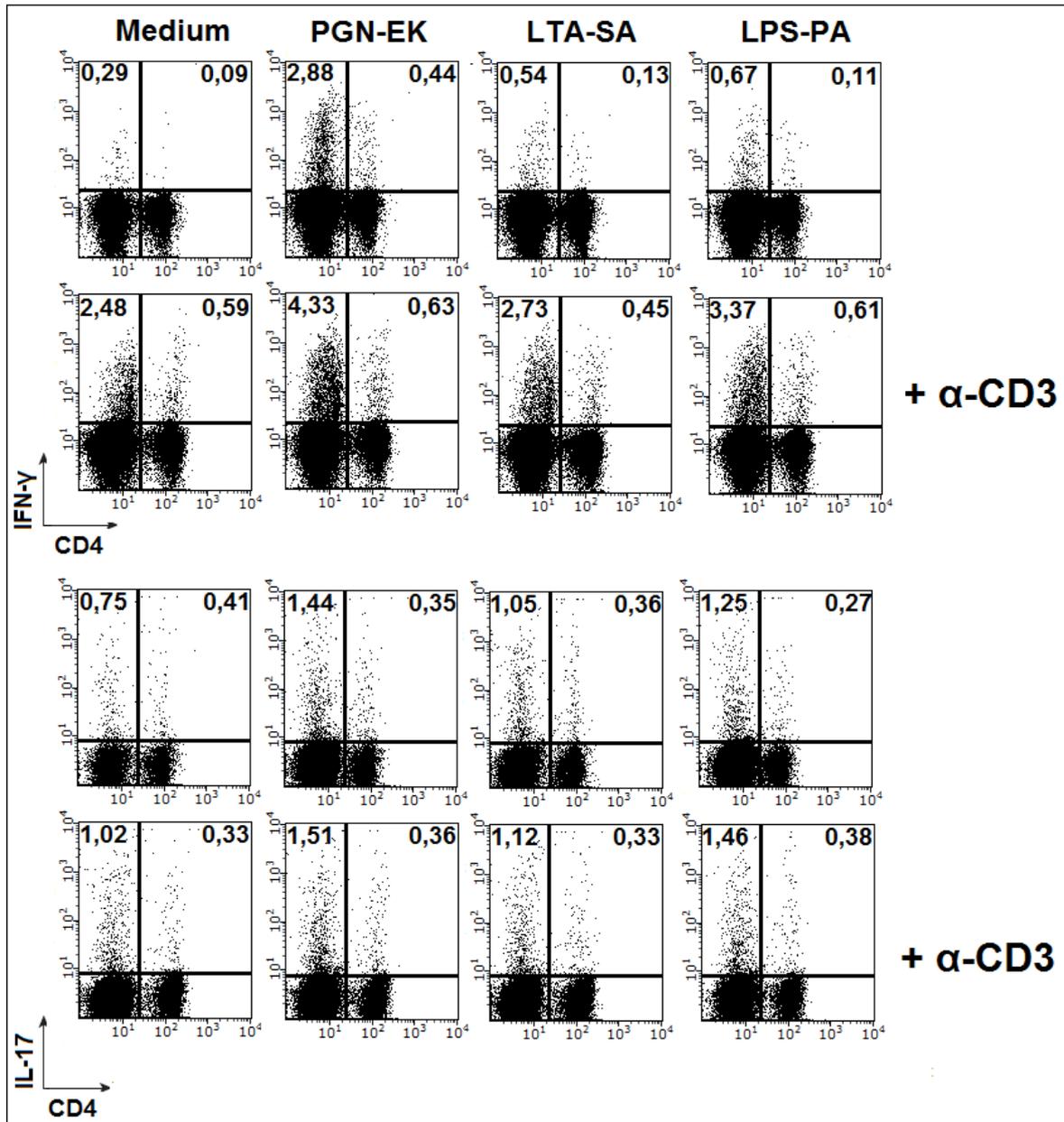


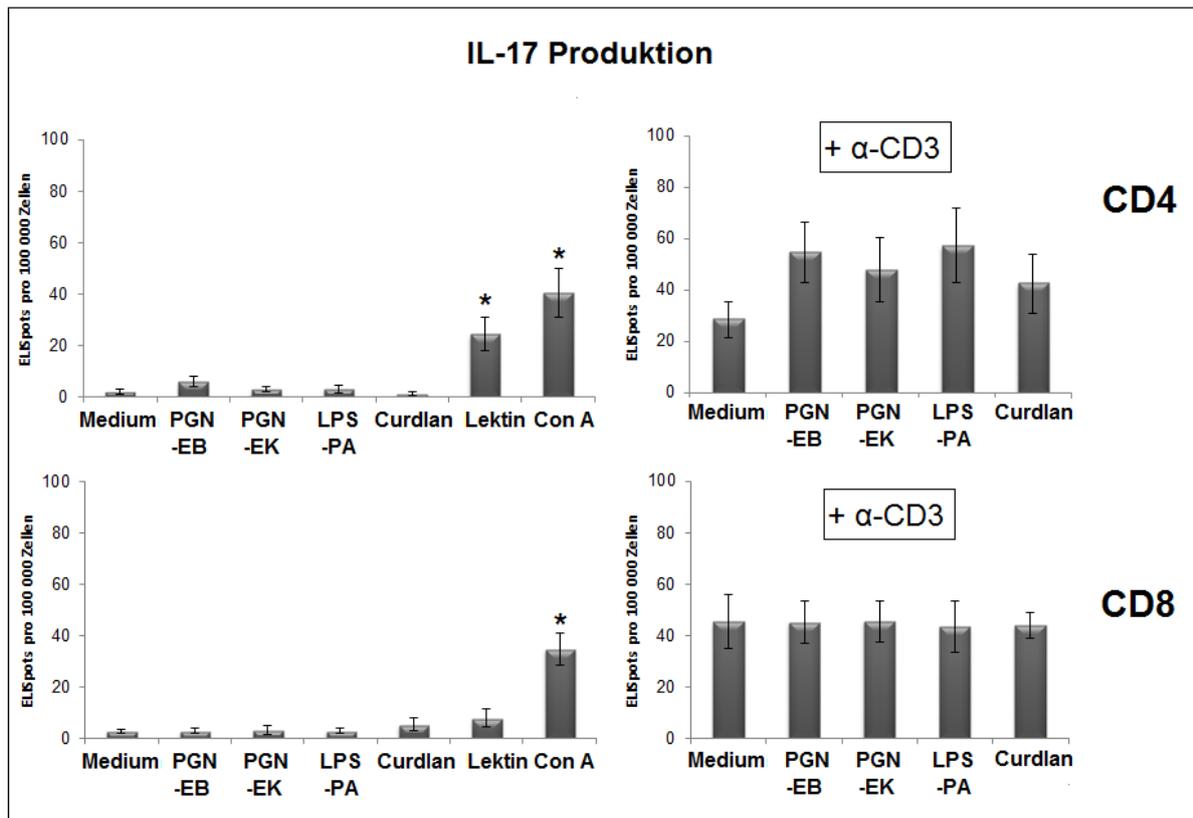
Abbildung 3.53: Intrazelluläre IFN- $\gamma$  und IL-17 Färbung nach Stimulation mit PGN, LTA und LPS. Milzzellen von weiblichen C57.BL/6 Mäusen wurden mit PGN-EK (5  $\mu$ g/ml), LTA-SA (1  $\mu$ g/ml) und LPS-PA (1  $\mu$ g/ml) für 20 h stimuliert ( $\pm$   $\alpha$ -CD3-Aktivierung, 1  $\mu$ g/ml). 4 h vor Ende der Restimulationszeit wurde Brefeldin A zu den Zellen gegeben. Nach Färbung mit *Fixable Viability Dye*® 660 wurden die Oberflächen mit CD4 und CD8, sowie IFN- $\gamma$  und IL-17 gefärbt und mittels FACS bestimmt. Dargestellt sind die IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> und IL-17<sup>+</sup> Zellen von CD4<sup>+</sup>- und CD4<sup>-</sup> Zellen in Prozent als *frequency of parent* bezogen auf alle Zellen nach dem Ausschluss toter Zellen. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment (n=4).

Dahingegen wiesen CD4<sup>-</sup> Milzzellen eine leicht erhöhte intrazelluläre IFN- $\gamma$  Konzentration nach Stimulation mit LTA-SA (0,54 %) und LPS-PA (0,67 %) und eine deutlich erhöhte IFN- $\gamma$  Konzentration nach Stimulation mit PGN-EK (2,88 %) im Vergleich zur Mediumkontrolle (0,29 %) auf. Eine zusätzliche Aktivierung mit  $\alpha$ -CD3 hatte zwar eine Erhöhung der IFN- $\gamma$  Konzentration von CD4<sup>+</sup>- T-Zellen zur Folge, jedoch konnte kein kostimulatorischer Effekt durch Einfluss der getesteten Zellwandbestandteile festgestellt werden. Hinsichtlich der CD4<sup>-</sup>-Zellpopulation konnte ebenso eine deutliche Erhöhung der IFN- $\gamma$  Konzentration nach Stimulation mit  $\alpha$ -CD3 (2,48 %) detektiert werden, jedoch keine erhöhte Konzentration an IFN- $\gamma$  durch den zusätzlichen Einfluss von den getesteten Zellwandbestandteilen.

Hinsichtlich der intrazellulären IL-17 Konzentration von CD4<sup>+</sup>- T-Zellen konnte keine Beeinflussung durch Stimulation mit Zellwandbestandteilen ermittelt werden, auch nicht nach gleichzeitiger Aktivierung mit  $\alpha$ -CD3. Dahingegen resultierte die Stimulation mit allen getesteten Zellwandbestandteilen in einer leichten Erhöhung der intrazellulären IL-17 Konzentration von CD4<sup>-</sup>- Milzzellen, die jedoch durch eine zusätzliche Stimulation mit  $\alpha$ -CD3 nicht beeinflusst wurde.

### **3.2.14 Einfluss von bakteriellen Bestandteilen auf die IL-17 Produktion von CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>- T-Zellen**

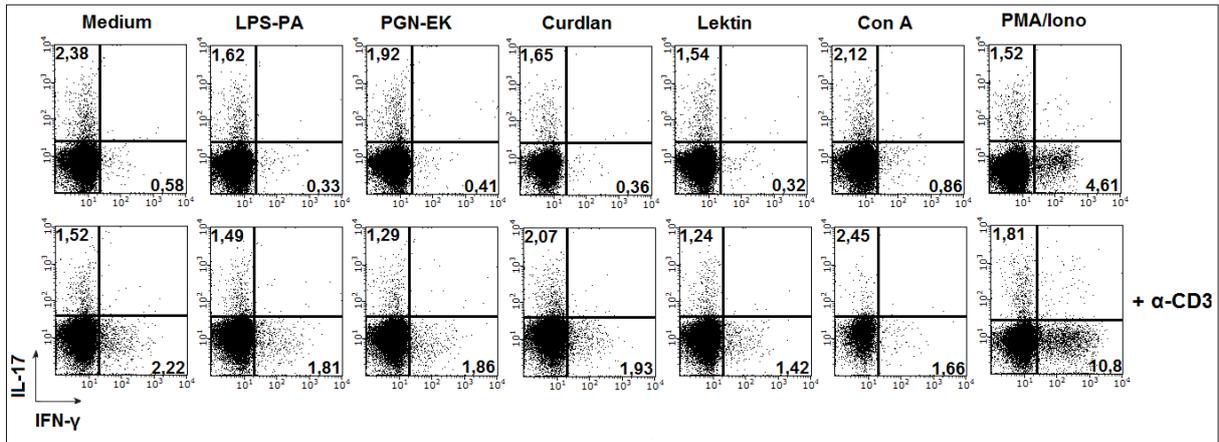
Wie in Abb. 3.54 dargestellt, konnten nach Stimulation mit Lektin und Con A statistisch signifikant erhöhte IL-17 Sekretionen von CD4<sup>+</sup>- T-Zellen ermittelt werden. Nach zusätzlicher Koaktivierung mit  $\alpha$ -CD3 konnten für alle getesteten Antigene erhöhte IL-17 Sekretionen von CD4<sup>+</sup>- T-Zellen beobachtet werden, statistisch jedoch nicht signifikant. Dahingegen konnte lediglich nach Stimulation mit Con A eine statistisch signifikant erhöhte IL-17 Sekretion von CD8<sup>+</sup>- T-Zellen beobachtet werden. Allerdings konnte im Gegensatz zu CD4<sup>+</sup>- T-Zellen bei CD8<sup>+</sup>- T-Zellen kein kostimulatorischer Effekt der getesteten Antigene nach gleichzeitiger Stimulation mit  $\alpha$ -CD3 nachgewiesen werden.



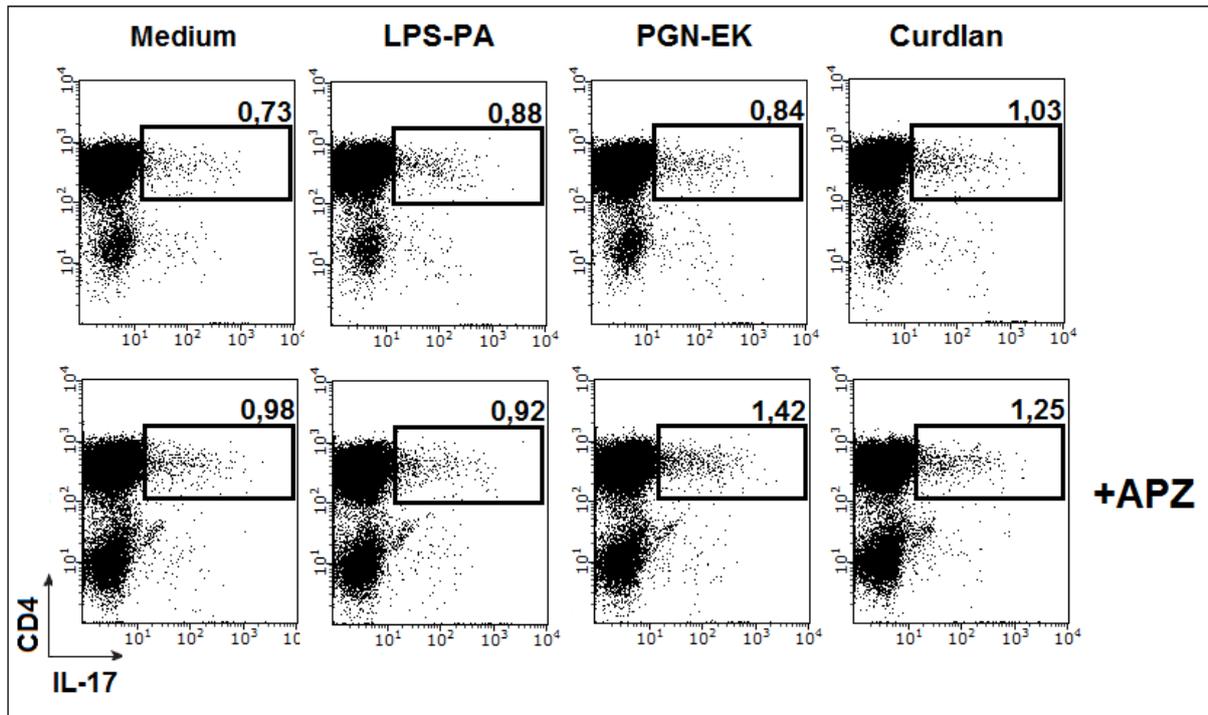
**Abbildung 3.54: Einfluss von bakteriellen Bestandteilen auf die IL-17 Produktion von CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>- T-Zellen.** CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>- T-Zellen wurden mittels MACS-Separation aus Milzzellen von weiblichen C57.BL/6 Mäusen (6-8 Wochen) isoliert, zu 10<sup>5</sup>-Zellen pro well ausgesät und mit PGN-EB (5 µg/ml), PGN-EK (5 µg/ml), LPS-PA (1 µg/ml), Curdlan AL (100 µg/ml), Lektin (1 µg/ml) und Con A (1 µg/ml) in Kombination mit α-CD3 (1 µg/ml) stimuliert. Nach 48 h Inkubationszeit wurde die IL-17 Produktion mittels ELISpot Assay ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM aus drei unabhängigen Experimenten mit n=6 Mäusen. Signifikante Unterschiede sind mit Sternen gekennzeichnet (\* p < 0,05).

### 3.2.15 Beeinflussung der intrazellulären IL-17 und IFN-γ Konzentration von CD4<sup>+</sup>- T-Zellen durch Stimulation mit bakteriellen Bestandteilen

Wie nach Stimulation mit Bakterien hatte die Stimulation mit allen getesteten bakteriellen Bestandteilen nach 5 h einen Abfall der intrazellulären IL-17 Konzentration von CD4<sup>+</sup>- T-Zellen zur Folge (Abb. 3.55). Dahingegen konnte eine erhöhte IFN-γ Konzentration nach Stimulation mit Con A und PMA/Iono ermittelt werden. Nach gleichzeitiger Stimulation mit α-CD3 konnten für Curdlan, Con A und PMA/Iono leicht erhöhte intrazelluläre IL-17 Konzentrationen nachgewiesen werden, jedoch war auch wie nach Stimulation mit Bakterien der prozentuale Anteil von IL-17 geringer als der Anteil der unstimulierten Mediumkontrolle. Zudem konnte ein Abfall der intrazellulären IFN-γ Konzentration nach Stimulation mit allen getesteten Zellwandbestandteilen nach gleichzeitiger α-CD3-Aktivierung beobachtet werden.



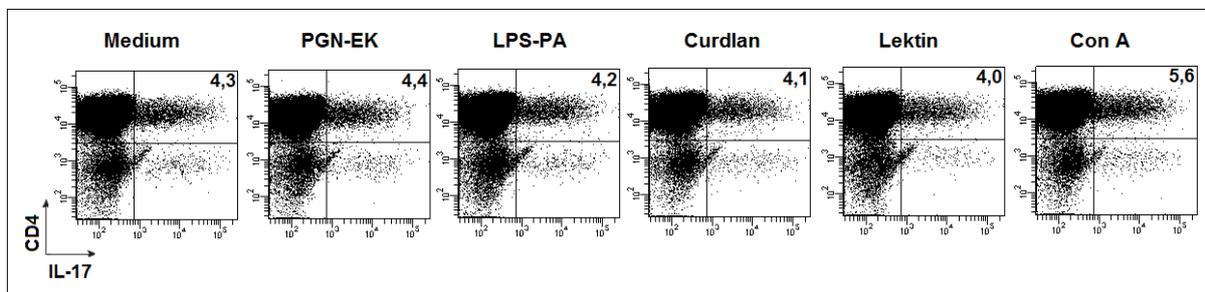
**Abbildung 3.55: Intrazelluläre IFN- $\gamma$  und IL-17 Färbung von CD4<sup>+</sup>- T-Zellen nach Stimulation mit bakteriellen Bestandteilen.** CD4<sup>+</sup>- T-Zellen, isoliert aus Milzzellen von weiblichen C57.BL/6 Mäusen wurden mit LPS-PA (1  $\mu$ g/ml), PGN-EK (5  $\mu$ g/ml), Curdlan AL (100  $\mu$ g/ml), Lektin (1  $\mu$ g/ml), Con A (1  $\mu$ g/ml) und PMA/Iono (50 ng/ml, 1  $\mu$ g/ml) für 5 h stimuliert ( $\pm$   $\alpha$ -CD3-Aktivierung). 4 h vor Ende der Restimulationszeit wurde Brefeldin A zu den Zellen gegeben. Nach Färbung mit *Fixable Viability Dye*® 660 wurden die Oberflächen mit CD4, sowie die Zytokine IFN- $\gamma$  und IL-17 gefärbt und durchflusszytometrisch bestimmt. Dargestellt sind die IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> und IL-17<sup>+</sup> Zellen in Prozent als *frequency of parent* bezogen auf alle CD4<sup>+</sup>- T-Zellen nach dem Ausschluss toter Zellen. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment (n=4).



**Abbildung 3.56: Intrazelluläre IL-17 Färbung von isolierten CD4<sup>+</sup>- T-Zellen nach Stimulation LPS, PGN und Curdlan in Kombination mit APZ.** CD4<sup>+</sup>- T-Zellen, isoliert aus Milzzellen von weiblichen C57.BL/6 Mäusen (6-8 Wochen) wurden mit LPS-PA (1  $\mu$ g/ml), PGN-EK (5  $\mu$ g/ml) und Curdlan AL (100  $\mu$ g/ml) für 16 h stimuliert ( $\pm$  50 000 APZ). 4 h vor Ende der Restimulationszeit wurde Brefeldin A zu den Zellen gegeben. Nach Färbung mit *Fixable Viability Dye*® 660 wurden die Oberflächen mit CD4, sowie das Zytokin IL-17 gefärbt und durchflusszytometrisch bestimmt. Dargestellt sind die IL-17<sup>+</sup>- Zellen in Prozent als *frequency of parent* bezogen auf alle CD4<sup>+</sup>- T-Zellen nach dem Ausschluss toter Zellen. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment (n=3).

Auch nach zusätzlicher Kultivierung mit 50 000 APZ für 24 h konnte lediglich eine leicht erhöhte Anzahl an IL-17<sup>+</sup>- Zellen im Vergleich zu CD4<sup>+</sup>- T-Zellen ohne APZ ermittelt werden (Abb. 3.56).

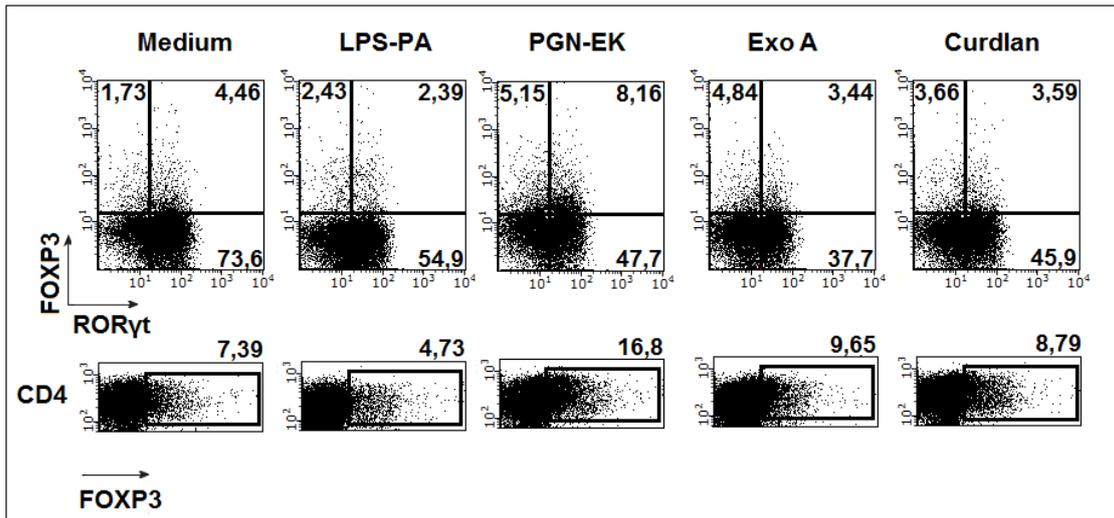
Zudem konnte lediglich nach Stimulation mit Con A (5,6 %) eine erhöhte intrazelluläre IL-17 Konzentration von Th17-polarisierten CD4<sup>+</sup>- T-Zellen im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle (4,3 %) nachgewiesen werden (Abb. 3.57).



**Abbildung 3.57: Intrazelluläre IL-17 Färbung von Th17-polarisierten CD4<sup>+</sup>- T-Zellen nach Stimulation mit bakteriellen Bestandteilen.** CD4<sup>+</sup>- T-Zellen, isoliert aus Milzzellen von weiblichen C57.BL/6 Mäusen (6-8 Wochen) wurden unter Th17-Bedingungen kultiviert und nach 5 Tagen mit PGN-EK (5 µg/ml), LPS-PA (1 µg/ml), Curdlan (100 µg/ml), Lektin (1 µg/ml) und Con A (1 µg/ml) für 5 h stimuliert (± α-CD3-Aktivierung). 4 h vor Ende der Restimulationszeit wurde Brefeldin A zu den Zellen gegeben. Nach Färbung mit Fixable Viability Dye® 660 wurden die Oberflächen mit CD4, sowie das Zytokin IL-17 gefärbt und durchflusszytometrisch bestimmt. Dargestellt sind die IL-17<sup>+</sup>- Zellen in Prozent als *frequency of parent* bezogen auf CD4<sup>+</sup>- T-Zellen nach dem Ausschluss toter Zellen. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment (n=4).

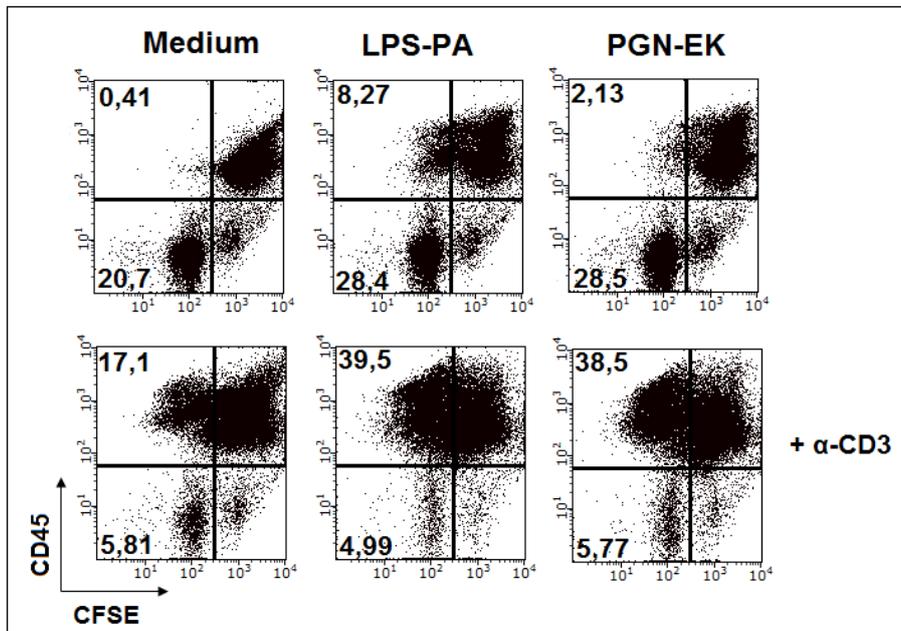
### 3.2.16 Beeinflussung von FOXP3 und RORγt durch Kultivierung mit verschiedenen bakteriellen Bestandteilen während der Th17-Polarisierung von CD4<sup>+</sup>- T-Zellen

Im Gegensatz zur Kultivierung mit Bakterien konnte lediglich durch den Einfluss von PGN-EK (16,8 %) eine deutlich erhöhte Anzahl FOXP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>- T-Zellen ermittelt werden (Abb. 3.58). Eine gleichzeitige Kultivierung mit Exo A (9,65 %) und Curdlan (8,79 %) hatte einen geringen Anstieg der FOXP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>- T-Zellen zur Folge. Kultivierung mit LPS-PA (4,73 %) führte hingegen zu einem Abfall der FOXP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>- T-Zellen. Zudem führte eine Stimulation mit alle getesteten bakteriellen Bestandteilen zu einem deutlichen Abfall der RORγt<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>- T-Zellen. Lag der Anteil von RORγt<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>- T-Zellen nach 72 h Th17-Polarisierung noch bei 73,6 %, so konnten nach gleichzeitiger Kultivierung lediglich 54,9 % RORγt<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>- T-Zellen für LPS-PA, 47,7 % für PGN-EK, 37,7 % für Exo A und 45,9 % für Curdlan detektiert werden.



**Abbildung 3.58: FOXP3 und RORγt Färbung von Th17-polarisierten CD4<sup>+</sup>- T-Zellen nach Stimulation mit bakteriellen Bestandteilen.** CD4<sup>+</sup>-T-Zellen, isoliert aus Milzzellen von weiblichen C57.BL/6 Mäusen wurden unter Th17-Bedingungen zusammen mit LPS-PA (1 µg/ml), PGN-EK (5 µg/ml), Exo A (1 µg/ml) und Curdlan AL (100 µg/ml) für 72 h kultiviert. Nach Färbung mit *Fixable Viability Dye*® 660 wurden die Oberflächen mit CD4, sowie FOXP3 und RORγt gefärbt und durchflusszytometrisch bestimmt. Dargestellt sind die FOXP3<sup>+</sup>-, RORγt<sup>+</sup>- und FOXP3<sup>+</sup>RORγt<sup>+</sup>- Zellen in Prozent als *frequency of parent* bezogen auf alle CD4<sup>+</sup>- T-Zellen nach dem Ausschluss toter Zellen (obere Reihe) und die Gesamtzahl FOXP3<sup>+</sup>-Zellen (untere Reihe) . Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment (n=3).

### 3.2.17 Einfluss von Zellwandbestandteilen auf die Zellproliferation von Milzzellen

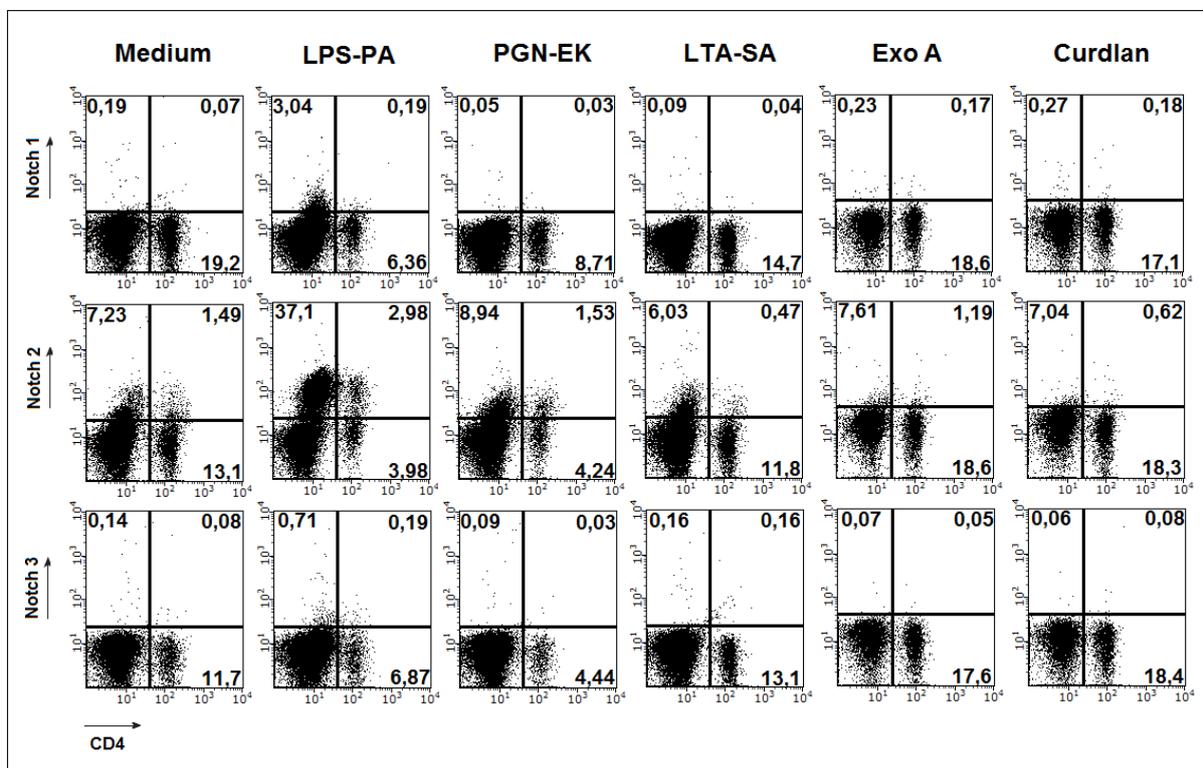


**Abbildung 3.59: Messung der Proliferation nach Stimulation mit LPS-PA und PGN-EK.** Milzzellen von weiblichen C57.BL/6 Mäusen wurden mit CFSE gefärbt und für 72 h mit LPS-PA (1 µg/ml) und PGN-EK (5 µg/ml), stimuliert. Nach Färbung der Oberflächen mit CD45 wurden die Proben durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt ist die Proliferationsrate von CD45<sup>+</sup>- und CD45<sup>-</sup>- Milzzellen in Prozent als *frequency of parent* bezogen auf alle Zellen. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment (n=3).

Wie in Abb. 3.59 dargestellt, konnte nach Stimulation mit LPS-PA (8,27 %) und PGN-EK (2,13 %) ein proliferationsfördernder Effekt von CD45<sup>+</sup>- Milzzellen im Vergleich zur Mediumkontrolle (0,41 %) detektiert werden. Zudem konnte für die Subpopulation der CD45<sup>-</sup>- Milzzellen eine erhöhte Proliferation nach Stimulation mit LPS-PA (28,4 %) und PGN-EK (28,5 %) im Vergleich zur Mediumkontrolle (20,7 %) ermittelt werden. Nach gleichzeitiger Aktivierung mit  $\alpha$ -CD3 konnte ein deutlicher Einfluss auf die Proliferation beobachtet werden. So führte Stimulation mit LPS-PA (39,5 %) und PGN-EK (38,5 %) zu einer erhöhten Proliferationsrate von CD45<sup>+</sup>- Milzzellen im Vergleich zur Mediumkontrolle (17,1 %).

### 3.2.18 Beeinflussung der Notch-Rezeptoren durch Stimulation mit verschiedenen bakteriellen Bestandteilen

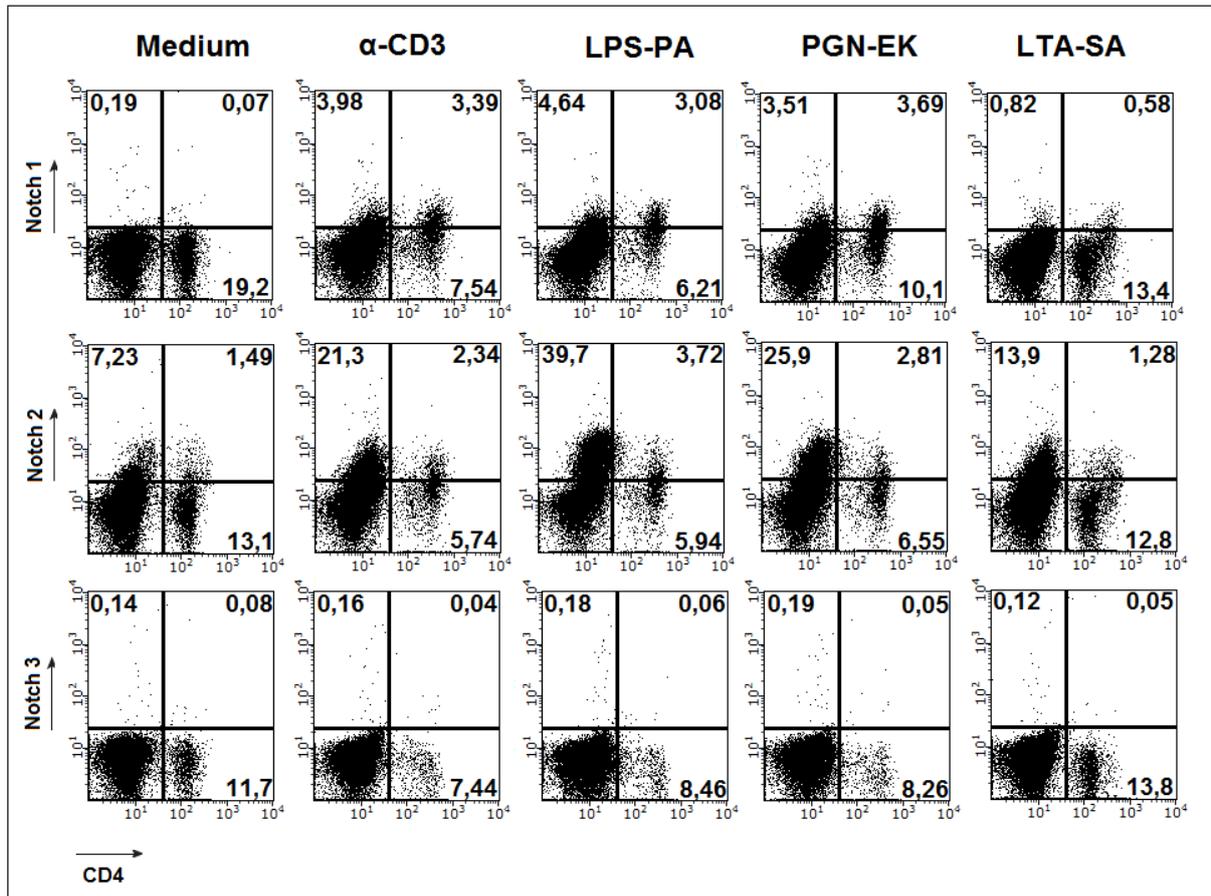
Lediglich nach Stimulation mit LPS (3,04 %) konnte eine erhöhte Anzahl Notch1<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>- Milzzellen im Vergleich zur Mediumkontrolle (0,19 %) beobachtet werden (Abb. 3.60).



**Abbildung 3.60: Analyse der Notch Oberflächenrezeptoren 1-3 nach dem Einfluss von bakteriellen Bestandteilen.** Milzzellen von weiblichen C57.BL/6 Mäusen wurden für 48 h mit LPS-PA (1  $\mu$ g/ml), PGN-EK (5  $\mu$ g/ml) LTA-SA (1  $\mu$ g/ml), Exo A (1  $\mu$ g/ml) und Curdlan (100  $\mu$ g/ml) stimuliert. Nach Färbung der Oberflächen mit CD4, CD8 und Notch 1-3 wurden die Proben durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt sind die CD4<sup>+</sup>- T-Zellen, die Notch<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>- und Notch<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>- Zellen in Prozent als *frequency of parent* bezogen auf alle Zellen. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment (n=3).

Zudem konnte eine deutliche Erhöhung Notch2<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>-Zellen nach Stimulation mit LPS (37,1 %) und eine leichte Erhöhung nach Einfluss von PGN (8,94 %) im Vergleich zur Mediumkontrolle (7,23 %) ermittelt werden. Dahingegen konnte keine Beeinflussung der Notch3<sup>+</sup>-Zellen durch den Einfluss von allen getesteten bakteriellen Bestandteilen detektiert werden.

Auch nach Aktivierung mit  $\alpha$ -CD3 konnte keine zusätzliche Beeinflussung der Notch<sup>+</sup>-Zellen durch die getesteten Zellwandbestandteile ermittelt werden (Abb. 3.61).

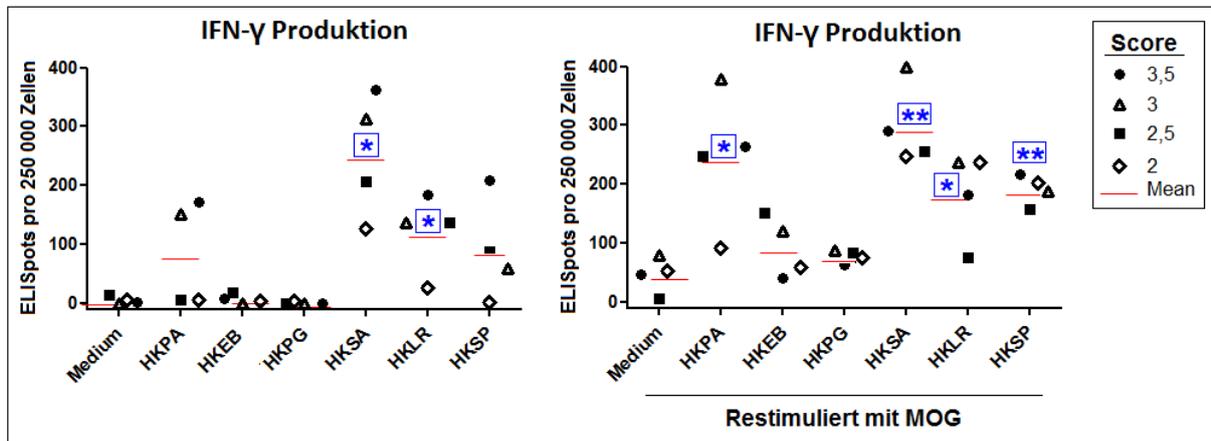


**Abbildung 3.61: Analyse der Notch Oberflächenrezeptoren 1-3 von Milzzellen nach dem Einfluss von bakteriellen Bestandteilen und gleichzeitiger  $\alpha$ -CD3 Aktivierung.** Milzzellen von weiblichen C57.BL/6 Mäusen wurden für 48 h mit LPS-PA (1  $\mu$ g/ml), PGN-EK (5  $\mu$ g/ml), LTA-SA (1  $\mu$ g/ml), Exo A (1  $\mu$ g/ml) und Curdian (100  $\mu$ g/ml) in Kombination mit  $\alpha$ -CD3 (1  $\mu$ g/ml) stimuliert. Nach Färbung der Oberflächen mit CD4, CD8 und Notch 1-3 wurden die Proben durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt sind die CD4<sup>+</sup>-T-Zellen, die Notch<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>- und Notch<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>-Zellen in Prozent als *frequency of parent* bezogen auf alle Zellen. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment (n=3).

### 3.3 Beeinflussung der Zytokinproduktion von MOG-spezifischen Zellen

#### 3.3.1 Einfluss von auf die Zytokinproduktion von Milzzellen aus EAE-Tieren

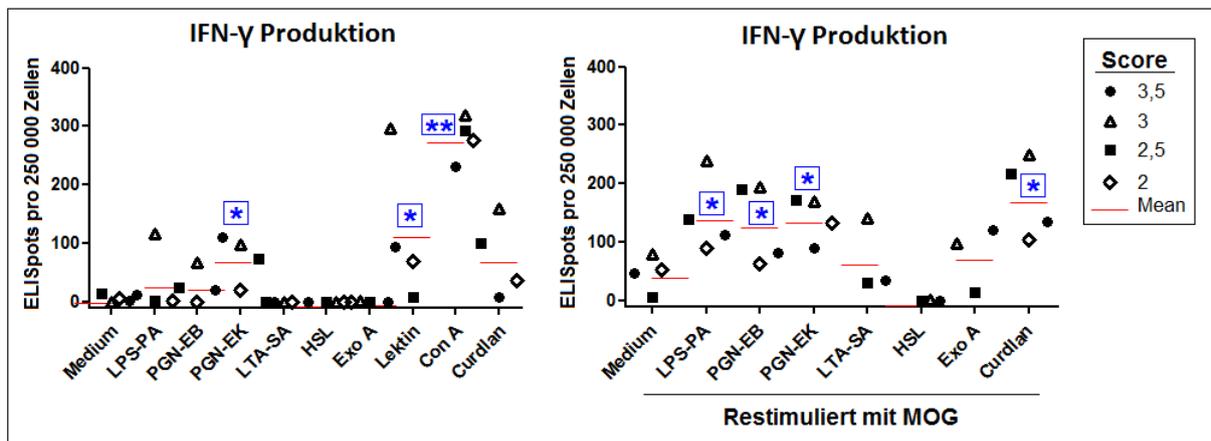
Wie in Abb. 3.62 dargestellt, konnte nach Stimulation mit HKSA und HKLR ein statistisch signifikant erhöhter Anstieg der IFN- $\gamma$  Sekretion detektiert werden. Nach einer zusätzlichen Restimulation mit MOG<sub>35-55</sub>-Peptid konnten für alle getesteten Bakterien erhöhte IFN- $\gamma$  Sekretionen beobachtet werden, statistisch hoch signifikant nach Stimulation mit HKSA und HKSP und statistisch signifikant nach Stimulation mit HKPA und HKLR.



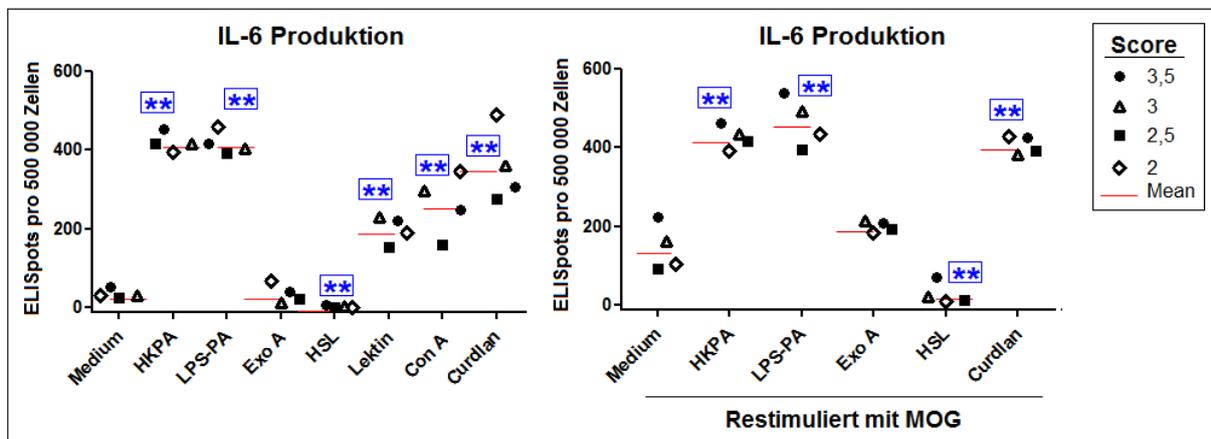
**Abbildung 3.62: Einfluss von hitze-getöteten Bakterien auf die IFN- $\gamma$  Produktion.** Milzzellen von EAE-Mäusen (Tag 15 nach Immunisierung) wurden zu  $2,5 \cdot 10^5$ -Zellen pro well ausgesät und in Kombination mit MOG<sub>35-55</sub> (20  $\mu$ g/ml) mit  $10^8$ /ml HKPA, HKEB, HKPG, HKSA, HKLR und HKSP stimuliert. Nach 20 h Inkubationszeit wurde die IFN- $\gamma$  Produktion mittels ELISpot Assay ermittelt. Dargestellt sind die einzelnen Werte mit dem klinischen Score von n=4 Mäusen und die Mittelwerte (rote Linie) aus zwei unabhängigen Experimenten. Signifikante Unterschiede sind mit Sternchen gekennzeichnet (\* p < 0,05; \*\* p < 0,01).

Eine Untersuchung verschiedener bakterieller Bestandteile ergab, dass lediglich eine Stimulation mit PGN-EK und Lektin zu einer statistisch signifikant erhöhten IFN- $\gamma$  Sekretion führte (Abb. 3.65). Zudem konnten nach Stimulation mit dem pflanzlichen Lektin Con A eine statistisch hoch signifikante erhöhte IFN- $\gamma$  Ausschüttung beobachtet werden. Nach zusätzlicher Restimulation mit MOG<sub>35-55</sub>-Peptid konnte zudem nach Stimulation mit LPS-PA, PGN-EB, PGN-EK und Curdlan eine statistisch signifikant erhöhte IFN- $\gamma$  Sekretion nachgewiesen werden. Stimulation mit HSL hingegen führte zu einer Hemmung der IFN- $\gamma$  Ausschüttung.

In Abb. 3.64 ist der Einfluss von HKPA und verschiedenen bakteriellen Bestandteilen auf die IL-6 Sekretion dargestellt. Stimulation mit HKPA, LPS-PA, Lektin, Con A und Curdlan führten zu einer statistisch hoch signifikant erhöhten IL-6 Ausschüttung. Dahingegen konnte nach Restimulation mit MOG<sub>35-55</sub>-Peptid keine zusätzliche IL-6 Sekretion beobachtet werden. Analog zur IFN- $\gamma$  Sekretion hatte die Stimulation mit HSL eine statistisch hoch signifikant verminderte IL-6 Ausschüttung zur Folge.

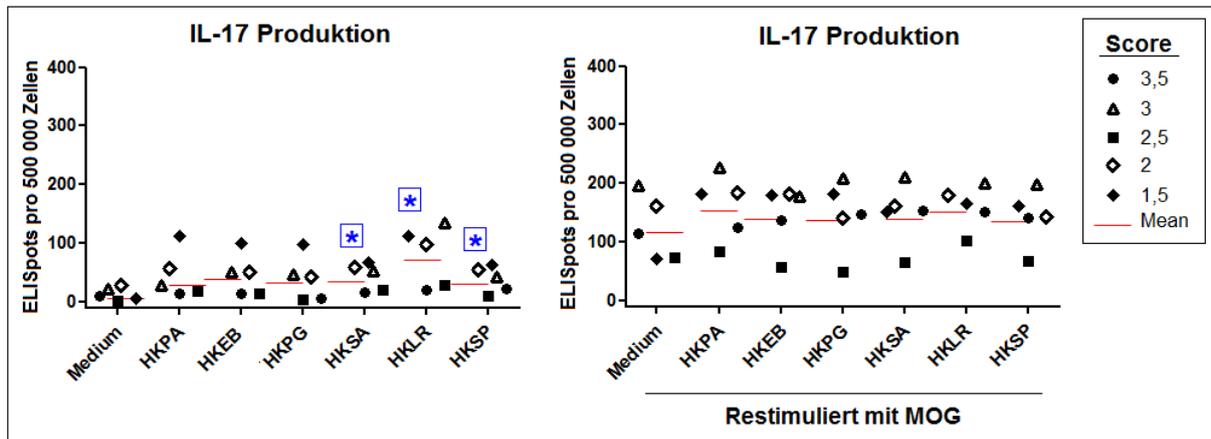


**Abbildung 3.63: Einfluss von bakteriellen Bestandteilen auf die IFN- $\gamma$  Produktion.** Milzzellen von EAE-Mäusen (Tag 15 nach Immunisierung) wurden zu  $2,5 \cdot 10^5$ -Zellen pro well ausgesät und in Kombination mit MOG<sub>35-55</sub> (20  $\mu\text{g/ml}$ ) mit LPS-PA (1  $\mu\text{g/ml}$ ), PGN-EB (5  $\mu\text{g/ml}$ ), PGN-EK (5  $\mu\text{g/ml}$ ), LTA-SA (1  $\mu\text{g/ml}$ ), HSL (1  $\mu\text{g/ml}$ ), Exo A (1  $\mu\text{g/ml}$ ), Lektin (1  $\mu\text{g/ml}$ ), Con A (1  $\mu\text{g/ml}$ ) und Curdlan AL (100  $\mu\text{g/ml}$ ) stimuliert. Nach 20 h Inkubationszeit wurde die IFN- $\gamma$  Produktion mittels ELISpot Assay ermittelt. Dargestellt sind die einzelnen Werte mit dem klinischen Score von n=4 Mäusen und die Mittelwerte (rote Linie) aus zwei unabhängigen Experimenten. Signifikante Unterschiede sind mit Sternen gekennzeichnet (\* p < 0,05; \*\* p < 0,01).



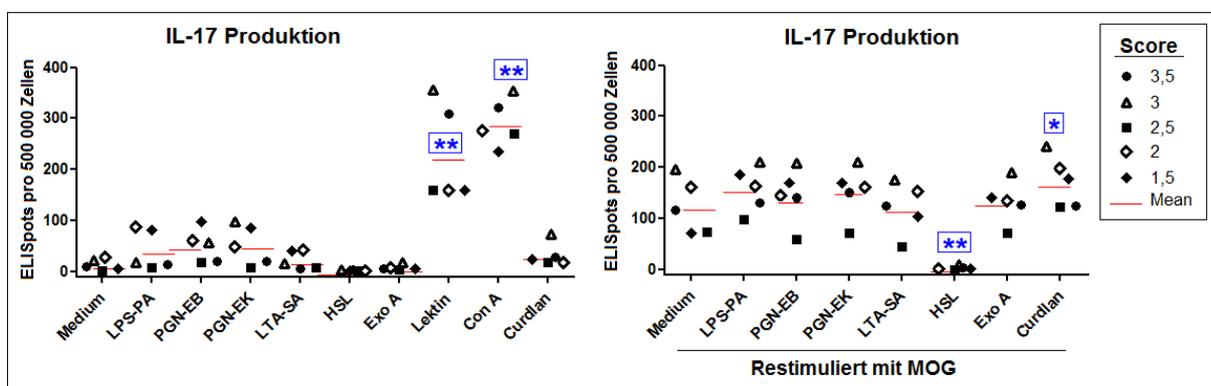
**Abbildung 3.64: Einfluss von HKPA und bakteriellen Bestandteilen auf die IL-6 Produktion.** Milzzellen von EAE-Mäusen (Tag 15 nach Immunisierung) wurden zu  $5 \cdot 10^5$ -Zellen pro well ausgesät und in Kombination mit MOG<sub>35-55</sub> (20  $\mu\text{g/ml}$ ) mit HKPA ( $10^8/\text{ml}$ ), LPS-PA (1  $\mu\text{g/ml}$ ), Exo A (1  $\mu\text{g/ml}$ ), HSL (1  $\mu\text{g/ml}$ ), Lektin (1  $\mu\text{g/ml}$ ), Con A (1  $\mu\text{g/ml}$ ) und Curdlan AL (100  $\mu\text{g/ml}$ ) stimuliert. Nach 20 h Inkubationszeit wurde die IL-6 Produktion mittels ELISpot Assay ermittelt. Dargestellt sind die einzelnen Werte mit dem klinischen Score von n=4 Mäusen und die Mittelwerte (rote Linie) aus zwei unabhängigen Experimenten. Signifikante Unterschiede sind mit Sternen gekennzeichnet (\*\* p < 0,01).

Im Gegensatz dazu hatte die Stimulation mit Bakterien nur einen geringen Einfluss auf die IL-17 Sekretion (Abb. 3.65). Zwar konnten für alle getesteten Bakterien leicht erhöhte IL-17 Ausschüttungen nachgewiesen werden, statistisch signifikant jedoch nur nach Stimulation mit HKSA, HKLR und HKSP. Nach Restimulation mit MOG<sub>35-55</sub>-Peptid konnte ein deutlicher Anstieg der IL-17 Sekretion im Vergleich zur Kontrolle ohne MOG<sub>35-55</sub>-Peptid beobachtet werden, jedoch keine, statistisch signifikanten kostimulatorischen Effekte.



**Abbildung 3.65: Einfluss von hitze-getöteten Bakterien auf die IL-17-Produktion.** Milzzellen von EAE-Mäusen (Tag 15 nach Immunisierung) wurden zu  $5 \cdot 10^5$ -Zellen pro well ausgesät und in Kombination mit MOG<sub>35-55</sub> (20 µg/ml) mit  $10^8$ /ml HKPA, HKEB, HKPG, HKSA, HKLR und HKSP stimuliert. Nach 20 h Inkubationszeit wurde die IL-17 Produktion mittels ELISpot Assay ermittelt. Dargestellt sind die einzelnen Werte mit dem klinischen Score von n=5 Mäusen und die Mittelwerte (rote Linie) aus zwei unabhängigen Experimenten. Signifikante Unterschiede sind mit Sternen gekennzeichnet (\* p < 0,05).

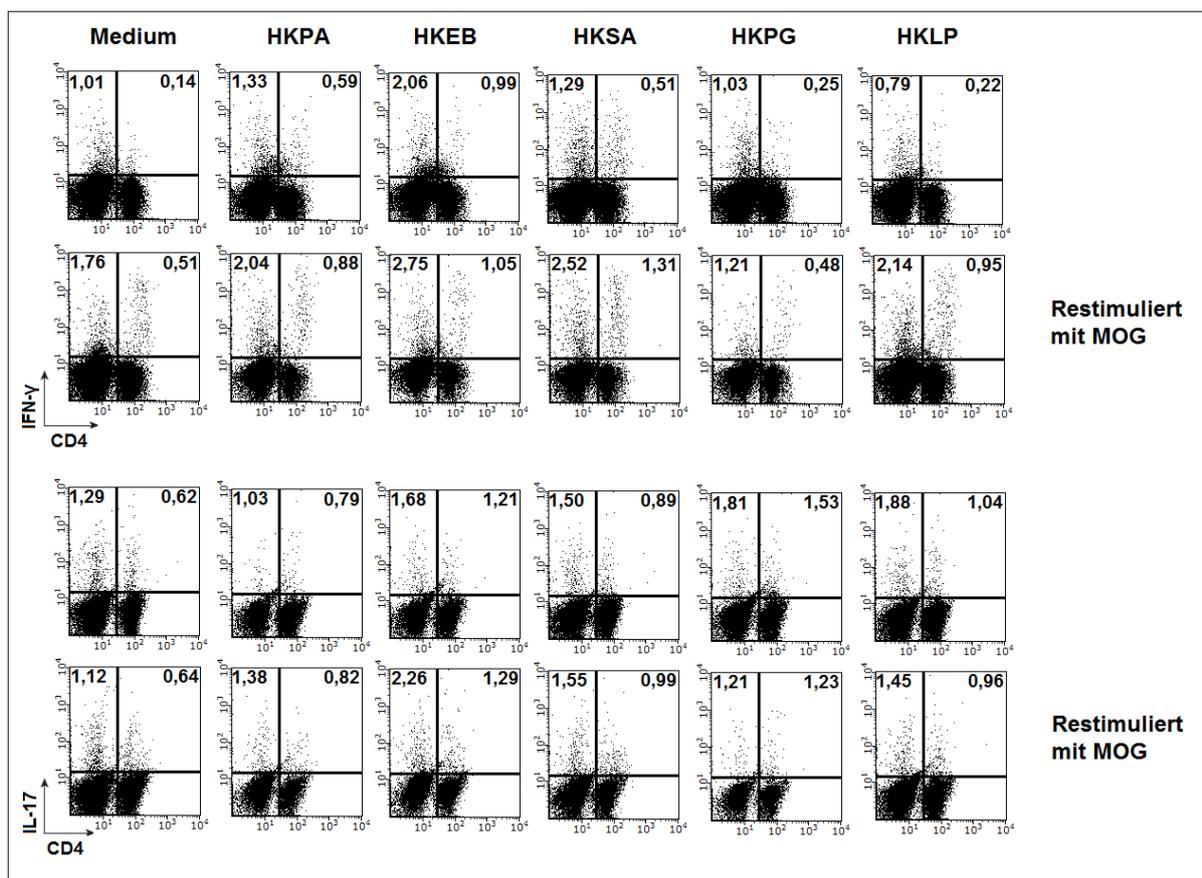
Die Stimulation mit Lektinen hatte einen deutlichen Einfluss auf die IL-17 Ausschüttung. Sowohl Stimulation mit Lektin von *P.aeruginosa*, als auch die Stimulation mit dem pflanzlichen Lektin Con A führten zu einer statistisch hoch signifikant erhöhten IL-17 Sekretion (Abb. 3.66). Stimulation mit LPS und PGN hatte eine leicht erhöhte IL-17 Ausschüttung zur Folge. Nach Restimulation mit MOG<sub>35-55</sub>-Peptid konnte eine statistisch signifikant erhöhte IL-17 Ausschüttung nach Stimulation mit Curdlan beobachtet werden. Wie auch schon bei den Zytokinen IFN-γ und IL-6 konnte nach Stimulation mit HSL eine statistisch hoch signifikante Hemmung der IL-17 Sekretion nachgewiesen werden.



**Abbildung 3.66: Einfluss von bakteriellen Bestandteilen auf die IL-17 Produktion.** Milzzellen von EAE-Mäusen (Tag 15 nach Immunisierung) wurden zu  $5 \cdot 10^5$ -Zellen pro well ausgesät und in Kombination mit MOG<sub>35-55</sub> (20 µg/ml) mit LPS-PA (1 µg/ml), PGN-EB (5 µg/ml), PGN-EK (5 µg/ml), LTA-SA (1 µg/ml), HSL (1 µg/ml), Exo A (1 µg/ml), Lektin (1 µg/ml), Con A (1 µg/ml) und Curdlan AL (100 µg/ml) stimuliert. Nach 20 h Inkubationszeit wurde die IL-17 Produktion mittels ELISpot Assay ermittelt. Dargestellt sind die einzelnen Werte mit dem klinischen Score von n=5 Mäusen und die Mittelwerte (rote Linie) aus zwei unabhängigen Experimenten. Signifikante Unterschiede sind mit Sternen gekennzeichnet (\* p < 0,05; \*\* p < 0,01).

### 3.3.2 Einfluss auf die IFN- $\gamma$ und IL-17 Konzentration von Milzzellen aus EAE-Tieren

Nach Stimulation mit allen getesteten Bakterien konnte ein leichter Anstieg der intrazellulären IFN- $\gamma$  Konzentration von CD4<sup>+</sup>- T-Zellen beobachtet werden (Abb. 3.67), am deutlichsten nach Stimulation mit HKEB (0,99 %) und HKPA (0,59 %) im Vergleich zur Kontrolle (0,14 %). Zudem führte die Stimulation mit HKPA (1,35 %), HKEB (2,06 %) und HKSA (1,29 %) zu einem Anstieg der IFN- $\gamma$  Konzentration von CD4<sup>-</sup>- Zellen im Vergleich zur Kontrolle (1,01%). Eine Restimulation mit MOG<sub>35-55</sub>-Peptid hatte eine Erhöhung der IFN- $\gamma$  Konzentration von CD4<sup>+</sup>- und CD4<sup>-</sup>- Zellen zur Folge. Hinsichtlich der CD4<sup>+</sup>- T-Zellen konnten nach Stimulation mit HKSA (1,31 %) und HKLP (0,95 %) erhöhte IFN- $\gamma$  Konzentrationen im Vergleich zur Kontrolle (0,51 %) ermittelt werden.

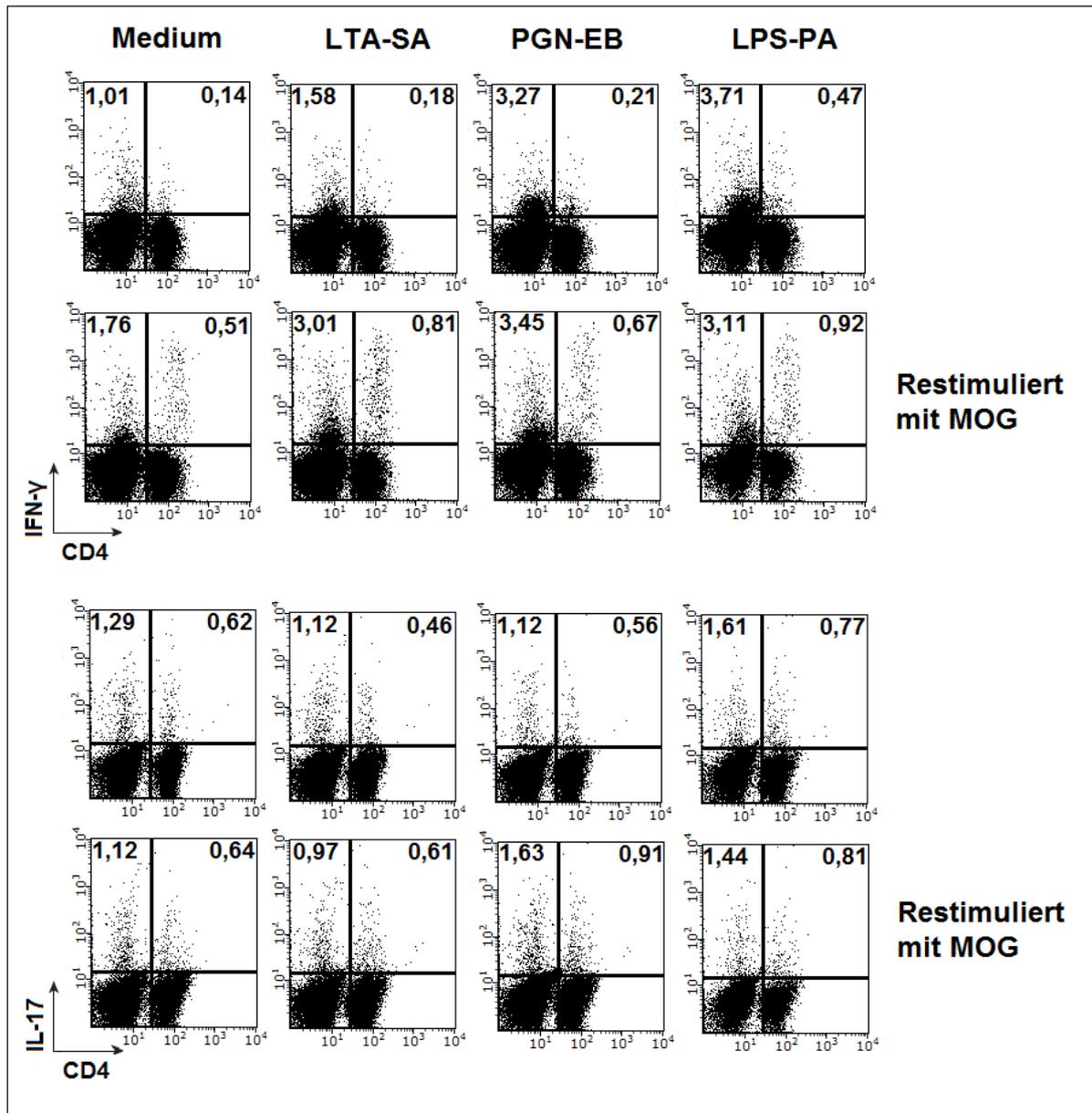


**Abbildung 3.67: Intrazelluläre IFN- $\gamma$  und IL-17 Färbung nach Stimulation mit hitze-getöteten Bakterien.** Milzzellen von EAE-Tieren (Tag 15 nach Immunisierung) wurden mit  $10^8$ /ml HKPA, HKEB, HKSA, HKPG und HKLP ( $\pm$  MOG<sub>35-55</sub>-Restimulation, 20  $\mu$ g/ml) für 48 h stimuliert. 4 h vor Ende der Restimulationszeit wurde Brefeldin A zu den Zellen gegeben. Nach Färbung mit *Fixable Viability Dye*® 660 wurden die Oberflächen mit CD4 und CD8, sowie die Zytokine IFN- $\gamma$  und IL-17 gefärbt und durchflusszytometrisch bestimmt. Dargestellt sind die IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>/ IL-17<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>- und CD4<sup>-</sup>- Zellen in Prozent als *frequency of parent* bezogen auf alle Zellen nach dem Ausschluss toter Zellen. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment (Score = 2,5).

Die CD4<sup>-</sup>- Zellen betreffend, konnten nach Stimulation mit HKEB (2,75 %), HKSA (2,52 %), HKLP (2,14 %) und HKPA (2,04 %) erhöhte IFN- $\gamma$  Konzentrationen im Vergleich zur Kontrolle (1,76 %) detektiert werden. Im Gegensatz dazu hatte eine zusätzliche Restimulation mit MOG<sub>35-55</sub>-Peptid keinen Einfluss auf die intrazelluläre IL-17 Konzentration von CD4<sup>+</sup>- und CD4<sup>-</sup>- Zellen. Stimulation mit allen getesteten Bakterien hatte hingegen einen leichten Anstieg der IL-17 Konzentration von CD4<sup>+</sup>- T-Zellen zur Folge, unabhängig von zusätzlicher MOG<sub>35-55</sub>-Peptid-Stimulation. Zudem konnte ein Anstieg der IL-17 Konzentration von CD4<sup>-</sup>- Zellen nach Stimulation mit HKPG (1,81 %), HKLP (1,88 %) HKEB (1,68 %) und HKSA (1,50 %) im Vergleich zur Kontrolle (1,29 %) ermittelt werden. Nach zusätzlicher Restimulation mit MOG<sub>35-55</sub>-Peptid konnte nochmals eine leichte Erhöhung der IL-17 Konzentration nach Stimulation mit HKEB (2,28 %), HKSA (1,55 %), HKLP (1,45 %) HKPA (1,38 %) und HKPG (1,21 %) im Vergleich zur Kontrolle (1,12 %) nachgewiesen werden.

Während lediglich nach Stimulation mit LPS (0,47 %) ein Anstieg der IFN- $\gamma$  Konzentration von CD4<sup>+</sup>- T-Zellen im Vergleich zur Kontrolle (0,14 %) detektiert werden konnte, hatte auch die Stimulation mit LTA-SA (1,58 %), PGN-EB (3,27 %) und LPS (3,71 %) einen deutlichen Anstieg der intrazellulären IFN- $\gamma$  Konzentration von CD4<sup>-</sup>- Zellen im Vergleich zur Kontrolle (1,76 %) zur Folge (Abb. 3.68). Nach zusätzlicher Restimulation mit MOG<sub>35-55</sub>-Peptid konnte ein Anstieg der IFN- $\gamma$  Konzentration von CD4<sup>+</sup>- T-Zellen nach Stimulation mit LTA-SA (0,81 %), PGN-EB (0,67 %) und LPS (0,92 %) im Vergleich zur Kontrolle (0,51 %) nachgewiesen werden. Hinsichtlich der CD4<sup>-</sup>- Zellen konnte nur nach Stimulation mit LTA-SA (3,01 %) eine kostimulierende Wirkung auf die IFN- $\gamma$  Konzentration im Vergleich zur Kontrolle (1,76 %) beobachtet werden.

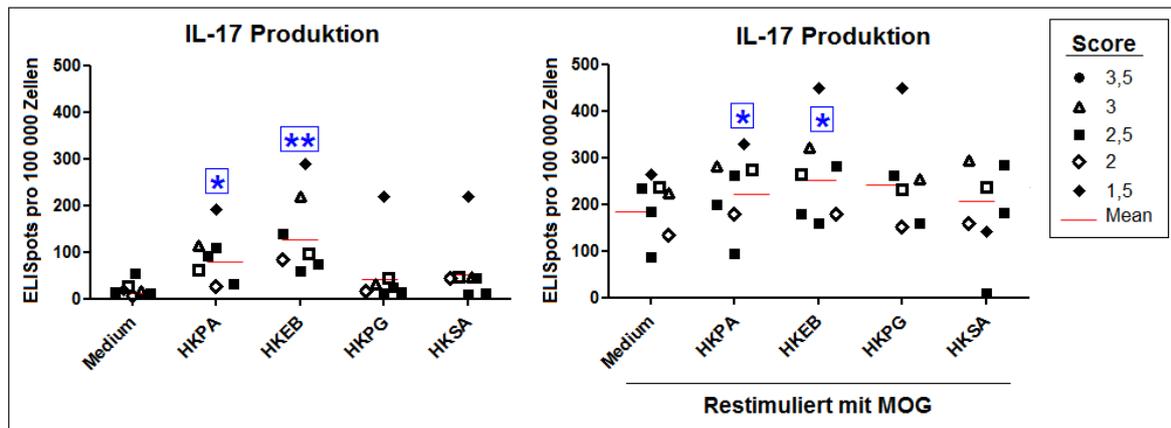
Einen Anstieg der intrazellulären IL-17 Konzentration konnte lediglich nach Stimulation mit LPS detektiert werden, sowohl für CD4<sup>+</sup>- (0,77 %) also für CD4<sup>-</sup>- Zellen (1,61 %) im Vergleich zur Kontrolle (CD4<sup>+</sup>: 0,62 %; CD4<sup>-</sup>: 1,29 %). Nach Restimulation mit MOG<sub>35-55</sub>-Peptid konnte ein leichter Anstieg der IL-17 Konzentration von CD4<sup>+</sup>- T-Zellen nach Stimulation mit PGN-EB (0,91 %) und LPS (0,81 %) im Vergleich zur Kontrolle (0,64 %) nachgewiesen werden. Die CD4<sup>-</sup>- Zellen betreffend hatte Stimulation mit PGN-EB (1,63 %) und LPS-PA (1,44 %) höhere IL-17 Konzentrationen im Vergleich zur Kontrolle (1,12 %) zur Folge.



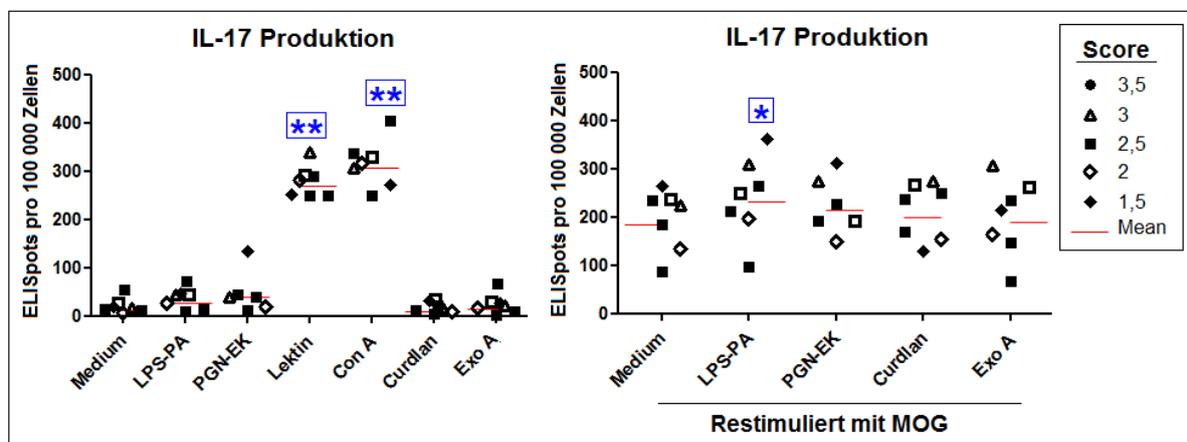
**Abbildung 3.68: Intrazelluläre IFN- $\gamma$  und IL-17 Färbung von Milzzellen nach Stimulation mit PGN, LTA und LPS.** Milzzellen von EAE-Tieren (Tag 15 nach Immunisierung) wurden mit PGN-EB (5  $\mu\text{g/ml}$ ), LTA-SA (1  $\mu\text{g/ml}$ ) und LPS-PA (1  $\mu\text{g/ml}$ ) für 48 h stimuliert ( $\pm$  MOG<sub>35-55</sub>-Restimulation,  $\mu\text{g/ml}$ ). 4 h vor Ende der Restimulationszeit wurde Brefeldin A zu den Zellen gegeben. Nach Färbung mit *Fixable Viability Dye*® 660 wurden die Oberflächen mit CD4 und CD8, sowie die Zytokine IFN- $\gamma$  und IL-17 gefärbt und durchflusszytometrisch bestimmt. Dargestellt sind die IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>/IL-17<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>- und CD4<sup>-</sup>-Zellen in Prozent als *frequency of parent* bezogen auf alle Zellen nach dem Ausschluss toter Zellen. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment (Score = 2,5).

### 3.3.3 Einfluss auf die IL-17 Produktion von CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>- T-Zellen aus EAE-Tieren

Wie in Abb. 3.69 dargestellt, konnten nach Stimulation mit HKPA und HKEB statistisch signifikant erhöhte IL-17 Sekretionen von isolierten CD4<sup>+</sup>- T-Zellen detektiert werden. Eine zusätzliche Restimulation mit MOG<sub>35-55</sub>-Peptid hatte einen deutlichen Anstieg der IL-17 Sekretion zur Folge, jedoch konnte lediglich nach Stimulation mit HKPA und HKEB eine leichte, statistisch signifikant erhöhte IL-17 Sekretion nachgewiesen werden.

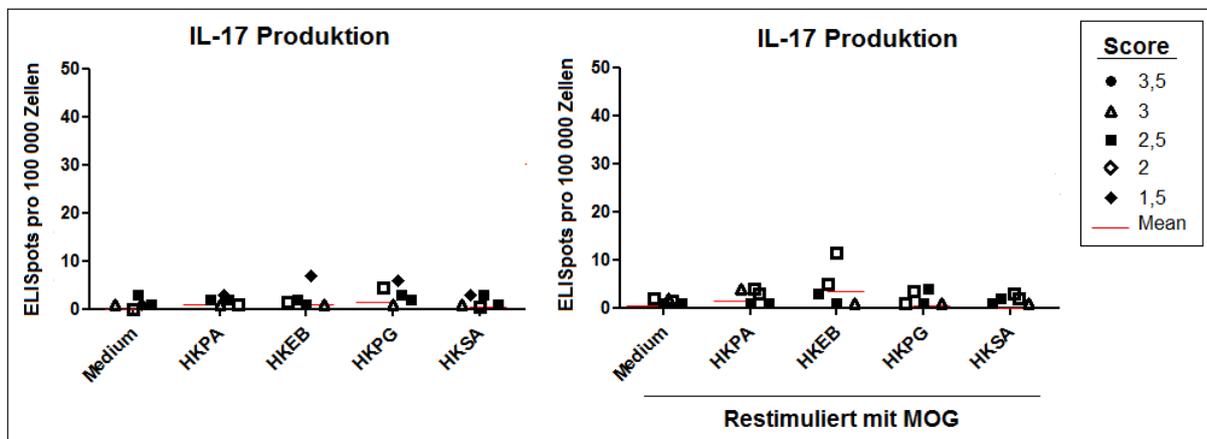


**Abbildung 3.69: Einfluss von Bakterien auf die IL-17 Produktion von isolierten CD4<sup>+</sup>- T-Zellen,** CD4<sup>+</sup>- T-Zellen wurden mittels MACS-Separation aus Milzzellen von EAE- Mäusen (Tag 15 nach Immunisierung) isoliert, zu 10<sup>5</sup>-Zellen pro well ausgesät und mit 10<sup>8</sup>/ml HKPA, HKEB, HKPG und HKSA ( $\pm$  20  $\mu$ g/ml MOG<sub>35-55</sub>) stimuliert. Nach 48 h wurde die IL-17 Produktion mittels ELISpot ermittelt. Dargestellt sind die einzelnen Werte mit dem klinischen Score von n=7 Mäusen und die Mittelwerte (rote Linie) aus vier unabhängigen Experimenten Signifikante Unterschiede sind mit Sternen gekennzeichnet (\* p < 0,05; \*\* p < 0,01).

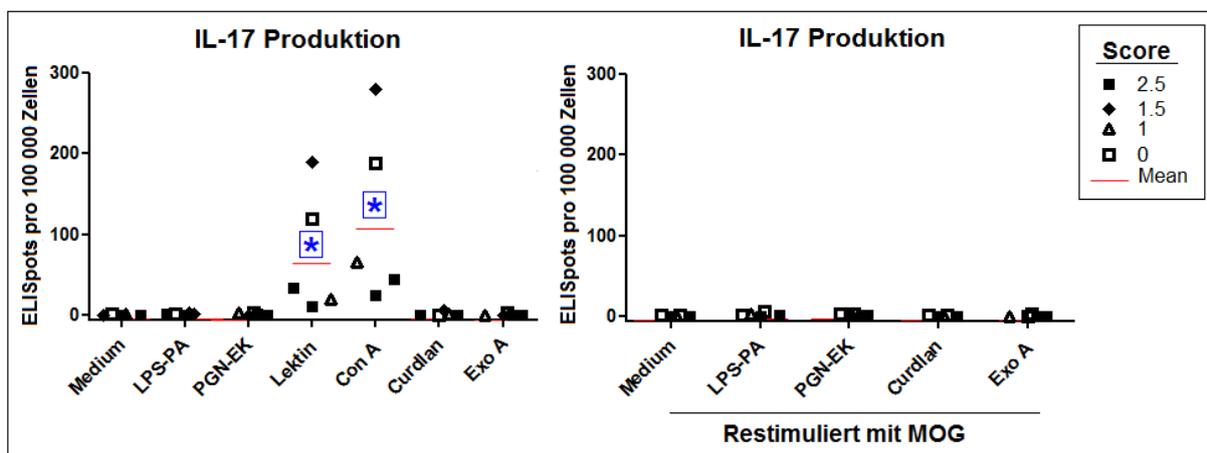


**Abbildung 3.70: Einfluss von bakteriellen Bestandteilen auf die IL-17 Produktion von isolierten CD4<sup>+</sup>- T-Zellen aus EAE-Mäusen.** CD4<sup>+</sup>- T-Zellen wurden mittels MACS-Separation aus Milzzellen von EAE- Mäusen (Tag 15 nach Immunisierung) isoliert, zu 10<sup>5</sup>-Zellen pro well ausgesät und mit LPS-PA (1  $\mu$ g/ml), PGN-EK (5  $\mu$ g/ml), Lektin (1  $\mu$ g/ml), Con A (1  $\mu$ g/ml), Curdlan (100  $\mu$ g/ml) und Exo A (1  $\mu$ g/ml)  $\pm$  20  $\mu$ g/ml MOG<sub>35-55</sub> stimuliert. Nach 48 h wurde die IL-17 Produktion mittels ELISpot Assay ermittelt. Dargestellt sind die einzelnen Werte mit dem klinischen Score von n=7 Mäusen und die Mittelwerte (rote Linie) aus vier unabhängigen Experimenten Signifikante Unterschiede sind mit Sternen gekennzeichnet (\* p < 0,05; \*\* p < 0,01).

Eine deutliche IL-17 Sekretion hatte wiederum die Stimulation mit Lektinen zur Folge. Nach Stimulation mit Lektin von *P.aeruginosa* und Con A konnten statistisch hoch signifikant erhöhte IL-17 Ausschüttungen nachgewiesen werden (Abb. 3.70). Nach Restimulation mit MOG<sub>35-55</sub>-Peptid konnte lediglich nach Stimulation mit LPS eine statistisch signifikante erhöhte IL-17 Sekretion detektiert werden.



**Abbildung 3.71: Einfluss von hitze-getöteten Bakterien auf die IL-17 Produktion von isolierten CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus EAE-Mäusen.** CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurden mittels MACS-Separation aus Milzzellen von EAE-Mäusen (Tag 15 nach Immunisierung) isoliert, zu 10<sup>5</sup>-Zellen pro well ausgesät und mit 10<sup>8</sup>/ml HKPA, HKEB, HKPG und HKSA in Kombination mit MOG<sub>35-55</sub>-Restimulation (20 µg/ml) stimuliert. Nach 48 h Inkubationszeit wurde die IL-17 Produktion mittels ELISpot Assay ermittelt. Dargestellt sind die einzelnen Werte mit dem klinischen Score von n=5 Mäusen und die Mittelwerte (rote Linie) aus drei unabhängigen Experimenten.



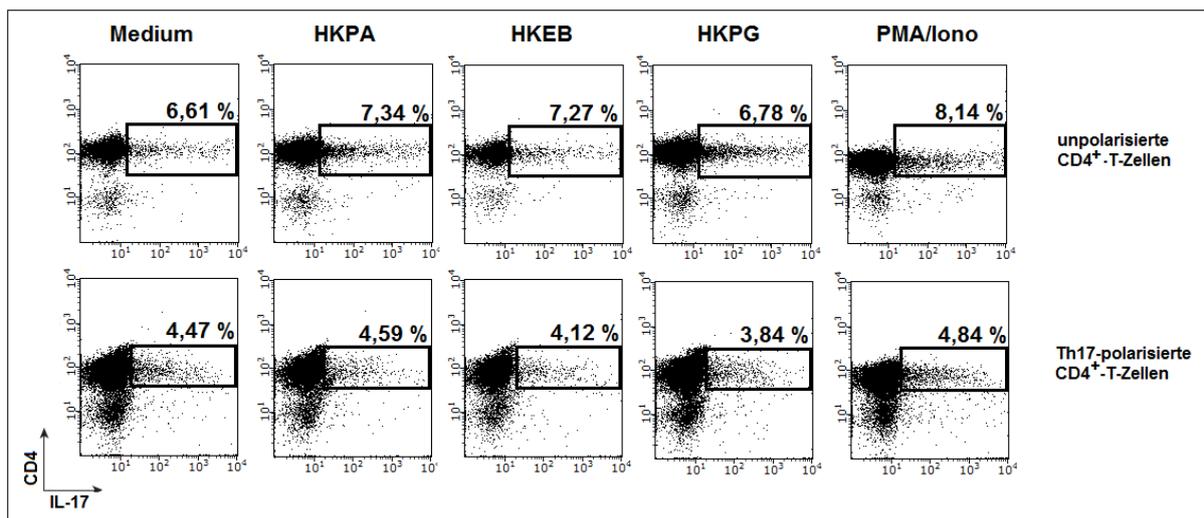
**Abbildung 3.72: Einfluss von bakteriellen Bestandteilen auf die IL-17 Produktion von isolierten CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus EAE-Mäusen.** CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurden mittels MACS-Separation aus Milzzellen von EAE-Mäusen (Tag 15 nach Immunisierung) isoliert, zu 10<sup>5</sup>-Zellen pro well ausgesät und mit LPS-PA (1 µg/ml), PGN-EK (5 µg/ml), Lektin (1 µg/ml), Con A (1 µg/ml), Curdlan (100 µg/ml) und Exo A (1 µg/ml) in Kombination mit MOG<sub>35-55</sub>-Restimulation (20 µg/ml) stimuliert. Nach 48 h Inkubationszeit wurde die IL-17 Produktion mittels ELISpot Assay ermittelt. Dargestellt sind die einzelnen Werte mit dem klinischen Score von n=5 Mäusen und die Mittelwerte (rote Linie) aus drei unabhängigen Experimenten. Signifikante Unterschiede sind mit Sternen gekennzeichnet (\* p < 0,05).

Hinsichtlich der CD8<sup>+</sup>- T-Zellen konnte keine erhöhte IL-17 Sekretion nach Stimulation mit hitze-getöteten Bakterien beobachtet werden (Abb. 3.71). Auch nach Restimulation mit MOG<sub>35-55</sub>-Peptid konnte lediglich nach Stimulation mit HKEB leicht erhöhte, statistisch jedoch nicht signifikante IL-17 Ausschüttungen detektiert werden.

Wie bei den CD4<sup>+</sup>- T-Zellen, führte Stimulation mit Lektin und Con A zu einer statistisch signifikant erhöhten IL-17 Ausschüttung von CD8<sup>+</sup>- T-Zellen (Abb. 3.72). Für alle anderen getesteten Zellwandbestandteile konnte auch mit zusätzlicher MOG<sub>35-55</sub>-Restimulation keine erhöhten IL-17 Sekretionen nachgewiesen werden.

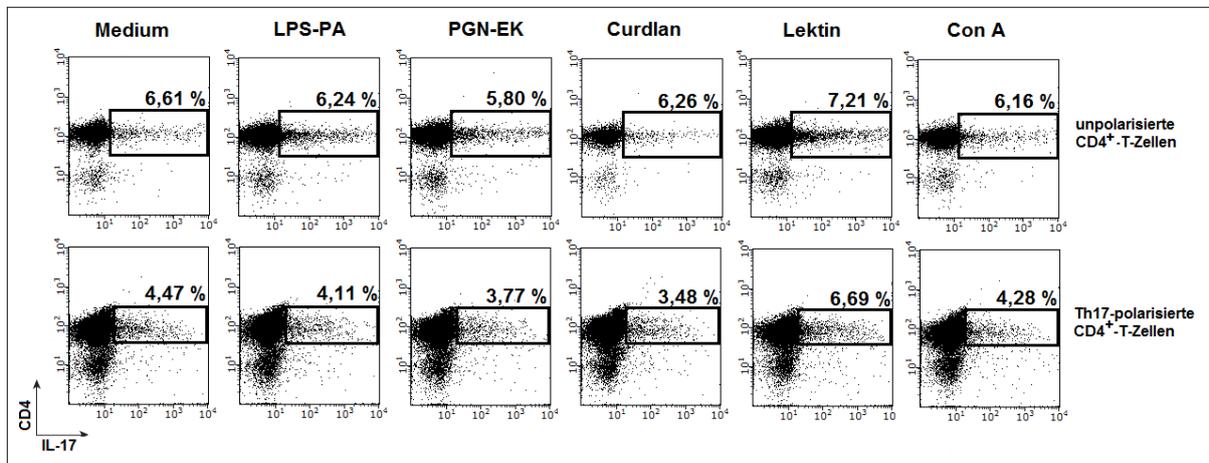
### 3.3.4 Einfluss auf die IL-17 Konzentration von CD4<sup>+</sup>- T-Zellen und MOG-spezifischen Th17-Zellen

Für alle getesteten Bakterien konnte nach Stimulation ein Anstieg der intrazellulären IL-17 Konzentration von CD4<sup>+</sup>- T-Zellen nachgewiesen werden (Abb. 3.73). Nach 5 Tagen Th17-Polarisierung konnte hingegen eine geringere Zahl der IL-17-produzierenden Zellen detektiert werden. Auch hatte die Stimulation mit Bakterien keinen Anstieg der IL-17 Konzentration von MOG<sub>35-55</sub>-spezifischen Th17-polarisierten Zellen zur Folge.



**Abbildung 3.73: Intrazelluläre IL-17 Färbung von CD4<sup>+</sup>- T-Zellen und Th17-polarisierten CD4<sup>+</sup>- T-Zellen nach Stimulation mit Bakterien.** CD4<sup>+</sup>-T-Zellen, isoliert aus Milzzellen von EAE Mäusen (Tag 15 nach Immunisierung) wurden für 5 h mit MOG<sub>35-55</sub> (20 µg/ml) und 10<sup>8</sup>/ml HKPA, HKEB, HKPG und PMA/Iono (50 ng/ml, 1 µg/ml) stimuliert oder 5 Tage unter Th17-Bedingungen mit MOG<sub>35-55</sub> (20 µg/ml) kultiviert und darauf für 5 h stimuliert. 4 h vor Ende der Restimulationszeit wurde Brefeldin A zu den Zellen gegeben. Nach Färbung mit *Fixable Viability Dye*® 660 wurden die Oberflächen mit CD4, sowie das Zytokine IL-17 gefärbt und durchflusszytometrisch bestimmt. Dargestellt sind die IL-17<sup>+</sup>- Zellen in Prozent als *frequency of parent* bezogen auf CD4<sup>+</sup>- T-Zellen nach dem Ausschluss toter Zellen. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment (Score = 2,5).

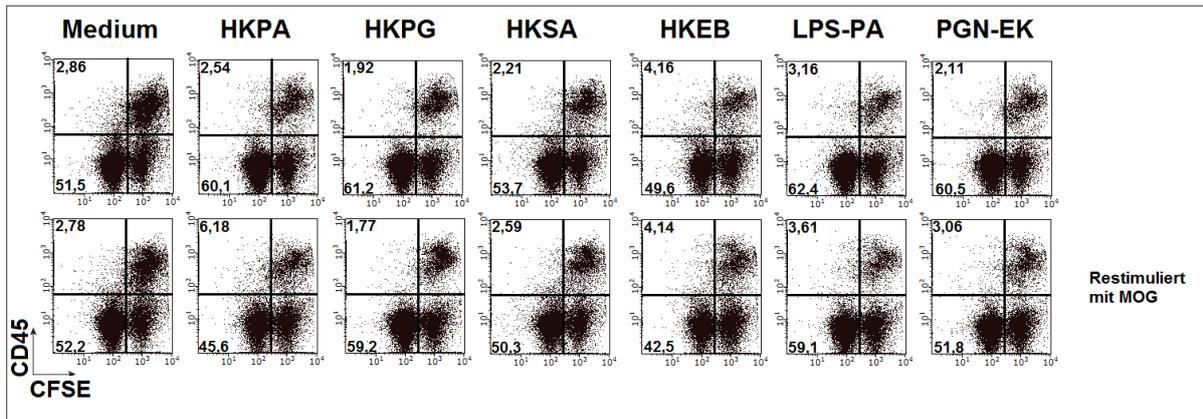
Im Gegensatz zur Stimulation mit Bakterien konnte lediglich nach Stimulation mit Lektin eine erhöhte IL-17 Konzentration von MOG<sub>35-55</sub>-spezifischen CD4<sup>+</sup>- T-Zellen beobachtet werden (Abb. 3.74). Auch nach 5 Tagen Th17-Polarisierung führte lediglich Stimulation mit Lektin zu einem Anstieg der IL-17 Konzentration von MOG<sub>35-55</sub>-spezifischen Th17-Zellen.



**Abbildung 3.74: Intrazelluläre IL-17-Färbung von CD4<sup>+</sup>- T-Zellen und Th17-polarisierten CD4<sup>+</sup>- T-Zellen nach Stimulation mit bakteriellen Bestandteilen.** CD4<sup>+</sup>- T-Zellen, isoliert aus Milzzellen von EAE Mäusen (Tag 15 nach Immunisierung) wurden für 5 h mit MOG<sub>35-55</sub> (20 µg/ml) und LPS-PA (1 µg/ml), PGN-EK (5 µg/ml), Curdlan AL (100 µg/ml), Lektin (1 µg/ml), Con A (1 µg/ml) und PMA/Iono (50 ng/ml, 1 µg/ml) stimuliert oder 5 Tage unter Th17-Bedingungen mit MOG<sub>35-55</sub> (20 µg/ml) kultiviert und daraufhin für 5 h stimuliert. 4 h vor Ende der Restimulationszeit wurde Brefeldin A zu den Zellen gegeben. Nach Färbung mit *Fixable Viability Dye® 660* wurden die Oberflächen mit CD4, sowie das Zytokine IL-17 gefärbt und durchflusszytometrisch bestimmt. Dargestellt sind die IL-17<sup>+</sup>- Zellen in Prozent als *frequency of parent* bezogen auf CD4<sup>+</sup>- T-Zellen nach dem Ausschluss toter Zellen. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment (Score = 2,5).

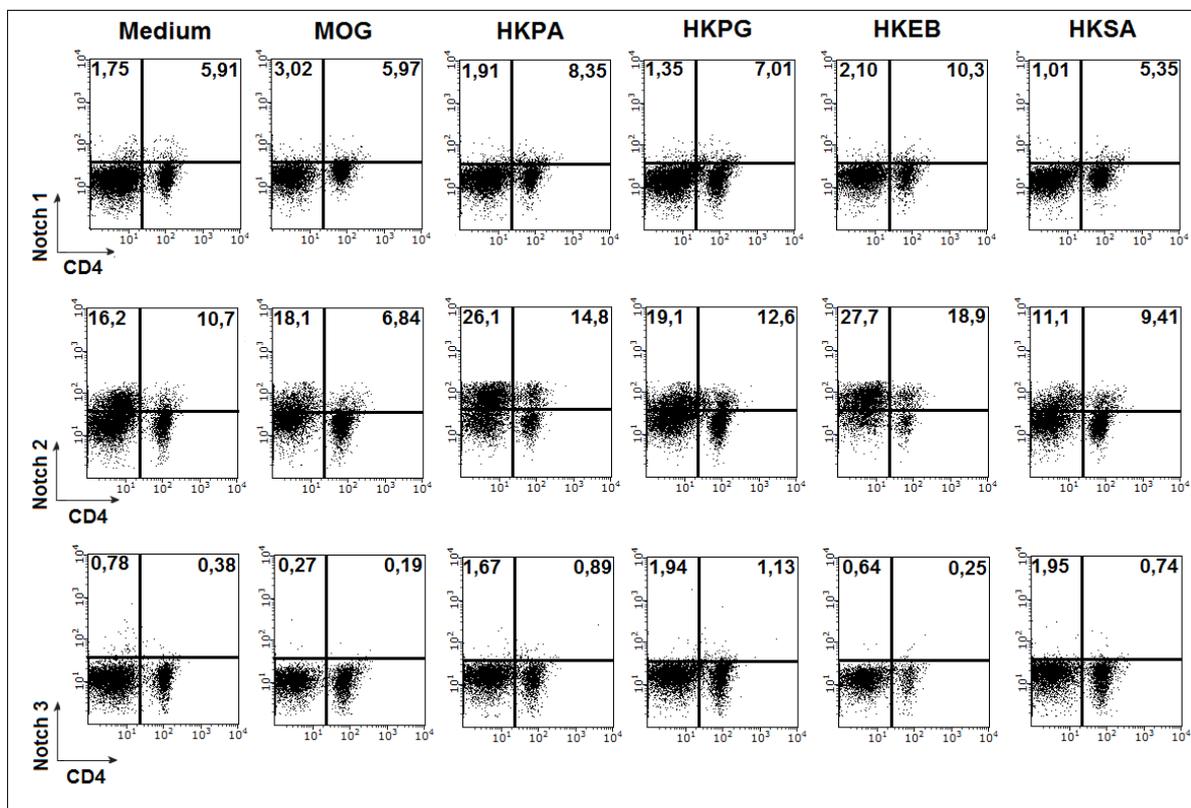
### 3.3.5 Einfluss auf die Zellproliferation von Milzzellen aus EAE-Tieren

Lediglich nach Stimulation mit HKEB (4,16 %) und LPS (3,16 %) konnte eine leicht erhöhte Proliferation von CD45<sup>+</sup>- Zellen im Vergleich zur Kontrolle (2,86 %) nachgewiesen werden (Abb. 3.75). Eine zusätzliche Restimulation mit MOG<sub>35-55</sub>-Peptid führte hingegen zur einer gesteigerten Proliferation von CD45<sup>+</sup>- Zellen nach Stimulation mit HKPA (6,18 %), HKEB (4,14 %) und LPS (3,61 %) im Vergleich zur Kontrolle (2,78 %). Zudem konnte ein proliferationsfördernder Effekt auf CD45<sup>-</sup>- Zellen nach Einfluss von HKPA (60,1 %), HKPG (61,2 %), LPS (62,4 %) und PGN-EK (60,5 %) beobachtet werden. Eine zusätzliche Restimulation mit MOG<sub>35-55</sub>-Peptid hatte hingegen keinen Einfluss auf die CD45<sup>-</sup>- Zellpopulation.



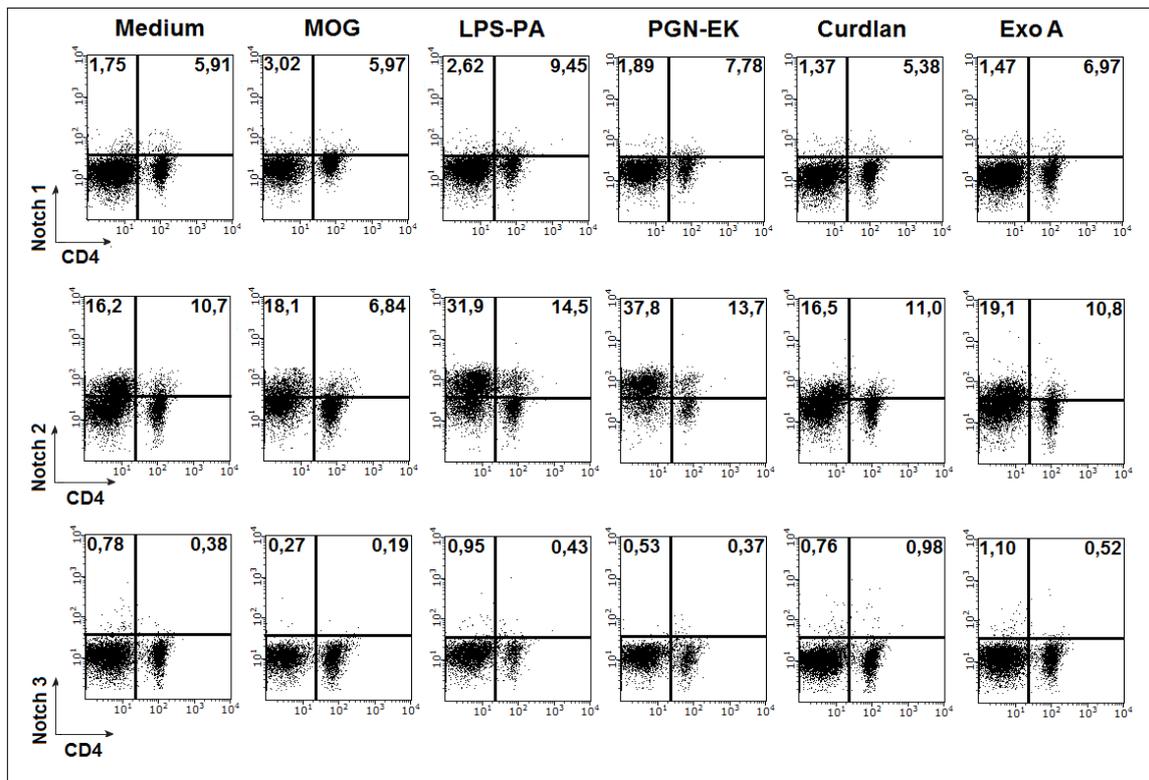
**Abbildung 3.75: Messung der Proliferation nach Stimulation mit hitze-getöteten Bakterien und Zellwandbestandteilen.** Milzzellen von EAE-Mäusen (Tag 15 nach Immunisierung) wurden mit CFSE gefärbt und für 72 h mit  $10^8$ /ml HKPA, HKPG, HKSA, HKEB, LPS-PA (1  $\mu$ g/ml) und PGN-EK (1  $\mu$ g/ml) in Kombination mit MOG<sub>35-55</sub> (20  $\mu$ g/ml) stimuliert. Nach Färbung der Oberflächen mit CD45 wurden die Proben durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt ist die Proliferationsrate von CD45<sup>+</sup>- und CD45<sup>-</sup>- Milzzellen in Prozent als *frequency of parent* bezogen auf alle Zellen. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment (Score = 2,5).

### 3.3.6 Beeinflussung der Notch-Rezeptoren von Milzzellen aus EAE-Tieren



**Abbildung 3.76: Analyse der Notch Oberflächenrezeptoren 1-3 nach dem Einfluss von Bakterien.** Milzzellen von EAE-Mäusen (Tag 15 nach Immunisierung) wurden für 48 h mit MOG<sub>35-55</sub> (20  $\mu$ g/ml) und  $10^8$ /ml HKPA, HKPG, HKEB und HKSA stimuliert. Nach Färbung der Oberflächen mit CD4, CD8 und Notch 1-3 wurden die Proben durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt sind die CD4<sup>+</sup>- T-Zellen, die Notch<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>- und Notch<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>- Zellen in Prozent als *frequency of parent* bezogen auf alle Zellen. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment (Score = 2,5).

Wie in Abb. 3.76 dargestellt, konnte nach Stimulation mit HKPA (8,35 %), HKPG (7,01 %) und HKEB (10,3 %) ein Anstieg der Notch1<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>- Zellen im Vergleich zur Kontrolle (5,91 %) nachgewiesen werden. Zudem konnte eine Erhöhung der Notch2<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>- Zellen nach Stimulation mit HKPA (14,8 %), HKPG (12,6 %) und HKEB (18,9 %) im Vergleich zur Kontrolle (10,7 %) und eine Erhöhung der Notch2<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>- Zellen nach Stimulation mit HKPA (26,1 %) und HKEB (27,7 %) im Vergleich zur Kontrolle (16,2 %) ermittelt werden. Dahingegen konnte keine Beeinflussung der Notch3<sup>+</sup>- Zellen durch den Einfluss aller getesteter Bakterien detektiert werden.

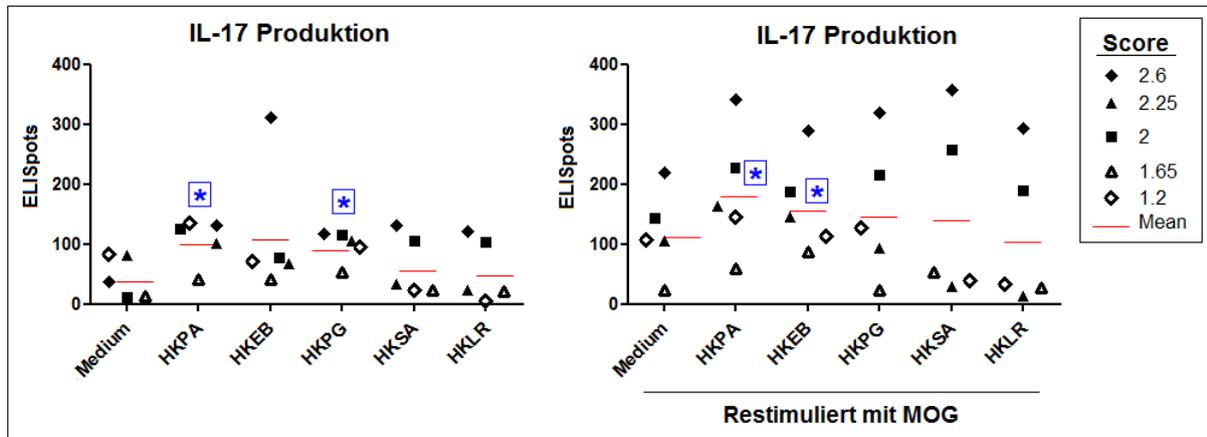


**Abbildung 3.77: Analyse der Notch Oberflächenrezeptoren 1-3 nach dem Einfluss von bakteriellen Bestandteilen.** Milzzellen von EAE-Mäusen (Tag 15 nach Immunisierung) wurden für 48 h mit mit MOG<sub>35-55</sub> (20 µg/ml) und LPS-PA (1 µg/ml), PGN-EK (5 µg/ml), Curdlan (100 µg/ml), und Exo A (1 µg/ml) stimuliert. Nach Färbung der Oberflächen mit CD4, CD8 und Notch 1-4 wurden die Proben durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt sind die CD4<sup>+</sup>- T-Zellen, die Notch<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>- und Notch<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>- Zellen in Prozent als *frequency of parent* bezogen auf alle Zellen. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment (Score = 2,5).

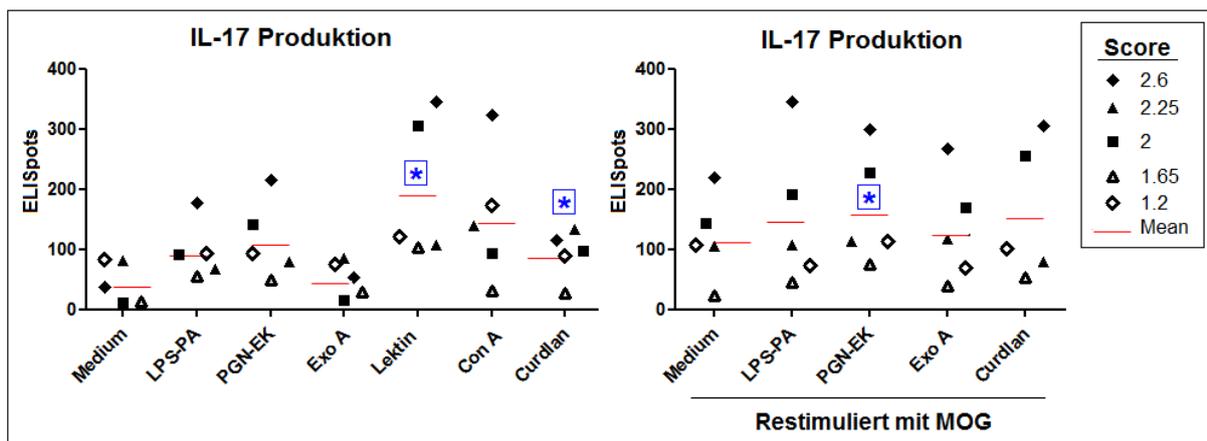
Nach Stimulation mit LPS (9,45 %), PGN-EK (7,78 %) und Exo A (6,97 %) konnte eine erhöhte Anzahl an Notch1<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>- T-Zellen im Vergleich zur Kontrolle (5,91 %) beobachtet werden (Abb. 3.77). Des Weiteren konnte eine erhöhte Anzahl Notch2<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>- T-Zellen nach Stimulation mit LPS (14,5 %) und PGN-EK (13,7 %) im Vergleich zur Kontrolle (10,7 %) nachgewiesen. Stimulation mit LPS (31,9 %) und PGN-EK (37,8 %) hatte zudem einen Anstieg der Notch2<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>- Zellen im Vergleich zur Kontrolle (16,2 %) zur Folge. Zudem konnte keine Beeinflussung der Notch3<sup>+</sup>- Zellen detektiert werden.

### 3.3.7 Einfluss auf die IL-17 Produktion von ZNS-Zellen aus EAE Tieren

Zur näheren Untersuchung des Einflusses von Bakterien und bakteriellen Bestandteilen auf ZNS-infiltrierende Zellen wurde das Rückenmark von EAE-Tieren isoliert und *in vitro* stimuliert. Wie in Abb. 3.78 dargestellt konnten statistisch signifikant erhöhte IL-17 Sekretionen nach Stimulation mit HKPA und HKPG detektiert werden.



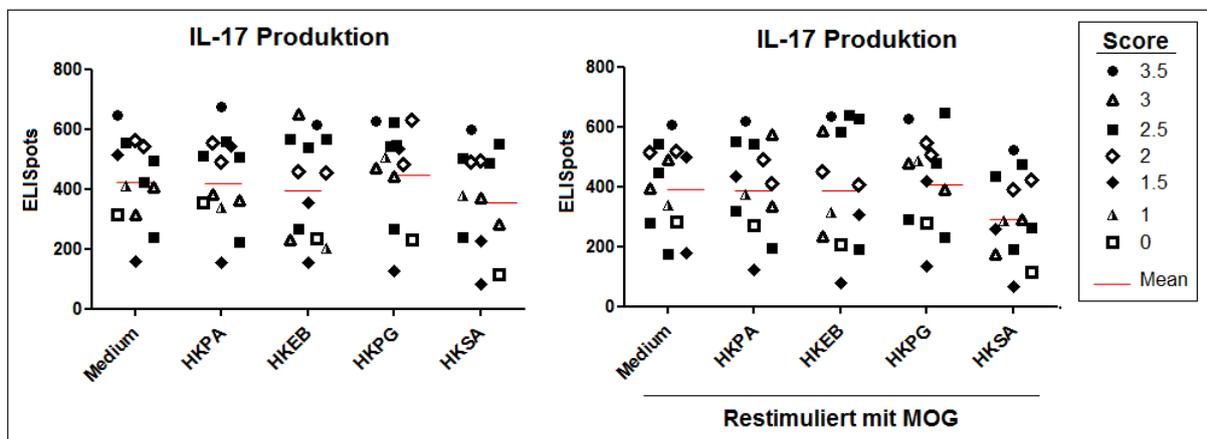
**Abbildung 3.78: Einfluss von Bakterien auf die IL-17 Produktion von isolierten ZNS-Zellen aus EAE-Mäusen.** Das Rückenmark von jeweils 4 EAE-Mäusen (Tag 15 nach Immunisierung) wurde isoliert und mit  $10^8$ /ml HKPA, HKEB, HKPG, HKSA und HKLR  $\pm$  20  $\mu$ g/ml MOG<sub>35-55</sub> stimuliert. Nach 24 h Inkubationszeit wurde die IL-17 Produktion mittels ELISpot Assay ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte von n=5 EAE-Mäusen mit dem durchschnittlichen klinischen Score und die daraus resultierenden Mittelwerte (rote Linie) aus fünf unabhängigen Experimenten. Signifikante Unterschiede sind mit Sternchen gekennzeichnet (\* p < 0,05).



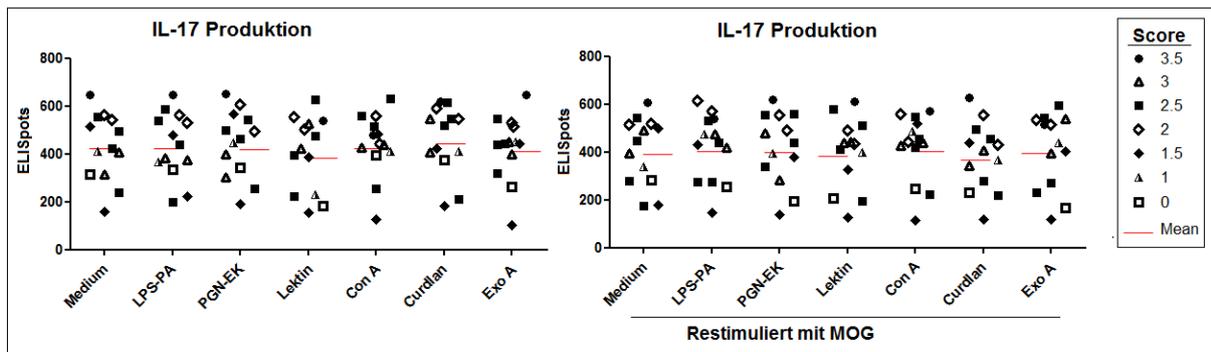
**Abbildung 3.79: Einfluss von bakteriellen Bestandteilen auf die IL-17 Produktion von isolierten ZNS-Zellen aus EAE-Mäusen.** Das Rückenmark von jeweils 4 EAE-Mäusen (Tag 15 nach Immunisierung) wurde isoliert und mit LPS-PA (1  $\mu$ g/ml), PGN-EK (5  $\mu$ g/ml), Exo A (1  $\mu$ g/ml), Lektin (1  $\mu$ g/ml), Con A (1  $\mu$ g/ml) und Curdlan (100  $\mu$ g/ml)  $\pm$  20  $\mu$ g/ml MOG<sub>35-55</sub> stimuliert. Nach 24 h Inkubationszeit wurde die IL-17 Produktion mittels ELISpot ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte von n=4 EAE-Mäusen mit dem durchschnittlichen klinischen Score und die daraus resultierenden Mittelwerte (rote Linie) aus fünf unabhängigen Experimenten. Signifikante Unterschiede sind mit Sternchen gekennzeichnet (\* p < 0,05).

Restimulation mit MOG<sub>35-55</sub>-Peptid hatte zudem statistisch signifikant erhöhte IL-17 Ausschüttungen nach Stimulation mit HKPA und HKEB zur Folge. Dahingegen konnte für alle getesteten bakteriellen Bestandteile eine erhöhte IL-17 Sekretion nachgewiesen werden, statistisch signifikant jedoch nur nach Stimulation mit Lektin und Curdlan (Abb. 3.79). Nach gleichzeitiger Restimulation mit MOG<sub>35-55</sub>-Peptid konnte zudem nach Stimulation mit PGN-EK eine statistisch signifikant erhöhte IL-17 Sekretion beobachtet werden.

Nach Verdauung des Rückenmarks von EAE-Mäusen mit Collagenase D/DNase und anschließender Isolation der mononukleären Zellen wurde erneut der Einfluss von Bakterien und bakteriellen Bestandteilen hinsichtlich der IL-17 Sekretion untersucht. Weder Stimulation mit Bakterien (Abb. 3.80), noch mit bakteriellen Bestandteilen (Abb. 3.81) hatte eine erhöhte IL-17 Sekretion im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle zur Folge, auch nicht nach zusätzlicher Restimulation mit MOG<sub>35-55</sub>-Peptid. Allerdings konnten deutlich höhere Spotzahlen nach der Gewebeverdauung im Vergleich zu unverdaulichem Rückenmark detektiert werden.

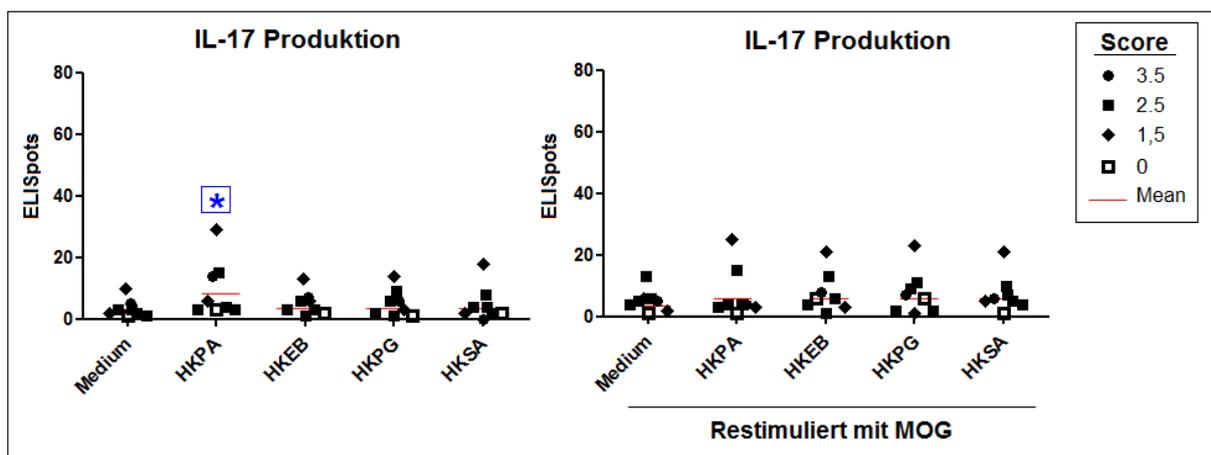


**Abbildung 3.80: Einfluss von Bakterien auf die IL-17 Produktion von Rückenmark infiltrierenden Zellen aus EAE-Mäusen.** Das Rückenmark von EAE-Mäusen (Tag 15 nach der Immunisierung) wurde isoliert und mit Collagenase D/DNase verdaut. Nach Aufreinigung mittels Percoll-Lösung wurden die isolierten Zellen mit  $10^8$ /ml HKPA, HKEB, HKPG und HKSA  $\pm$  20  $\mu$ g/ml MOG<sub>35-55</sub> stimuliert. Nach 24 h wurde die IL-17 Produktion mittels ELISpot ermittelt. Dargestellt sind die einzelnen Werte mit dem klinischen Score von n=14 Mäusen und die Mittelwerte (rote Linie) aus vier unabhängigen Experimenten.

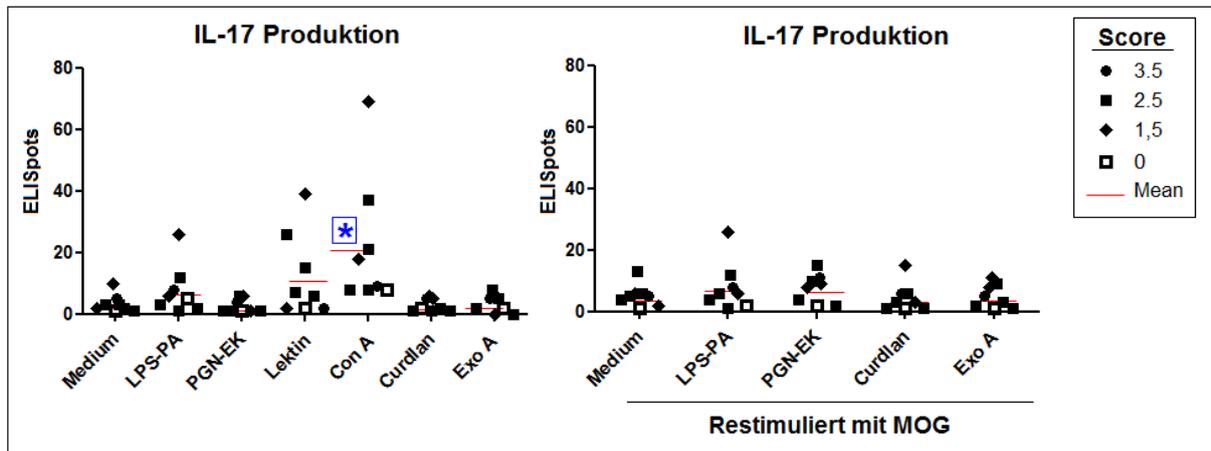


**Abbildung 3.81: Einfluss von bakteriellen Bestandteilen auf die IL-17 Produktion von Rückenmark infiltrierenden Zellen.** Das Rückenmark von EAE-Mäusen (Tag 15 nach der Immunisierung) wurde isoliert und mit Collagenase D/DNase verdaut. Nach Aufreinigung mittels Percoll-Lösung wurde die Zellen mit LPS-PA (1  $\mu\text{g/ml}$ ), PGN-EK (5  $\mu\text{g/ml}$ ), Exo A (1  $\mu\text{g/ml}$ ), Lektin (1  $\mu\text{g/ml}$ ), Con A (1  $\mu\text{g/ml}$ ) und Curdlan (100  $\mu\text{g/ml}$ )  $\pm$  20  $\mu\text{g/ml}$  MOG<sub>35-55</sub> stimuliert. Nach 24 h wurde die IL-17 Produktion mittels ELISpot ermittelt. Dargestellt sind die einzelnen Werte mit dem klinischen Score von n=14 Mäusen und die Mittelwerte (rote Linie) aus vier unabhängigen Experimenten.

Nach Verdauung des Gehirns von EAE-Mäusen mit Collagenase D/DNase und anschließender Isolation der mononukleären Zellen konnte *in vitro* lediglich nach Stimulation mit HKPA (Abb. 3.82) und Con A (Abb. 3.83) eine leichte, statistisch signifikant erhöhte IL-17 Sekretion detektiert werden. Gleichzeitige Restimulation mit MOG<sub>35-55</sub>-Peptid zeigte auch hier keine Wirkung.



**Abbildung 3.82: Einfluss von hitze-getöteten Bakterien auf die IL-17 Produktion von Gehirn infiltrierenden Zellen aus EAE-Mäusen.** Das Gehirn von EAE-Mäusen (Tag 15 nach der Immunisierung) wurde isoliert und mit Collagenase D/DNase verdaut. Nach Aufreinigung mittels Percoll-Lösung wurden die isolierten Zellen mit  $10^8$ /ml HKPA, HKEB, HKPG und HKSA  $\pm$  20  $\mu\text{g/ml}$  MOG<sub>35-55</sub> stimuliert. Nach 24h wurde die IL-17 Produktion mittels ELISpot Assay ermittelt. Dargestellt sind die einzelnen Werte mit dem klinischen Score von n=8 Mäusen und die Mittelwerte (rote Linie) aus vier unabhängigen Experimenten.



**Abbildung 3.83: Einfluss von bakteriellen Bestandteilen auf die IL-17 Produktion von Gehirn infiltrierenden Zellen aus EAE-Mäusen.** Das Gehirn von EAE-Mäusen (Tag 15 nach der Immunisierung) wurde isoliert und mit Collagenase D/DNase verdaut. Nach Aufreinigung mittels Percoll-Lösung wurde die isolierten Zellen mit LPS-PA (1  $\mu\text{g/ml}$ ), PGN-EK (5  $\mu\text{g/ml}$ ), Exo A (1  $\mu\text{g/ml}$ ), Lektin (1  $\mu\text{g/ml}$ ), Con A (1  $\mu\text{g/ml}$ ) und Curdlan (100  $\mu\text{g/ml}$ )  $\pm$  20  $\mu\text{g/ml}$  MOG<sub>35-55</sub> stimuliert. Nach 24 h Inkubationszeit wurde die IL-17 Produktion mittels ELISpot Assay ermittelt. Dargestellt sind die einzelnen Werte mit dem klinischen Score von n=8 Mäusen und die Mittelwerte (rote Linie) aus vier unabhängigen Experimenten.

## 4. Diskussion

Im Zuge einer bakteriellen Infektion kommt es zur Freisetzung von inflammatorischen Zytokinen. Die Sekretion von IL-17 wird überwiegend mit Autoimmunerkrankungen wie MS und rheumatoide Arthritis oder mit Entzündungserkrankungen wie der bakteriellen Sepsis in Verbindung gebracht [66, 258]. Allerdings wird auch eine protektive Rolle gegenüber Bakterien und entarteten Zellen postuliert [259]. Die Pathogenese der Sepsis ist bisher nicht vollständig verstanden, jedoch kommt es zu einer Entzündungsreaktion des Körpers, die in einer Ausschüttung pro- und antiinflammatorischer Zytokine resultiert [195].

### 4.1 Einfluss auf die Zytokinproduktion von Thymuszellen

Ein Teil dieser Arbeit befasste sich mit der Untersuchung des Einflusses von Bakterien und bakteriellen Bestandteilen auf die Zytokinproduktion von Thymuszellen, mit besonderem Fokus auf IL-17. Der Thymus stellt ein primäres lymphatisches Organ dar, in dem sich Stammzellen zu unreifen T-Zellen entwickeln. Die Existenz von IL-17-produzierenden Thymuszellen konnte durch einige Studien bestätigt werden [249, 250]. Die Mehrheit dieser Thymuszellen sind CD4<sup>+</sup>- Zellen, die unmittelbar ohne weitere Vorbereitungsphase auf Stimuli reagieren können [250, 260, 261]. Zudem konnte gezeigt werden, dass IL-17 auch schon bei der Initiation von Immunreaktionen durch Zellen des angeborenen Immunsystems produziert werden kann [259]. Im Rahmen einer Sepsis, einer systemischen Entzündungsreaktion des Körpers auf eine bakterielle Infektion, konnte eine Atrophie des Thymus und eine erhöhte Apoptoserate von Thymuszellen beobachtet werden [262, 263].

#### 4.1.1 Bakterien

Die verwendeten Bakterien wurden in vier Kategorien unterteilt: Gram-Färbung, Pathogenität für Menschen, Lokalisation und Zellatmung. Da die T-Zell-Aktivierung normalerweise durch Interaktion des TZR mit Antigenen, präsentiert über den MHC-II-Komplex von APZ initiiert wird, wurde zur Aktivierung von Thymuszellen ein löslicher  $\alpha$ -CD3 Antikörper verwendet [38, 39]. Der Einfluss von APZ auf die IL-17 Sekretion konnte mit zwei verschiedenen TLR-Liganden bestätigt werden (siehe Anhang). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die IL-17 Produktion nicht abhängig von der Pathogenität der bakteriellen Organismen ist. So führte der Einfluss von nicht-pathogen Organismen (*L. rhamnosus*), auf dem menschlichen Körper vorkommenden Organismen (*E. coli*. und *S. aureus*) und leicht pathogenen Bakterien (*P. gingivalis*) gleichermaßen zu einer erhöhten IL-17 Sekretion wie der Einfluss von stark pathogenen Bakterien (*P. aeruginosa* und *L. pneumophila*). Auch korrelierten die IL-6

Sekretionen nach Einfluss von *P.aeruginosa* und *L. pneumophila* mit dem Grad der Pathogenität, jedoch nicht nach Einfluss von *S. pneumoniae*. Im Gegensatz dazu hatte der Einfluss von nicht-pathogenen Bakterien (*E. coli*) auch erhöhte IL-6 Ausschüttung zur Folge. IL-6 führt zur Produktion von Akutphaseproteinen in der Leber und gilt als wichtiger Regulator von Entzündungsreaktionen [70, 99, 102]. Daraus kann geschlossen werden, dass die Zytokinsekretion von Thymuszellen nicht durch den Grad der Pathogenität von Bakterien wiedergespiegelt wird. Zudem ist die Anwesenheit von IL-6 ein entscheidender Faktor bei der Differenzierung von Th17-Zellen [264]. Hier konnte jedoch gezeigt werden, dass die IL-17 Sekretion von Thymuszellen nicht von gleichzeitiger IL-6 Sekretion abhängig ist. Dies korreliert mit einer Studie, in der eine IL-17 Sekretion von Thymuszellen von IL-6 KO-Mäusen nach Stimulation mit TLR-Liganden nachgewiesen werden konnte [265].

Des Weiteren konnte keine Relation zwischen der IL-17 Ausschüttung von Thymuszellen und der Art der Zellatmung (aerob, anaerob oder fakultativ anaerob) festgestellt werden. Allerdings führte Stimulation mit aeroben Bakterien (*P. aeruginosa*, *L. pneumophila*) zu erhöhter IL-6 und IFN- $\gamma$  Sekretion. Zudem gibt es keinen Zusammenhang zwischen der zellulären Lokalisation und der Zytokinsekretion von Thymuszellen.

Bei genauerer Betrachtung des Gram-Status so wird deutlich, dass der Einfluss von gram-negativen Bakterien (*H. pylori*, *L. pneumophila*, *P. aeruginosa*, *E. coli*) zu höheren IFN- $\gamma$  und IL-6 Sekretionen führt als Stimulation mit gram-positiven Bakterien (*L. monocytogenes*, *L. rhamnosus*, *S. aureus*). Übereinstimmend mit diesen Beobachtungen konnte in Studien gezeigt werden, dass bei einer Sepsis durch gram-negative Bakterien höhere Mengen inflammatorischer Zytokine ausgeschüttet werden, als bei einer durch gram-positive Bakterien [266, 267]. Dahingegen konnte keine Relation zwischen dem Gram-Status und der IL-17 Sekretion festgestellt werden. Gram-negative Bakterien verfügen über eine dünne, einschichtige Mureinhülle und enthalten keine Lipoteichonsäuren. Gram-positive Bakterien hingegen besitzen eine dicke mehrschichtige Mureinhülle mit hohem Gehalt an Lipoteichonsäuren [268]. Dies deutet darauf hin, dass die Zusammensetzung der Zellwand bedeutenden Einfluss auf die Zytokinproduktion von Thymuszellen hat.

Einen entscheidenden Einfluss auf die Zytokinproduktion hat die Konzentration des Bakteriums. So führte Stimulation mit höheren Konzentrationen von *P. aeruginosa* auch zu erhöhten IL-6 und IL-17 Sekretionen (IFN- $\gamma$  nur nach Aktivierung mit  $\alpha$ -CD3). Auch hinsichtlich der verwendeten Mausspezies konnten Unterschiede bezüglich der Zytokinsekretion beobachtet werden. So konnten nach Stimulation von Thymuszellen von BALB/c Mäusen deutlich höhere Spotzahlen für IL-17 detektiert werden als in SJL- und

C57.BL/6 Mäusen. Auch war die IFN- $\gamma$  Sekretion in SJL-Mäuse deutlich vermindert. Bei BALB/c Mäusen handelt es sich um einen Th2-beeinflussten Mausstamm, wohingegen C57.BL/6 Mäuse einen Th1-beeinflussten genetischen Hintergrund aufweisen [269, 270]. Dies deutet darauf hin, dass sich der genetische Hintergrund der verwendeten Mausstämme auf die IL-17 Sekretion von Thymuszellen auswirkt.

Die verwendeten Bakterien werden durch das Immunsystem über den TLR2 erkannt. Anschließend kommt es MyD88-abhängig zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B, was in einer Ausschüttung inflammatorischer Zytokine resultiert [4, 123]. So konnte nach Stimulation mit *P.aeruginosa* eine erhöhte Expression von NF- $\kappa$ B in Thymuszellen nachgewiesen werden. Zudem konnten in Folge der Stimulation deutlich erhöhte Genexpressionsraten von IL-17 mRNA beobachtet werden, die durch eine zusätzliche Aktivierung des TLR2 nochmals deutlich verstärkt wurden. Eine erhöhte Expression des IL-17R konnte hingegen nicht nachgewiesen werden. Interessanterweise konnte lediglich eine minimal gesteigerte Genexpression von TLR2, MyD88 und NALP3 nach Stimulation mit *P.aeruginosa* ermittelt werden. Dies deutet darauf hin, dass die zellulären Bestandteile und Proteine, die zur Erkennung von Bakterien nötig sind bereits zur Verfügung stehen und direkt aktiviert werden können.

IFN- $\gamma$  wird hauptsächlich von CD4<sup>+</sup>-Thymuszellen produziert. Darunter befinden sich sowohl die CD4<sup>+</sup>-, als auch die CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>- Thymuszellen. Zudem führte die Stimulation mit grampositiven Bakterien (insbesondere *L.rhamnosus*) zu einer Depletion der CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-, jedoch nicht der CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>- Thymuszellen. Nach einer Aktivierung mit  $\alpha$ -CD3 hatte die Stimulation mit Bakterien erhöhte IL-17 Sekretionen zur Folge. Dabei konnten die CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>- Thymuszellen als Hauptproduzenten von IL-17 (über 50 %) identifiziert werden, jedoch sind auch CD4<sup>+</sup>-, CD8<sup>+</sup>- und CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>- Thymozyten zur IL-17 Sekretion befähigt. Daraus kann geschlossen werden, dass alle Subpopulationen des Thymus auf bakterielle Stimuli reagieren können und somit in der Lage sind innerhalb kurzer Zeit eine Immunreaktion einzuleiten.

IFN- $\gamma$  wird überwiegend von T-Zellen und NK-Zellen gebildet und stellt einen wichtigen Regulator von Mechanismen der angeborenen Immunität dar [51, 271]. Dahingegen kann IL-6 neben T-Zellen auch von den Zellen des angeborenen Immunsystems, wie z.B. Makrophagen, DZ, Granulozyten oder B-Zellen sekretiert werden [272]. Die Hauptproduzenten von IL-17 sind die Th17-Zellen, allerdings können auch NK-Zellen,  $\gamma\delta$ T-Zellen, Granulozyten und LTi (*lymphoid tissue inducer*) - Zellen in Folge einer bakteriellen Infektion IL-17 sekretieren [104, 259]. In dieser Arbeit konnte nun gezeigt werden, dass auch die Zellen

des unreifen Immunsystems in der Lage sind, in Folge einer Aktivierung des TLR2 mit der Ausschüttung zahlreicher inflammatorischer Zytokine zu reagieren und dass die IFN- $\gamma$ - und IL-17-produzierenden Thymuszellen überwiegend CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> sind.

Auch die Proliferationsrate von CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>- Zellen konnte durch den Einfluss von Bakterien nicht gesteigert werden. Dies bestätigt, dass der Thymus über ein Zellrepertoire verfügt, das unmittelbar ohne weitere Reifung auf bakterielle Stimuli mit erhöhter IL-17 Sekretion reagieren kann [251, 261]. Natürlich vorkommende IL-17-produzierende Thymuszellen unterscheiden sich von konventionellen Th17-Zellen. Diese nTh17-Zellen erlangen ihre Effektorfunktion bereits während ihrer Entwicklung im Thymus und benötigen keinen weiteren Antigenkontakt wie z.B. naive CD4<sup>+</sup>- T-Zellen in der Peripherie [48, 250, 261, 273]. Die Signaltransduktion über die Notch-Rezeptoren ermöglicht die Zell-Zell-Kommunikation benachbarter Zellen [274]. Zudem konnte eine Beteiligung des Notch-Signalweges an der Entstehung von MS nachgewiesen werden [275]. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Stimulation mit Bakterien nicht zu einer erhöhten Anzahl Notch<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>- Zellen führte. Dahingegen hatte der Einfluss von Bakterien sogar eine Verminderung der Notch2<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>- Thymuszellen zur Folge. Durch eine Aktivierung des TLR2 mit Bakterien kommt es somit zu einer Senkung der Notch2<sup>+</sup>- Thymuszellen. Dies deutet darauf hin, dass durch Aktivierung des TLR2 die Kommunikation zwischen Thymuszellen beeinflusst wird.

#### 4.1.2 Zellwandbestandteile

Peptidoglycane sind wichtige Bestandteile der Mureinhülle sowohl gram-positiver, als auch gram-negativer Bakterien [276]. Die Stimulation von  $\alpha$ -CD3 aktivierten Thymuszellen mit Peptidoglycanen führte zu einer deutlich gesteigerten IL-17 Sekretion, unabhängig vom Gram-Status des Bakteriums. Allerdings konnte nur nach Stimulation mit einem Peptidoglycan von *E.coli*, einem gram-negativen Bakterium eine IL-17 Sekretion ohne weitere Aktivierung nachgewiesen werden. PGN werden von intrazellulären NOD-Rezeptoren erkannt und führen über Aktivierung von NF- $\kappa$ B zur Ausschüttung inflammatorischer Zytokine [211]. *In vitro* Stimulation mit PGN von Makrophagenkulturen hatte eine erhöhte Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine, wie IL-1, IL-6 und TNF- $\alpha$  zur Folge [277]. In dieser Arbeit konnte nun gezeigt werden, dass durch den Einfluss von PGN die IL-17 Sekretion von Thymuszellen gefördert wird.

Im Gegensatz dazu verläuft die Erkennung der LTA über den TLR2 [278]. Bei den getesteten Lipoteichonsäuren konnte ein deutlicher kostimulatorischer Effekt auf die IL-17 Sekretion beobachtet werden. Zudem hatte der Einfluss von LTA, im Gegensatz zu Stimulation mit

PGN eine Depletion von CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>- T-Zellen zur Folge. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass wie nach Stimulation mit Bakterien der Hauptanteil der IL-17-produzierenden Zellen der Subpopulation der CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>- Thymuszellen angehört (siehe Anhang). Nach Stimulation von humanen PMBC mit LTA von *S. aureus* konnte eine deutliche gesteigerte Sekretion inflammatorischer Zytokine nachgewiesen werden [279]. Hier konnte zudem gezeigt werden, dass die Stimulation mit verschiedenen LTA in einer erhöhten IL-17 Sekretion von Thymuszellen resultiert. Dies verdeutlicht, dass die IL-17 Sekretion von Thymuszellen nicht von einem bestimmten Signalweg abhängig ist, sondern das sowohl die Stimulation des TLR2, als auch des NOD-Rezeptors die Freisetzung von IL-17 auslösen kann. Stimulation mit Flagellin, einem auf der Zellwand von Bakterien fest verankertes Protein führt ebenso zu einer gesteigerten IL-17 Sekretion von  $\alpha$ -CD3 aktivierten Thymuszellen. Zudem führte Stimulation mit Flagellin zu einer erhöhten IL-4, IL-6, und IFN- $\gamma$  Freisetzung von aktivierten Thymuszellen. Flagellin wird als ein potenter Aktivator für verschiedene Immunantworten des angeboren und adaptiven Immunsystems beschrieben [280]. Im Gegensatz zu PGN und LTA wird extrazelluläres Flagellin über den TLR5 erkannt, und führt MyD88-abhängig zu einer Aktivierung von NF- $\kappa$ B [223]. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine Aktivierung des TLR5 mit Flagellin die Sekretion inflammatorischer Zytokine von Thymuszellen fördert.

Die Erkennung von LPS durch das Immunsystem verläuft über den TLR4 [281]. Nach Stimulation mit LPS konnte eine erhöhte IFN- $\gamma$  Sekretion von aktivierten Thymuszellen, insbesondere in BALB/c Mäusen beobachtet werden. Zudem führte die Stimulation mit LPS zu einer deutlich erhöhten IL-6 Sekretion in alle getesteten Mausstämmen. Während nach Stimulation mit LPS lediglich eine geringe Beeinflussung der IL-17 Sekretion in C57.BL/6 und BALB/c Mäusen nachgewiesen werden konnte, hatte eine zusätzliche Aktivierung mit  $\alpha$ -CD3 eine deutlich gesteigerte IL-17 Ausschüttung in allen getesteten Mausstämmen zur Folge. Nach Interaktion von LPS mit dem TLR4 folgt wie nach Stimulation des TLR2 eine MyD88-abhängige Aktivierung von NF- $\kappa$ B [220]. Es konnte gezeigt werden, dass die Stimulation mit LPS eine erhöhte Expression von NF- $\kappa$ B von Thymuszellen zur Folge hat. Zudem konnten in Folge der Stimulation mit LPS deutlich erhöhte Genexpressionsraten von IL-17 mRNA beobachtet werden, die durch eine zusätzliche Aktivierung des TLR2 nochmals deutlich verstärkt wurde. Interessanterweise konnte eine minimal gesteigerte Genexpression von TLR2, TLR4 und NALP3 durch Stimulation mit LPS nachgewiesen werden. Dies deutet darauf hin, dass der NALP3 Inflammasome-Komplex in der LPS induzierten Immunantwort eine Rolle spielt. In humanen PMBC und Makrophagen konnte eine erhöhte Sekretion

inflammatorischer Zytokine wie z.B. TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6 und TGF- $\beta$  nach Stimulation mit LPS beobachtet werden [282]. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Stimulation mit LPS in einer deutlichen Beeinflussung der Zytokinsekretion von Thymuszellen resultiert, insbesondere für die Zytokine IL-6 und IFN- $\gamma$ .

Wie nach Stimulation mit Bakterien konnte durch den Einfluss von Zellwandbestandteilen (LPS, PGN und LTA) keine erhöhte Proliferationsrate von CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>- Thymuszellen beobachtet werden. Zudem war die Anzahl der CD4<sup>-</sup>- Zellen geringer als nach Stimulation mit Bakterien. Daraus resultiert, dass die Stimulation mit Zellwandbestandteilen im Gegensatz zur Stimulation mit Bakterien eine Depletion von CD4<sup>-</sup>- Thymuszellen zur Folge hat. Zudem führte die Stimulation mit Zellwandbestandteilen (LPS, PGN) ebenso zu einer Senkung der Notch2<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>-Thymuszellen. Daraus kann geschlossen werden, dass neben Bakterien auch Zellwandbestandteile die Zell-Zell-Kommunikation von Thymuszellen beeinflussen können.

Im Gegensatz zu den bisherigen bakteriellen Bestandteilen führte der Einfluss von Acyl-Homoserin-Lacton von *P. aeruginosa* zu einer Hemmung der IL-17 Sekretion von  $\alpha$ -CD3 aktivierten Thymuszellen. Das Quorum sensing wird von Bakterien als regulatorisches System genutzt. Durch Produktion von Signalmolekülen wie dem Acyl-Homoserin-Lacton kommt es zur Initiierung von genetischen Regulationsprozessen, wodurch die Expression verschiedener, spezifischer Gene ausgelöst wird [227, 283]. Die verminderte IL-17 Ausschüttung nach Einfluss von Acyl-Homoserine-Lacton deutet darauf hin, dass sich die dadurch ausgelösten Regulationsprozesse hemmend auf die IL-17 Sekretion von aktivierten Thymuszellen auswirken. Dies korreliert mit einer Studie, bei der eine Inhibition der T-Zell-Differenzierung und Zytokinproduktion nachgewiesen werden konnte [284]. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Stimulation mit Acyl-Homoserin-Lacton die IL-17 Sekretion von Thymuszellen hemmt und dass die über das Quorum sensing eingeleiteten Regulationsprozesse die IL-17 Ausschüttung beeinflussen können.

### 4.1.3 Lektine

Zahlreiche Komponenten von bakteriellen Organismen gehören der Gruppe der Lektine an. Die AB-Toxine Diphtherietoxin und Exotoxin A hemmen den EF-2, und führen somit zu einer Hemmung der eukaryotischen Proteinsynthese [233, 285, 286]. Die Stimulation von aktivierten Thymuszellen mit DTx führte zu einer erhöhten IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-4 und IL-17 Sekretion, ausgeprägter in BALB/c als in C57./BL6 Mäusen. Wie nach Stimulation mit *P. aeruginosa*, wirkt sich der genetische Hintergrund des verwendeten Mausstammes nach Stimulation mit DTx auf die Zytokinsekretion aus. DTx hat einen toxischen Effekt auf

menschliche Zellen. Im Gegensatz zu Menschen, sind Nagetiere unempfindlicher gegenüber DTx [287]. So konnten nach Stimulation mit höheren Konzentrationen DTx (10 µg/ml) nur geringe Auswirkungen auf die Zellvitalität von Thymuszellen nachgewiesen werden (siehe Anhang). Der Grund hierfür liegt in der Substitution einer Aminosäure von dem als DTx-Rezeptor geltenden proHG-EGF, wodurch die Affinität DTx zu binden abnimmt [287, 288]. Jedoch führte eine *in-vivo* Applikation von DTx im Kombination mit einem Standard Immunisierungsprotokoll zu einer Mortalität von 100 % [289]. Eine Gabe von DTx ohne zusätzliches Immunisierungsreagenz führte nicht zu einer erhöhten Mortalität, jedoch zu einem deutlichen Gewichtsverlust [289]. Daraus kann geschlossen werden, dass DTx seine volle Wirkung erst nach einer Aktivierung des Immunsystems entfalten kann [288].

Exotoxin A ist ein wesentlicher Pathogenitätsfaktor während einer bakteriellen Infektion mit *P. aeruginosa*. Nach *in-vivo* Freisetzung als Proenzym konnten toxische Effekte wie eine Erhöhung der Apoptoserate oder Beeinflussung der Immunfunktionen des Wirtes nachgewiesen werden [234, 290]. Jedoch konnte nach Einfluss von Exo A keine Beeinflussung der Zellvitalität von Thymuszellen beobachtet werden (siehe Anhang). Dahingegen führte Stimulation mit niedrigen Konzentrationen Exo A zu einer erhöhten IFN- $\gamma$  Sekretion in BALB/c Mäusen, bzw. einer leicht erhöhten IL-17 Sekretion in aktivierten Thymozyten von C57.BL/6 Mäusen. In Studien konnte ein hemmender Effekt von Exo A auf die IL-6 und TNF- $\alpha$  Produktion von humanen PMBC nachgewiesen werden [290]. In dieser Arbeit konnte nun gezeigt werden, dass Exo A nicht hemmend auf die Zytokinsekretion von Thymuszellen wirkt, sondern in der Lage ist, die IL-17 Sekretion von aktivierten unreifen Immunzellen zu verstärken.

In Studien konnte gezeigt werden, dass neben dem Exo A auch Lektine hinsichtlich der Pathogenität von *P. aeruginosa* eine Rolle spielen. Für die Lektine LecA und LecB von *P. aeruginosa* konnte eine Beeinflussung der Hämagglutination nachgewiesen werden [291, 292]. Nach *in vitro* Stimulation von Thymuszellen mit Lektin konnte lediglich in BALB/c Mäusen nach gleichzeitiger Aktivierung eine leicht erhöhte IFN- $\gamma$  Sekretion detektiert werden. Des Weiteren konnte eine leicht erhöhte IL-4 Sekretion von Thymuszellen nach Stimulation mit Lektin beobachtet werden. Dahingegen führte Stimulation mit Lektin zu einer deutlichen IL-17 Sekretion in C57.BL/6 und BALB/c, jedoch nicht in SJL Mäusen. Zudem konnte nach Stimulation mit Lektin eine deutliche erhöhte Genexpression von IL-17 nachgewiesen werden. Die höhere Genexpression von NALP3 deutet darauf hin, dass die IL-17 Sekretion nach Stimulation mit Lektin mit einer Aktivierung des NALP3-Inflammasome-Komplexes in Verbindung stehen könnte.

Mit Concanavalin A wurde zudem der Einfluss eines pflanzlichen Lektins auf die IL-17 Produktion von Thymuszellen untersucht. *In vitro* stellt Con A ein Mitogen für T-Zellen dar. Allerdings konnte auch eine gesteigerte Proliferationsrate von B-Zellen beobachtet werden [293, 294]. *In vivo* induziert Con A ein Organversagen der Leber und wird deshalb zur Induktion einer Hepatitis in Mausmodellen genutzt [235]. In diesen Tiermodellen konnte eine erhöhte Sekretion und entscheidende Rolle inflammatorischer Zytokine, wie z.B. IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  nachgewiesen werden [295-297]. In dieser Arbeit konnte nun gezeigt werden, dass die Stimulation mit Con A zu einer erhöhten IL-17 Sekretion von Thymozyten führte. Zudem führte der Einfluss von Con A zu erhöhten Genexpression von IL-17, jedoch nicht wie nach Stimulation mit Lektin zu einer gesteigerten Expression von NALP3. Die immunstimulatorische Wirkung von Con A beruht auf einer Interaktion mit dem TZR von T-Lymphozyten [294]. Jedoch konnte eine deutlich höhere IL-17 Sekretion nach Stimulation mit Con A als nach Stimulation des TZR mit  $\alpha$ -CD3 beobachtet werden. Dies deutet darauf hin, dass Con A nicht nur den TZR von T-Zellen aktiviert, sondern auch IL-17 produzierende Zellen des angeborenen Immunsystems stimuliert. Des Weiteren konnte auch eine Aktivierung des Komplementsystems durch Lektine nachgewiesen werden [298]. Daraus kann geschlossen werden, dass die erhöhte IL-17 Sekretion auch als Folge einer Aktivierung des Komplementsystems resultieren könnte.

Im Allgemeinen sind die Angriffsziele der Lektine die Zuckerbindungsstellen in der Zellmembran vieler Immunzellen. Eine Blockade dieser Bindungsstellen führt zur Beeinträchtigung der Informationsübertragung dieser Zellen und somit zu toxischen Effekten [299]. Die toxischen Effekte von Lektin und Con A konnten auch in Thymuszellen nachgewiesen werden. So führte die Stimulation mit beiden Lektinen zu einer Depletion der CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>-Thymuszellen, Stimulation mit Con A zu einer zusätzlichen Depletion der CD4<sup>+</sup>-Zellen. Zudem konnte bereits nach 4 Stunden eine deutlich erhöhte Anzahl früh-apoptotischer und spät-apoptotischer (nekrotischer) Zellen nachgewiesen werden. Des Weiteren hatte die Stimulation mit beiden Lektinen eine Erhöhung der Caspase<sup>+</sup>-Zellen zur Folge. Caspase-Enzyme spielen eine zentrale Rolle in der Apoptose [300]. Eine Aktivierung von Caspasen kann zu einer verstärkten Produktion pro-inflammatorischer Zytokine führen und Mechanismen der angeborenen Immunität fördern [301, 302]. Dies deutet darauf hin, dass die erhöhte Caspase-Aktivität nach Stimulation mit Lektinen in Verbindung steht mit der erhöhten IL-17 Sekretion von Thymuszellen. Trotz dieser stark apoptotischen Wirkung von Lektinen führte die Stimulation zu einer erhöhten IL-17 Ausschüttung. Mögliche Ursachen könnten sowohl die direkte IL-17 Sekretion nach Kontakt mit dem Antigen vor der Einleitung

der Apoptose, als auch die Sekretion von IL-17 infolge der induzierten apoptotischen Signale sein.

Mit Curdlan AL wurde der Einfluss eines Dectin-1 Liganden auf die IL-17 Sekretion von Thymuszellen näher untersucht. Lediglich nach einer zusätzlichen Aktivierung des TZR konnte eine leicht erhöhte IL-17 Sekretion nachgewiesen werden. Durch Aktivierung des Dectin-1 Rezeptors kommt es zu einer CARD9-abhängigen Aktivierung von NF- $\kappa$ B [237, 238]. Nach heutigem Stand der Forschung ist Curdlan unbedenklich für die Gesundheit des Menschen. Seit 2007 darf Curdlan in der EU mit wenigen Ausnahmen für alle Lebensmittel eingesetzt werden, in erster Linie zur Stabilisation von Milchgetränken, Trinkjoghurts oder Desserts. In dieser Arbeit konnte nun gezeigt werden, dass Stimulation mit Curdlan eine Erhöhung der IL-17 Sekretion von unreifen Immunzellen zur Folge hatte, jedoch nicht ohne zusätzliche Aktivierung des TZR. Daraus kann geschlossen werden, dass die immunstimulatorische Wirkung des Lektins auf Thymozyten nicht über eine Aktivierung des Dectin-1 Rezeptors vermittelt wird, sondern andere Signalwege beteiligt sein müssen.

#### **4.1.4 Imiquimod und Gardiquimod®**

Zur Aktivierung des TLR7 wurden die *immune response modifiers* Imiquimod und Gardiquimod® verwendet. Die Stimulation des TLR7 mit Imiquimod führt wie nach Beeinflussung des TLR2 und TLR4 MyD88-abhängig zu einer Aktivierung von NF- $\kappa$ B [303]. Nach Stimulation mit beiden Substanzen konnten erhöhte IFN- $\gamma$  und IL-6 Sekretionen von Thymuszellen beobachtet werden. Eine zusätzliche Aktivierung mit  $\alpha$ -CD3 hatte nochmals eine deutlich gesteigerte Ausschüttung von IFN- $\gamma$  und IL-6 zur Folge. Dabei hatte der Einfluss von Gardiquimod® einen stärkeren stimulatorischen Effekt im Vergleich zu Imiquimod. Dahingegen konnte lediglich nach einer zusätzlichen Aktivierung mit  $\alpha$ -CD3 ein stimulatorischer Effekt von beiden Substanzen auf die IL-17 Ausschüttung nachgewiesen werden. Eine mögliche Ursache für den stärkeren stimulatorischen Effekt von Gardiquimod® liegt darin, dass es neben dem TLR7 auch zu einer Interaktion mit dem TLR8 kommt. Dahingegen interagiert Imiquimod lediglich mit dem TLR7 [241, 243]. Zudem konnte gezeigt werden, dass Stimulation mit Imiquimod zu einer Erhöhung der intrazellulären IL-17 Konzentration führt, und dass die Mehrheit der IL-17-produzierenden Zellen CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> sind. In humanen PBMC-Kulturen konnte nach Stimulation mit Imiquimod eine Induktion von Zytokinen (IFN- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-10, IL-12, G-CSF, GM-CSF) nachgewiesen werden [304, 305]. Des Weiteren führt der Einfluss von Imiquimod zu einer Aktivierung von Zellen des angeborenen Immunsystems, wie z.B. NK-Zellen oder Makrophagen [306]. Darüber

hinaus wird auch die Produktion anderer Th-Zellen Zytokine wie IL-2, IL-4 und IL-5 durch Stimulation mit Imiquimod bewirkt [307]. Nun konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass der Einfluss von Imiquimod auch eine gesteigerte Zytokinsekretion von unreifen Immunzellen bewirken kann.

#### **4.1.5 Inflammasomme**

Der Inflammasom-Komplex stellt einen wichtigen Bestandteil der unspezifischen Immunabwehr dar. Die Aktivierung des NALP3 Komplexes mit kristallinen Strukturen führt über Caspase-1 Aktivierung zu einer erhöhten Freisetzung pro-inflammatorischer Zytokine durch Zellen des angeborenen Immunsystems [308, 309]. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass kristalline Strukturen, auch DAMPs genannt die IL-17 Sekretion von unreifen Immunzellen beeinflussen. So konnte nach Stimulation von Thymuszellen mit CPPD-Kristallen, MSU-Kristallen und Hemozoin eine gesteigerte IL-17 Sekretion beobachtet werden. Nach Aktivierung der Thymuszellen, führte der Einfluss von alle getesteten DAMPs zu deutlich erhöhten IL-17 Ausschüttungen. Die Aktivierung des NALP3 Komplexes bedarf zweier Signale, wobei die Stimulation mit DAMPs lediglich das zweite Signal der Aktivierung liefert. Das erste Signal erfolgt in der Regel durch eine Aktivierung des TLR mit PAMPs [136, 308]. Daraus kann geschlossen werden, dass die IL-17 Sekretion nicht abhängig von einer TLR-Aktivierung ist, sondern auch durch andere Signalwege induziert werden kann. Jedoch konnte nach einer zusätzlichen Gabe von DAMPs keine kostimulatorische Wirkung auf die IL-17 Sekretion von TLR-stimulierten Thymuszellen beobachtet werden. Weder nach Stimulation mit den Bakterien *E.coli* und *P.aeruginosa*, noch nach Stimulation mit den Zellwandbestandteilen PGN und LPS konnte eine Beeinflussung der IL-17 Sekretion von aktivierten Thymuszellen durch eine zusätzliche Gabe von Alumn-Kristallen nachgewiesen werden. Auch die IL-1 $\beta$  Sekretion von Thymuszellen wurde nicht durch Alumn-Kristalle beeinflusst. So konnten nach Stimulation mit *E.coli*, *P. aeruginosa*, und LPS erhöhte IL-1 $\beta$  Sekretionen beobachtet, jedoch hatte der zusätzliche Einfluss von Alumn-Kristallen keine gesteigerte Sekretion zur Folge. Eine zusätzliche Aktivierung mit  $\alpha$ -CD3 hatte hingegen keinen Einfluss auf die IL-1 $\beta$  Produktion von Thymuszellen.

Neben kristallinen Strukturen können auch intrazelluläre oder nukleäre Proteine und ROS das zweite Signal der Inflammasom Aktivierung liefern. Neben der Entstehung in den Mitochondrien als Nebenprodukt der Zellatmung fördern Entzündungsreaktionen die Entstehung von ROS [310, 311]. Zudem konnte gezeigt werden, dass eine Stimulation des TLR auch eine erhöhte Produktion von ROS zur Folge hat [312, 313]. Daraus kann

geschlossen werden, dass das zweite Signal der NALP3-Inflammasom Aktivierung nach Interaktion mit dem TLR selbst induziert werden kann, z.B. durch die Bildung von ROS. Aus diesem Grund konnte auch durch eine zusätzliche Verstärkung des zweiten Signals keine erhöhte IL-1 $\beta$  Sekretion nachgewiesen werden. Dies konnte nochmals durch eine Genexpressionsanalyse verdeutlicht werden. So konnte nach Stimulation mit *P. aeruginosa* und LPS auch ohne zusätzliche Stimulation mit DAMPs eine erhöhte Expression von NALP3 und IL-1 $\beta$  beobachtet werden.

#### **4.1.6 Zusammenfassung**

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die IL-17 Sekretion von unreifen Immunzellen durch eine Vielzahl endogener und exogener Faktoren beeinflusst wird. Werden Bakterien über den TLR2 erkannt, kommt es unabhängig von der Pathogenität oder charakteristischen Eigenschaften zu einer erhöhten Sekretion von IL-17. Im Gegensatz dazu aktivieren bakterielle Bestandteile auch andere Signalwege des Immunsystems. Eine Erkennung von LTA über den TLR2 oder LPS über den TLR4 führt ebenso zu einer erhöhten Sekretion von IL-17, wie die Erkennung von Flagellin über den TLR5. Daneben konnte auch nach Aktivierung der intrazellulären TLR7/8 mit Imiquimod/Gardiquimod® eine gesteigerte Zytokinsekretion beobachtet werden. In einer Studie konnte bereits gezeigt werden, dass sowohl durch Aktivierung des TLR3 mit Poly I:C, als durch Stimulation des TLR9 mit CpG eine erhöhte IL-17 Ausschüttung von Thymuszellen induziert wird [249]. Neben der Erkennung über TLR, resultierte auch die Aktivierung anderer Signalwege des Immunsystems in erhöhter IL-17 Sekretion. So führt die Erkennung von PGN über NOD-Rezeptoren ebenso zu einer erhöhten IL-17 Ausschüttung, wie die Aktivierung des Dectin-1 Rezeptors mit Curdlan. Des Weiteren konnte eine Beeinflussung der Zytokinproduktion durch bakterielle Lektine nachgewiesen werden. Die bakteriellen AB-Toxine Exo A und DTx hatten einen kostimulatorischen Effekt auf die Zytokinproduktion. Ein weiteres Lektin von *P. aeruginosa* führte hingegen zur einer deutlich erhöhten IL-17 Sekretion, auch ohne zusätzliche Ko-Aktivierung. Darüberhinaus resultierte auch der Einfluss des pflanzlichen Lektins Con A in einer erhöhten Sekretion von IL-17. Möglicherweise korreliert die durch Lektin-induzierte IL-17 Sekretion mit einer Aktivierung des NALP3-Inflammasome-Komplexes. Dass eine Aktivierung des NALP3-Komplexes zu einer erhöhten Sekretion von IL-17 führt, konnte anhand der Stimulation mit verschiedenen kristallinen Verbindungen verdeutlicht werden. Allerdings konnte auch ein hemmender Effekt von bakteriellen Bestandteilen nachgewiesen.

Stimulation mit Homoserine-Lacton, ein Signalmolekül für das Quorum sensing von Bakterien hatte eine Hemmung der IL-17 Sekretion zur Folge.

Daraus kann geschlossen werden, dass unreife Immunzellen auf eine Vielzahl bakterieller (und auch pflanzlicher) Stimuli innerhalb kurzer Zeit mit der Sekretion von IL-17 reagieren können, darunter auch Stimuli die keine Pathogenität beim Menschen verursachen. Dies deutet darauf hin, dass die Sekretion von IL-17 nicht zu einer bakteriellen Infektion führt muss, sondern auch andere entzündungsfördernde Mechanismen beteiligt sind. Vielmehr bilden IL-17-produzierende Thymuszellen eine erste Instanz in der Erkennung von bakteriellen Substanzen und sind in der Lage weitere Immunreaktionen zu beeinflussen. Hierzu verfügt das Immunsystem über ein großes Repertoire an Signalkaskaden, die eine Induktion von IL-17 veranlassen. Jedoch stellt die Sekretion von IL-17 keinen expliziten Abwehrmechanismus gegenüber Pathogen dar. Vielmehr könnte eine regulatorische Funktion bei der Initiation von Immunantworten postuliert werden. Die IL-17 Sekretion von unreifen Immunzellen führt lediglich zu einer Aktivierung weiterer Abwehrmechanismen des angeborenen und adaptiven Immunsystems, was letztendlich zur Entstehung von pathologischen Entzündungskrankheiten führen kann.

## **4.2 Einfluss auf die Zytokinproduktion von Milzzellen**

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde der Einfluss von Bakterien und bakteriellen Bestandteilen auf die Zytokinsekretion von Milzzellen untersucht. Die Milz stellt ein sekundäres lymphatisches Organ dar, in dem die unreifen (naive) T-Zellen durch Antigenkontakt ihre Effektorfunktion erlangen und somit eine Immunabwehr einleiten können. In Studien konnte gezeigt werden, dass IL-17 eine wichtige Rolle bei der direkt einsetzenden Immunantwort spielt und somit eine unmittelbare Schutzfunktion gegenüber Bakterien oder entarteten Zellen (z.B. Tumorzellen) ausübt [66, 314]. Cua und Tato (2010) beschreiben diese Zellen als „Wächter des Immunsystems“ [259]. Allerdings wird IL-17 auch mit der Entstehung von Entzündungs- und Autoimmunerkrankungen in Verbindung gebracht [246]. Durch die Sekretion von IL-17 wird die Produktion von weiteren pro- und anti-inflammatorischen Zytokinen (z.B. IL-6, TNF- $\alpha$ , G-CSF, IL-1 $\beta$ ) in einer Vielzahl von Zellen ausgelöst. Dies führt zur Rekrutierung myeloider Zellen (z.B. Monozyten und Neutrophile) und kann nach Einwanderung in die entsprechenden Gewebe die Entstehung von Entzündungsreaktionen fördern [109, 256].

### 4.2.1 Bakterien

Im Gegensatz zu Thymuszellen, konnte in Milzzellen nach Stimulation mit Bakterien eine deutliche IFN- $\gamma$  Sekretion beobachtet werden. Überraschenderweise hatte hauptsächlich die Stimulation mit gram-positiven Bakterien (*S. aureus*, *L. rhamnosus*, *S. pneumonia*) eine erhöhte IFN- $\gamma$  Sekretion zur Folge. Nach zusätzlicher Aktivierung des TZR konnte hingegen für alle getesteten Bakterien ein kostimulatorischer Effekt auf die IFN- $\gamma$  Sekretion nachgewiesen werden. Dahingegen hatte lediglich die Stimulation mit *E. coli* und *L. rhamnosus* eine leichte IL-17 Sekretion zur Folge. Nach Aktivierung des TZR konnte ein geringer kostimulatorischer Effekt aller Bakterien auf die IL-17 Sekretion beobachtet werden. Dabei konnte keine Relation zu charakteristischen Eigenschaften der Bakterien wie Pathogenität, Gram-Status, Lokalisation oder Zellatmung festgestellt werden. Zudem führte die Stimulation mit alle getesteten Bakterien zu einer erhöhten IL-2 und IL-4 Ausschüttung von aktivierten T-Zellen. Weiterhin konnte durch den Einfluss aller Bakterien eine erhöhte IL-6 Sekretion festgestellt werden, am deutlichsten nach Stimulation mit *P. aeruginosa*, *E. coli* und *L. rhamnosus*. Auch in Bezug auf IL-6 hatte eine Aktivierung der T-Zellen mit  $\alpha$ -CD3 nochmals eine gesteigerte Sekretion zur Folge. Daraus kann geschlossen werden, dass die Sekretion von IL-2 und IL-4 nach Stimulation mit Bakterien T-Zell abhängig ist, wohingegen IL-6 und IFN- $\gamma$  auch von Zellen des angeborenen Immunsystems produziert werden können. Zudem konnte keine Relation zwischen der IL-6 und IFN- $\gamma$  Sekretion und der Pathogenität der getesteten Bakterien festgestellt werden.

Die Konzentrationsabhängig der Zytokinsekretion wurde auch in Milzzellen durch Stimulation mit *P. aeruginosa* verdeutlicht. So konnte lediglich bei höheren Konzentrationen des Bakteriums eine IFN- $\gamma$  Sekretion nachgewiesen werden. Zusätzliche Aktivierung der T-Zellen führte nochmals zu einer Steigerung der IFN- $\gamma$  Ausschüttung. Jedoch war die IFN- $\gamma$  Sekretion in SJL-Mäusen wie auch in Thymuszellen deutlich geringer als in BALB/c und C57.BL/6-Mäusen. Dahingegen konnte speziesunabhängig eine gesteigerte IL-6 Sekretion beobachtet werden. Überraschenderweise hatte eine zusätzliche Aktivierung der T-Zellen keinen kostimulatorischen Effekt auf die IL-6 Sekretion bei höheren Konzentrationen des Bakteriums. Lediglich bei niedrigen Konzentrationen hatte eine zusätzliche  $\alpha$ -CD3-Stimulaton eine zusätzliche Ausschüttung von IL-6 zur Folge. Daraus kann geschlossen werden, dass die Sekretion von IL-6 ab einer bestimmten Menge an Antigenen T-Zell unabhängig erfolgt und dass durch T-Zellen lediglich eine Verstärkung der IL-6 Antwort induziert werden kann. Der genetische Hintergrund des verwendeten Mausstammes hat zudem einen Einfluss auf IL-17 Sekretion von Milzzellen. Lediglich in SJL-Mäusen konnte

ein Anstieg der IL-17 Sekretion in höheren Konzentrationen nachgewiesen werden. Allerdings konnte im Gegensatz zu Thymuszellen kein kostimulatorischer Effekt nach einer Aktivierung des TZR nachgewiesen werden. Daraus kann geschlossen werden, dass die IL-17 Sekretion hauptsächlich durch eine Aktivierung des TZR initiiert wird und dass eine Stimulation des TLR2 die Ausschüttung nicht zusätzlich beeinflusst. Dies deutet darauf hin, dass eine Aktivierung des TLR2 lediglich einen indirekten Einfluss auf die IL-17 Sekretion von Milzzellen hat.

Im Gegensatz zu Thymuszellen wird IFN- $\gamma$  hauptsächlich von CD4<sup>-</sup> Milzzellen produziert. In Korrelation zu der erhöhten IFN- $\gamma$  Sekretion hatte auch die Stimulation mit gram-positiven Bakterien (*S. aureus*, *S. pneumonia*) den deutlichsten Anstieg der intrazellulären IFN- $\gamma$  Konzentration zur Folge. Eine zusätzliche Aktivierung des TZR führte nochmals zu einer Erhöhung der IFN- $\gamma$  Konzentration von CD4<sup>+</sup>- und CD4<sup>-</sup> Zellen. Unter den CD4<sup>-</sup>-Zellen befinden sich neben den Zellen des angeborenen Immunsystems (DZ, Makrophagen, NK-Zellen) auch die CD8<sup>+</sup>-T-Zellen. Da lediglich diese durch  $\alpha$ -CD3 aktiviert werden, kann daraus geschlossen werden, dass die Stimulation des TLR2 auch eine erhöhte IFN- $\gamma$  Produktion der CD8<sup>+</sup>-T-Zellen initiiert. Dahingegen hatte die Stimulation des TLR2 keinen Einfluss auf die intrazelluläre IL-17 Konzentration von CD4<sup>+</sup>-T-Zellen. Jedoch konnte ein Anstieg der IL-17 Konzentration von CD4<sup>-</sup> Milzzellen beobachtet werden, am deutlichsten nach Stimulation mit *E. coli*, *S. aureus* und *P. gingivalis*. Da jedoch alle Bakterien über den TLR2 erkannt werden, kann daraus geschlossen werden, dass eine Beeinflussung der IL-17 Sekretion durch Bakterien nicht nur über den TLR2 vermittelt wird, sondern dass auch noch andere Immunreaktionen involviert sein müssen, die wiederum nicht mit der Pathogenität des Bakteriums korrelieren. Interessanterweise konnten nach 48 h deutlich geringe intrazelluläre Zytokinkonzentrationen gemessen werden, als nach 24 h Stimulationszeit (siehe Anhang). Daraus resultiert, dass die TLR2- Stimulation mit Bakterien zu einer Anreicherung des Zytokins in der Zelle führt, bevor es aus der Zelle sekretiert wird.

Durch Stimulation von isolierten T-Zellen konnte bestätigt werden, dass Bakterien keinen direkten Einfluss auf die IL-17 Sekretion von CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>- T-Zellen haben. Lediglich für aktivierte CD4<sup>+</sup>- T-Zellen konnte eine leicht erhöhte Sekretion von IL-17 beobachtet werden. Auch hatte der Einfluss von Bakterien keinen Anstieg der intrazellulären IL-17 Konzentration von CD4<sup>+</sup>- T-Zellen zur Folge. Lediglich nach Aktivierung des TZR konnten leichte kostimulatorische Effekte nachgewiesen werden. Vielmehr müssen Bakterien von APZ präsentiert werden, damit eine IL-17 Sekretion von CD4<sup>+</sup>- und auch CD8<sup>+</sup>- T-Zellen induziert wird. Dies konnte auch anhand der intrazellulären IL-17 Konzentration verdeutlicht werden.

So führte die gleichzeitige Kultivierung mit APZ sowohl zu einer erhöhten IL-17 Sekretion von CD4<sup>+</sup>- T-Zellen, als auch zu einem Anstieg der IL-17-produzierenden Zellen. Daraus geht hervor, dass Bakterien keinen direkten Einfluss auf isolierte T-Zellen haben, sondern dass die IL-17 Sekretion von CD4<sup>+</sup>- T-Zellen abhängig von APZ (oder einer zusätzlichen Aktivierung des TZR) ist. Auch nach einer Polarisierung der CD4<sup>+</sup>- T-Zellen unter Th17-Bedingungen konnte keine Beeinflussung der intrazellulären IL-17 Konzentration durch Stimulation des TLR2 mit Bakterien nachgewiesen werden. Dies deutet darauf hin, dass IL-17 bzw. die Sekretion von IL-17 durch T-Zellen eher eine untergeordnete Rolle bei der Entstehung von bakteriellen Infektionen einnimmt.

Der Transkriptionsfaktor ROR $\gamma$ t gehört zu der Klasse der Kernrezeptoren und konnte als entscheidender Differenzierungsfaktor für Th17-Zellen identifiziert werden [315]. Eine Defizienz von ROR $\gamma$ t resultierte in einer verminderten Expression von IL-17 [73]. Dahingegen ist der Transkriptionsfaktor FOXP3 spezifisch für regulatorische T-Zellen [316]. In dieser Arbeit konnte nun gezeigt werden, dass die Stimulation mit Bakterien zur Hemmung der ROR $\gamma$ t Expression führt, am deutlichsten nach Kultivierung mit *S. aureus*, einem gram-positiven Bakterium. Im Gegensatz dazu konnte ein Anstieg der FOXP3<sup>+</sup>- Zellen nachgewiesen werden. Daraus kann geschlossen werden, dass die Stimulation mit Bakterien eine Differenzierung der Th17-Zellen unterbindet und eine Entstehung der regulatorischen T-Zellen fördert. Die regulatorischen T-Zellen sind überwiegend für die Modulation der Immunantwort verantwortlich und dazu befähigt überschießende Immunantworten wenn nötig zu unterdrücken. Dies verdeutlicht nochmals, dass Th17-Zellen eine untergeordnete Rolle bei der Entstehung von bakteriellen Infektionen einnehmen und dass CD4<sup>+</sup>-T-Zellen versuchen durch ihre gesteigerte Differenzierung zu regulatorischen T-Zellen die Immunantwort zu beeinflussen.

Im Gegensatz zu Thymuszellen konnte in Milzzellen eine Beeinflussung der Proliferation nachgewiesen werden. Während lediglich die Stimulation mit *P. aeruginosa* die Proliferation von CD45<sup>+</sup>- Zellen steigert, konnten auch nach Stimulation mit den anderen gram-negativen Bakterien (*P. gingivalis* und *E. coli*) erhöhte Proliferationsraten der CD45<sup>+</sup>- Zellen festgestellt werden. Dahingegen konnte nach Aktivierung des TZR eine deutlich gesteigerte Proliferationsrate nach Stimulation mit *P. aeruginosa* und *P. gingivalis* nachgewiesen werden. Daraus geht hervor, dass neben Lymphozyten (B-Zellen, T-Zellen und NK-Zellen) auch myeloide Zellen (DZ, Mastzellen, Makrophagen, Granulozyten) durch Bakterien beeinflusst werden und an einer folgenden Immunantwort beteiligt sind. Des Weiteren wird deutlich, dass die Erkennung eines pathogenen Organismus durch aktivierte Lymphozyten in einer gesteigerten

Zellexpansion resultiert. Daraus resultiert, dass die Immunantwort in Folge einer bakteriellen Infektion nicht nur von dem Erreger selbst, sondern auch von der Aktivität des Immunsystems abhängig ist.

Zudem konnte vor allem nach Stimulation mit *P. aeruginosa* und *E. coli* ein deutlicher Anstieg der Notch2<sup>+</sup>-, bzw. leichter Anstieg der Notch1<sup>+</sup>- Zellen nachgewiesen werden. Dies verdeutlicht, dass die Erkennung von gram-negativen Bakterien über TLR2 eine Notch Signalkaskade initiiert, jedoch ohne Beteiligung der CD4<sup>+</sup>- T-Zellen. Daraus kann geschlossen werden, dass der Notch-Signalweg in Milzzellen an der Initiierung einer Immunantwort in Folge einer bakteriellen Infektion beteiligt ist. Allerdings konnte weder nach Stimulation von unreifen Thymuszellen, noch von reifen T-Zellen aus der Milz eine erhöhte Notch-Aktivität nachgewiesen werden, woraus resultiert, dass die Notch-Signaltransduktion hauptsächlich durch Zellen des angeborenen Immunsystems erfolgt.

#### **4.2.2 Zellwandbestandteile**

Die Stimulation des NOD-Rezeptors mit verschiedenen PGN hatte eine IFN- $\gamma$  Sekretion von Milzzellen zur Folge, die durch eine zusätzliche Aktivierung des TZR nochmals deutlich verstärkt wurde. Zudem konnte eine erhöhte IL-6 nach Stimulation mit PGN von *E. coli* nachgewiesen werden, die durch Aktivierung des TZR nochmals gesteigert wurde. Im Gegensatz dazu konnte lediglich eine leichte TZR-unabhängige Sekretion von IL-17 beobachtet werden. Die Aktivierung des TZR führte zwar zu einer erhöhten Sekretion von IL-17, jedoch konnten im Gegensatz zu Thymuszellen keine kostimulatorischen Effekte der PGN festgestellt werden. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass auch die Sekretion von IL-2 und IL-4 in Milzzellen T-Zell-abhängig ist und dass eine Aktivierung des NOD-Rezeptors mit PGN lediglich einen geringen kostimulatorischen Effekt hat.

Im Gegensatz zu PGN hatte die Stimulation des TLR2 mit LTA lediglich einen geringen Effekt auf die IFN- $\gamma$  Sekretion von aktivierten Milzzellen. Zudem konnte eine erhöhte IL-6 Sekretion beobachtet werden, die nach zusätzlicher Aktivierung des TZR nochmals verstärkt wurde. Anders als bei Thymuszellen konnte auch nach einer zusätzlichen Aktivierung mit  $\alpha$ -CD3 keine Beeinflussung der IL-17 Sekretion nachgewiesen werden. Wie schon nach Stimulation mit PGN konnte lediglich eine leicht gesteigerte T-Zell abhängige IL-2 und IL-4 Ausschüttung nach Stimulation des TLR2 mit LTA ermittelt werden. Daraus geht hervor, dass sowohl eine Aktivierung des NOD-Rezeptors mit PGN, als auch des TLR2 mit LTA unterschiedliche Auswirkungen auf die Zytokinsekretion von unreifen und reifen Immunzellen hat.

Eine Aktivierung des TLR4 mit LPS führte zu einer deutlichen IFN- $\gamma$  Sekretion in allen getesteten Mausspezies, die nach zusätzlicher Aktivierung des TZR nochmals verstärkt wurde. Wie in Thymuszellen, konnte auch in Milzzellen nach Stimulation mit LPS eine deutliche T-Zell unabhängige IL-6-Sekretion in allen getesteten Mausspezies nachgewiesen werden. Während eine geringe Sekretion von IL-17 nachgewiesen werden konnte, hatte die Stimulation des TLR mit LPS lediglich eine leicht erhöhte T-Zell-vermittelte Sekretion von IL-4 zur Folge. Im Vergleich zu unreifen Immunzellen resultierte die LPS-Stimulation von reifen Immunzellen in einer deutlich stärkeren Zytokinsekretion. Dies lässt sich darauf zurückführen, dass die Stimulation des TLR4 mit LPS auch die lienalen Zellen des angeborenen Immunsystems aktiviert, wohingegen sich im Thymus überwiegend Zellen des adaptiven Immunsystems befinden [317, 318].

Dass IFN- $\gamma$  hauptsächlich von CD4<sup>-</sup> Milzzellen produziert wird, konnte bereits nach Stimulation mit Bakterien bestätigt werden. Interessanterweise hatte lediglich der Einfluss von PGN eine deutliche Steigerung der intrazellulären IFN- $\gamma$  Konzentration von CD4<sup>-</sup> Milzzellen zur Folge. Für LTA und LPS konnte hingegen nur einen geringe Effekte detektiert werden. Des Weiteren konnte lediglich ein geringer Einfluss auf die CD4<sup>+</sup>-T-Zellen nachgewiesen werden, der auch nach zusätzlicher Aktivierung des TZR nur einen geringen Anstieg der IFN- $\gamma$  Konzentration zur Folge hatte. Auch hinsichtlich der IL-17 Konzentration konnte lediglich eine Beeinflussung der CD4<sup>-</sup> Zellen nachgewiesen werden. So führte die Stimulation mit PGN, LTA und LPS zu einem Anstieg der intrazellulären IL-17 Konzentration von CD4<sup>-</sup> Milzzellen, auch ohne zusätzliche Aktivierung des TZR. Dahingegen konnten keine stimulatorischen Effekte auf CD4<sup>+</sup> T-Zellen festgestellt werden. Auch nach Stimulation mit Zellwandbestandteilen konnten nach 48 h deutlich geringe Zytokinkonzentrationen festgestellt werden, was sich auf eine Sekretion aus der Zelle zurückführen lässt. Dies verdeutlicht, dass sowohl eine Erkennung von PGN über die NOD-Rezeptoren, als auch die Erkennung von LTA und LPS über TLR die Zytokinsekretion von Milzzellen (insbesondere CD4<sup>-</sup> Zellen) beeinflussen kann.

Eine nähere Untersuchung von isolierten CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>- T-Zellen ergab, dass lediglich die Stimulation von  $\alpha$ -CD3 aktivierten CD4<sup>+</sup>- T-Zellen mit PGN und LPS eine leichte erhöhte Sekretion von IL-17 zur Folge hatte. Des Weiteren konnte ein Abfall der intrazellulären IL-17 Konzentration nachgewiesen werden. Daraus resultiert, dass nicht die Zahl der IL-17-produzierenden CD4<sup>+</sup>- T-Zellen erhöht wird, sondern dass durch Stimulation mit PGN und LPS die Sekretion von IL-17 aus der Zelle gefördert wird. Eine gleichzeitige Kultivierung mit APZ hatte nur einen geringen Einfluss auf die IL-17 Konzentration. Auch nach einer

Polarisierung der CD4<sup>+</sup>- T-Zellen unter Th17-Bedingungen konnte keine Beeinflussung der intrazellulären IL-17 Konzentration festgestellt werden. Der Einfluss von PGN und LPS führte im Zuge der Th17-Polarisierung von CD4<sup>+</sup>- T-Zellen zu einer deutlichen Hemmung der ROR $\gamma$ t Expression. Zudem konnte eine erhöhte Expression von FOXP3 durch den Einfluss von PGN nachgewiesen werden. Daraus kann geschlossen werden, dass beide Zellwandbestandteile die Entstehung von Th17-Zellen inhibieren, aber PGN gleichzeitig die Entstehung von regulatorischen T-Zellen fördert. Daraus geht hervor, dass wie nach Stimulation des TLR2, auch eine Stimulation des TLR4 und NOD-Rezeptors eine Differenzierung der Th17-Zellen unterbindet und die Entstehung von regulatorischen T-Zellen fördert. Dies bestätigt nochmals, dass Th17-Zellen eine untergeordnete Rolle bei der Entstehung von bakteriellen Infektionen einnehmen, da weder das Bakterium selbst, noch die Zellwandbestandteile die Entstehung von IL-17-produzierenden Zellen fördern, sondern ferner versuchen, über eine gesteigerte Differenzierung zu Treg, die Immunantwort zu modulieren.

Des Weiteren resultierte die Stimulation mit LPS und PGN in erhöhten Proliferationsrate von CD45<sup>-</sup>- und CD45<sup>+</sup>- Milzzellen. Nach einer zusätzlichen Aktivierung mit  $\alpha$ -CD3 konnte für beide Zellwandbestandteile ein deutlicher proliferationsfördernder Effekt auf die CD45<sup>+</sup>-Milzzellen nachgewiesen werden. Daraus kann geschlossen werden, dass nicht nur das Bakterium selbst, sondern auch der Einfluss spezifischer Zellwandbestandteile die Zellexpansion fördern und die Immunantwort beeinflussen kann.

Interessanterweise hatte lediglich die Stimulation mit LPS einen deutlichen Anstieg der Notch2<sup>+</sup>- Zellen zur Folge, bzw. leichten Anstieg der Notch1<sup>+</sup>- Zellen, jedoch wie nach Stimulation mit Bakterien ohne relevante Beteiligung der CD4<sup>+</sup>- T-Zellen. Dass lediglich nach Stimulation mit gram-negativen Bakterien eine deutlich erhöhte Anzahl Notch2<sup>+</sup>- Zellen ermittelt werden konnte, deutet darauf hin, dass die Notch-Signalkaskade durch LPS initiiert wird.

Wie in Thymuszellen hatte der Einfluss von hohen Konzentrationen Acyl-Homoserine-Lacton eine Hemmung der IL-17 Sekretion von  $\alpha$ -CD3 stimulierten Milzzellen zur Folge. Allerdings konnte im Gegensatz zu Thymuszellen keine Beeinträchtigung bei einer Konzentration von 1  $\mu$ g/ml nachgewiesen werden. Zudem konnten keine Auswirkungen auf die Sekretion anderer Zytokine wie IL-6, IL-2 und IL-4 festgestellt werden. Daraus wird deutlich, dass die durch das Quorum sensing ausgelösten Regulationsprozesse auch die Zytokinsekretion von reifen Immunzellen beeinflussen können, allerdings sind dafür deutlich höhere Konzentrationen des Signalmoleküls notwendig.

### 4.2.3 Lektine

Auch in Milzzellen konnten keine zelltoxischen Effekte von Exo A nachgewiesen werden (siehe Anhang). Während lediglich nach einer Aktivierung des TZR in allen getesteten Mausspezies leicht erhöht IFN- $\gamma$  Sekretionen beobachtet werden konnten, hatte die Stimulation mit Exo A keinen Einfluss auf die IL-6 Sekretion. Im Gegensatz zu Thymuszellen konnte in BALB/c und SJL Mäusen eine erhöhte IL-17 Sekretion von Milzzellen nachgewiesen werden. Zudem konnte ein kostimulatorischer Effekt von Exo A auf die IL-2 und IL-4 Sekretion von aktivierten Milzzellen festgestellt werden. Daraus wird deutlich, dass Exo A auch die Zytokinsekretion von reifen Immunzellen beeinflussen und somit die Entstehung einer bakteriellen Infektion fördern kann.

Dahingegen konnte nach Stimulation mit Lektin eine leicht erhöhte IFN- $\gamma$  Sekretion von Milzzellen beobachtet werden, allerdings nur in BALB/c Mäusen. Jedoch konnte ein kostimulatorischer Effekt nach TZR Aktivierung in Milzzellen von C57.BL/6 Mäusen detektiert werden. Zudem konnte eine erhöhte TZR-unabhängige IL-6 Sekretion in allen getesteten Mausspezies nachgewiesen werden. Wie schon in Thymuszellen, hatte die Stimulation mit Lektin eine konzentrationsabhängige Sekretion von IL-17 in allen getesteten Mausspezies zur Folge. Zudem führte die Stimulation mit Lektin zu einer Sekretion von IL-2 und IL-4. Stimulation mit dem pflanzlichen Lektin Con A resultierte in einer deutlichen Sekretion von IL-2, IL-4, IL-6 und IL-17. Eine zusätzliche Aktivierung des TZR hatte keinen weiteren Einfluss auf die Zytokinsekretion. Daraus kann geschlossen werden, dass Lektine nicht nur die Zytokinsekretion von unreifen Thymuszellen, sondern auch von lienalen reifen Immunzellen beeinflussen können. Der unterschiedliche Einfluss von Lektinen auf die Zytokinsekretion von T-Zellen lässt sich auf ihre Affinität zum TZR zurückführen. Die chemische Struktur der Lektine und die räumliche Anordnung der Zuckerrückstände in den Seitenketten spielen eine entscheidende Rolle bei der Interaktion mit dem TZR von T-Zellen. Im Gegensatz zu den Zellwandbestandteilen konnte auch eine erhöhte IL-17 Sekretion von isolierten CD4<sup>+</sup>-T-Zellen nach Stimulation mit Lektin und Con A nachgewiesen werden. Zudem resultierte die Stimulation mit Con A in einer erhöhten IL-17 Sekretion von CD8<sup>+</sup>-T-Zellen. Dahingegen führte die Stimulation mit Lektin und Con A zu einem Abfall der intrazellulären IL-17 Konzentration von isolierten CD4<sup>+</sup>-T-Zellen, was auf eine erhöhte Sekretion hindeutet. Lediglich die Stimulation mit dem pflanzlichen Lektin Con A führte zu einem Anstieg der IL-17 Konzentration von Th17-polarisierten CD4<sup>+</sup>-T-Zellen. Da pflanzliche Lektine in der täglichen Ernährung jedoch allgegenwärtige Stoffe sind,

verdeutlicht dies nochmals, dass Th17-Zellen lediglich eine untergeordnete Rolle bei der Entstehung von bakteriellen Infektionen einnehmen können.

Des Weiteren führte auch die Stimulation des Dectin-1 Rezeptors mit Curdlan zu einer erhöhten Sekretion von IL-6 und IL-17. Eine zusätzliche Aktivierung des TZR resultierte in einer gesteigerten Sekretion von IL-2, IL-4, und IL-6, jedoch nicht von IL-17. Allerdings konnte keine erhöhte IL-17 Sekretion nach Stimulation von isolierten CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>- T-Zellen nachgewiesen werden. Lediglich eine zusätzliche Aktivierung des TZR förderte die IL-17 Sekretion von CD4<sup>+</sup>-T-Zellen. Daraus resultiert, dass eine Stimulation des Dectin-1 Rezeptors auch die Zytokinproduktion von reifen Immunzellen beeinflussen kann.

Zudem resultierte die Stimulation mit Exo A und Curdlan in einer deutlich verminderten Expression von ROR $\gamma$ t und einer leicht erhöhten Expression von FOXP3. Dies deutet darauf hin, dass neben Bakterien und Zellwandbestandteilen auch Lektine und Dectin-1 Agonisten die Differenzierung der Th17-Zellen unterbinden und eine Entstehung der regulatorischen T-Zellen fördern. Dahingegen konnte keine Beeinflussung der Notch<sup>+</sup>- Zellen nach Stimulation mit Exo A oder Curdlan nachgewiesen werden. Bisher konnte lediglich nachgewiesen werden, dass TLR-Signale den Notch-Signalweg beeinflussen können [149, 319]. In dieser Arbeit konnten nun gezeigt werden, dass lediglich die Stimulation des TLR4 mit LPS zu einer deutlich erhöhten Signaltransduktion über den Notch2-Rezeptor führt.

#### **4.2.4 Zusammenfassung**

In diesem Teil der Arbeit konnte ein deutlicher Einfluss von Bakterien und bakteriellen Bestandteilen auf die Zytokinproduktion von reifen Immunzellen gezeigt werden, der sich jedoch deutlich von unreifen Immunzellen unterscheidet. So führte die Stimulation mit gram-positiven Bakterien zu einer erhöhten IFN- $\gamma$  Sekretion. Eine TLR2 Aktivierung mit Bakterien resultierte hingegen nur in geringen kostimulatorischen Effekten auf aktivierte T-Zellen. Auch die Erkennung von Pathogenen über andere PRR hatte lediglich einen geringen Einfluss auf reife Immunzellen. Dass die Zytokinsekretion von T-Zellen von einer Aktivierung des TZR abhängig ist, konnte durch die gleichzeitige Kultivierung mit APZ verdeutlicht werden. Zudem konnte nur ein geringer Einfluss auf isolierte CD4<sup>+</sup>- T-Zellen nachgewiesen werden. Interessanterweise führte der Einfluss von Bakterien und bakteriellen Bestandteilen zu einer Hemmung der Th17-Polarisierung und einer vermehrten Bildung von regulatorischen T-Zellen. Die Erkennung eines pathogenen Organismus führte zu einer deutlichen Zellexpansion von aktivierten Lymphozyten. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass neben T-Zellen auch Zellen des angeborenen Immunsystems die Produktion inflammatorischer Zytokine

beeinflussen können. Des Weiteren konnte eine Beteiligung der Notch-Signalwege an der Initiierung einer Immunantwort durch Zellen des angeborenen Immunsystems in Folge einer bakteriellen Infektion nachgewiesen werden, hauptsächlich vermittelt durch LPS der äußeren Zellmembran. Auch die Stimulation von reifen Immunzellen mit Lektinen resultierte in einer erhöhten Sekretion von Zytokinen, insbesondere T-Zell vermittelter Zytokine wie IL-2, IL-4 und IL-17. Dabei beeinflussen die chemische Struktur bzw. die Zuckerrückstände die Affinität der Lektine zum TZR von T-Zellen. Allerdings konnten auch immunstimulatorische Effekte auf Zellen des angeborenen Immunsystems nachgewiesen werden.

Dies verdeutlicht nochmals, dass Th17-Zellen lediglich eine untergeordnete Rolle bei der Entstehung von bakteriellen Infektionen einnehmen können. Ferner versuchen  $CD4^+$ -T-Zellen durch ihre gesteigerte Differenzierung zu regulatorischen T-Zellen die Immunantwort zu beeinflussen. Daraus kann geschlossen werden, dass die Immunantwort in Folge einer bakteriellen Infektion nicht nur von dem Erreger selbst, sondern auch von der Aktivität und spezifischen Merkmalen des Immunsystems abhängig ist.

### **4.3 Einfluss auf die Zytokinproduktion von MOG-spezifischen Zellen**

Im dritten Teil dieser Arbeit wurde der Einfluss von Bakterien und bakteriellen Bestandteilen auf die Zytokinproduktion von MOG-antigenspezifischen Zellen untersucht. Bakterien und bakterielle Verbindungen werden immer wieder als Auslöser der MS vermutet. Zudem können die unter normalen Bedingungen unschädlichen Bakterien bei vorbelasteten Menschen eine Überreaktion des Immunsystems auslösen, was auch in einem Angriff des eigenen Nervensystems resultieren kann. Die Pathogenese der MS ist der EAE sehr ähnlich. Durch APZ kommt es zur Aktivierung und Rekrutierung von Entzündungszellen, vor allem T-Zellen und Makrophagen. Im Falle der EAE präsentieren die APZ MOG<sub>35-55</sub>-Peptid Fragmente, was eine erhöhte Sekretion inflammatorischer Zytokine zur Folge hat. Allerdings sind für die Induktion der EAE weitere immunstimulatorische Komponenten erforderlich. So wird das injizierte *Mycobacterium tuberculosis* von APZ erkannt, was in einer erhöhten Sekretion von IFN- $\gamma$  und ausgeprägten Th1-Antwort resultiert. Bisher wurde von einer entscheidenden Rolle von IL-17 bei der Entstehung von Autoimmunerkrankungen ausgegangen [320]. Allerdings zeigten neuere Studien, dass IL-17 KO-Mäuse ebenso anfällig für eine EAE sind wie Wildtyp-Mäuse [109]. Vielmehr spielt der Botenstoff IL-17 bei neuronalen Entzündungen im Gehirn lediglich eine untergeordnete Rolle [321].

### 4.3.1 Bakterien

Lediglich die Stimulation mit gram-positiven Bakterien (*S. aureus*, *L. rhamnosus* und *S. pneumonia*) resultierte in einer erhöhten IFN- $\gamma$  Sekretion von Milzzellen aus EAE-Mäusen. Allerdings konnte nach gleichzeitiger Stimulation mit dem spezifischen MOG-Peptid auch eine erhöhte IFN- $\gamma$  Sekretion nach Stimulation mit gram-negativen Bakterien (*P. aeruginosa*, *P. gingivalis* und *E. coli*) beobachtet werden. Zudem konnte eine leicht erhöhte IL-17 Sekretion durch den Einfluss aller getesteten Bakterien nachgewiesen werden, insbesondere nach Stimulation mit gram-positiven Bakterien. Die nach zusätzlicher Stimulation mit dem spezifischen MOG-Peptid nochmals verstärkt wurde. Daraus kann geschlossen werden, dass die IL-17 Sekretion im Gegensatz zur IFN- $\gamma$  Sekretion abhängig von dem spezifischen MOG-Peptid ist und dass der Einfluss von Bakterien lediglich einen leichten kostimulatorischen Effekt hat. Dahingegen ist die IFN- $\gamma$  Ausschüttung von Milzzellen aus EAE-Tieren abhängig von der spezifischen Zellwandzusammensetzung des Bakteriums. Interessanterweise konnten keine Relation zwischen den detektierten Spitzzahlen und dem klinischen Score nachgewiesen werden, was darauf hindeutet, dass kein direkter Zusammenhang zwischen der Schwere der Krankheit und der IFN- $\gamma$  und IL-17 Sekretion besteht.

Des Weiteren führte die Stimulation mit *P. aeruginosa*, *E. coli* und *S. aureus* zu einem Anstieg der intrazellulären IFN- $\gamma$  Konzentration von CD4<sup>+</sup>- und CD4<sup>-</sup> Milzzellen. Eine zusätzliche Restimulation mit MOG-Peptid resultierte nochmals in einer erhöhten Konzentration von IFN- $\gamma$ . Zudem konnte eine erhöhte intrazelluläre IL-17 Konzentration von CD4<sup>+</sup> T-Zellen nach Stimulation mit alle getesteten Bakterien nachgewiesen werden, jedoch hatte im Gegensatz zu IFN- $\gamma$  die zusätzliche Restimulation mit MOG-Peptid keinen weiteren Einfluss. Zudem konnte gezeigt werden, dass die meisten IL-17-Produzenten CD4<sup>-</sup> sind. Interessanterweise konnte im Gegensatz zu Milzzellen aus naiven Mäusen nach 48 h Stimulationszeit nochmals ein deutlicher Anstieg der intrazellulären Zytokinsekretion im Vergleich zu 24 h nachgewiesen werden (siehe Anhang). Daraus geht hervor, dass die Zytokinsekretion MOG-antigenspezifische Milzzellen zwar zeitlich verzögert, aber dafür kontinuierlicher erfolgt.

Die Stimulation mit *P. aeruginosa* und *E. coli* resultierte in einer erhöhten IL-17 Sekretion von isolierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen. Zusätzliche Restimulation mit MOG-Peptid führte zwar zu einem deutlichen Anstieg der IL-17 Sekretion, allerdings konnten nur leichte kostimulatorische Effekte durch gram-negativer Bakterien nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu konnte keine Beeinflussung isolierter CD8<sup>+</sup> T-Zellen durch die Stimulation mit Bakterien festgestellt werden. Dies deutet daraufhin, dass lediglich die antigenspezifischen CD4<sup>+</sup> T-

Zellen nach Kontakt mit MOG-Peptid IL-17 sekretieren können, jedoch nicht die CD8<sup>+</sup>-T-Zellen. Zudem hatte die Immunisierung der Mäuse eine vermehrte Bildung von reifen CD4<sup>+</sup>-T-Zellen zur Folge. Dies geht daraus hervor, dass die Stimulation mit *P. aeruginosa* und *E. coli* in deutlich höheren IL-17 Sekretionen von CD4<sup>+</sup>-T-Zellen aus EAE-Tieren im Vergleich zu CD4<sup>+</sup>-T-Zellen naiven Tieren resultierte. Die erhöhte Anzahl reifer CD4<sup>+</sup>-T-Zellen könnte die Folge der Aktivierung des Immunsystems mit dem injizierten *Mycobacterium tuberculosis* sein.

Die gesteigerte IL-17 Sekretion nach Stimulation mit *P. aeruginosa* und *E. coli* korreliert mit einem Anstieg der intrazellulären IL-17 Konzentration von CD4<sup>+</sup>-T-Zellen aus EAE-Mäusen. Es konnte gezeigt werden, dass der Einfluss gram-negativer Bakterien im Gegensatz zu CD4<sup>+</sup>-T-Zellen aus naiven Mäusen in einer erhöhten Zahl MOG-spezifischer IL-17-produzierender CD4<sup>+</sup>-T-Zellen resultiert. Eine zusätzliche Th17-Polarisierung mit MOG-Peptid führte hingegen zu einer deutlich verminderten Anzahl IL-17 produzierender CD4<sup>+</sup>-T-Zellen. Daraus kann geschlossen werden, dass die Th17-Polarisierung von CD4<sup>+</sup>-T-Zellen nicht durch das MOG-Peptid begünstigt wird, sondern im Gegensatz zur Polarisation mit aktiviertem TZR vielmehr zu einer verminderten Anzahl von Th17-Zellen führt.

Zudem hatte der Einfluss von *P. aeruginosa* und *P. gingivalis* eine erhöhte Proliferationsrate von CD45<sup>+</sup>-Milzzellen von EAE-Tieren zur Folge. Nach Restimulation mit MOG-Peptid konnte lediglich durch den Einfluss von gram-negativen Bakterien (*P. aeruginosa* und *E. coli*) eine erhöhte Proliferation von CD45<sup>+</sup>-Zellen beobachtet werden. Im Gegensatz zu Milzzellen aus naiven Mäusen konnte keine proliferationsfördernde Wirkung durch den Einfluss von Bakterien auf MOG-aktivierte CD45<sup>+</sup>-Zellen festgestellt werden. Daraus kann geschlossen werden, dass der kostimulatorische Effekt auf die Proliferation von CD45<sup>+</sup>-Milzzellen von einer Aktivierung des TZR abhängig ist. Hinsichtlich der Notch<sup>+</sup>-Milzzellen von EAE-Mäusen konnten nach Stimulation mit Bakterien keine Unterschiede zu Milzzellen von naiven Mäusen festgestellt werden.

#### **4.3.2 Zellwandbestandteile**

Lediglich nach Stimulation mit PGN-EB konnte eine leicht erhöhte IFN- $\gamma$  Sekretion von Milzzellen aus EAE-Tieren nachgewiesen werden. Nach zusätzlicher Stimulation mit MOG-Peptid konnte zudem durch den Einfluss von LPS und beider PGN eine erhöhte IFN- $\gamma$  Sekretion festgestellt werden. Des Weiteren resultierte die Stimulation mit PGN und LPS in einer erhöhten Sekretion von IL-17, die nach zusätzlicher Restimulation mit MOG-Peptid nochmals leicht erhöht war. Für LTA konnte hingegen keine Beeinflussung der IFN- $\gamma$  und

IL-17 Sekretion nachgewiesen werden. Ferner konnte auch nach Stimulation mit Zellwandbestandteilen kein direkter Zusammenhang zwischen dem klinischen Score und der Zytokinsekretion beobachtet werden. Daraus kann geschlossen werden, dass die kostimulatorischen Effekte von PGN und LPS nicht von einer Aktivierung des TZR abhängig sind, sondern dass die sekretierenden Zellen auch über spezifische Antigene aktiviert werden können.

Während nach Stimulation mit LPS erhöhte IFN- $\gamma$  Konzentration beobachtet werden konnten, resultierte der Einfluss von LTA und PGN lediglich nach Restimulation mit MOG-Peptid in einer erhöhten IFN- $\gamma$  Konzentrationen von CD4<sup>+</sup>-T-Zellen. Zudem hatte die Stimulation mit PGN, LTA und LPS einen deutlichen Anstieg der intrazellulären IFN- $\gamma$  Konzentration von CD4<sup>-</sup> Milzzellen zur Folge. Im Gegensatz dazu führte der Einfluss von PGN und LPS nur nach Restimulation mit MOG-Peptid zu einer erhöhten Anzahl IL-17 produzierender CD4<sup>+</sup>-T-Zellen und CD4<sup>-</sup> Milzzellen. Daraus geht hervor, dass die kostimulatorischen Effekte auf antigenspezifische Zellen nicht nur eine erhöhte Sekretion, sondern auch einen Anstieg der produzierenden Zellen zur Folge haben. Zudem konnte wiederum ein zeitlich zunehmender Anstieg der IFN- $\gamma$ - und IL-17-produzierenden Zellen beobachtet werden.

Jedoch hatte die Stimulation von CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>- T-Zellen mit LPS und PGN keine erhöhte IL-17 Sekretion zur Folge. Auch nach Restimulation mit MOG-Peptid konnten nur leichte kostimulatorische Effekte auf die IL-17 Sekretion von CD4<sup>+</sup>- T-Zellen beobachtet werden. Ferner konnte nach Stimulation mit LPS von *P.aeruginosa* und PGN von *E.coli* kein Anstieg der intrazellulären IL-17 Konzentration von CD4<sup>+</sup>- T-Zellen aus EAE-Mäusen nachgewiesen werden. Interessanterweise resultierte die Stimulation mit den Bakterien aus denen die Zellwandbestandteile isoliert wurden in einer erhöhten Sekretion von IL-17. Dies verdeutlicht nochmals, dass die IL-17 Sekretion von antigenspezifischen CD4<sup>+</sup>-T-Zellen nicht TLR oder NOD-abhängig induziert wird, sondern dass die IL-17 Sekretion durch die T-Zellen erfolgt, die in Folge der Immunisierung gereift sind.

Unabhängig von zusätzlicher Restimulation mit MOG-Peptid resultierte der Einfluss von LPS und PGN in einer erhöhten Proliferationsrate von CD45<sup>-</sup> Milzzellen. Dies verdeutlicht nochmals, dass auch der proliferationsfördernde Effekt der Zellwandbestandteile von einer Aktivierung des TZR abhängig ist und dass diese Aktivierung nicht antigenabhängig induziert werden kann. Für die Aktivierung der Notch-Signalkaskade konnten keine Unterschiede im Vergleich zu Milzzellen aus naiven Mäusen festgestellt werden.

Der hemmende Effekt auf die Zytokinsekretion von Acyl-Homoserine-Lacton konnte auch in Milzzellen von EAE-Tieren beobachtet werden. So resultierte der Einfluss von HSL nach Restimulation mit MOG-Peptid in deutlich verminderten IFN- $\gamma$ , IL-6 und IL-17 Sekretionen.

Daraus geht hervor, dass die Signalmoleküle des Quorum sensing nicht nur die Zytokinsekretion von TZR-aktivierten Immunzellen, sondern auch die von antigenspezifischen Immunzellen inhibieren können.

### 4.3.3 Lektine

Auch in Milzzellen von EAE-Tieren konnten leichte stimulatorische Effekte von Exo A auf die IFN- $\gamma$ , IL-6 und IL-17 Sekretion beobachtet werden, jedoch nur nach zusätzlicher Stimulation MOG-Peptid. Exo A wirkt somit nicht nur kostimulierend auf TZR-aktivierte Zellen, sondern beeinflusst auch die Zytokinsekretion von antigenspezifischen Zellen.

Im Gegensatz dazu resultierte die Stimulation mit Lektin von *P. aeruginosa* in einer erhöhten IFN- $\gamma$ , IL-6 und IL-17 Sekretion. Auch die Stimulation mit dem pflanzlichen Lektin Con A hatte eine erhöhte IFN- $\gamma$ , IL-6 und IL-17 Sekretion zur Folge. Während die Stimulation mit Exo A keinen Auswirkungen auf die IL-17 Sekretion von isolierten T-Zellen hat, konnte nach Stimulation mit Lektin und Con A ein deutlich erhöhte IL-17 Sekretion von CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen nachgewiesen werden. Die Stimulation mit Lektin resultierte zudem in einem Anstieg der IL-17 produzierenden CD4<sup>+</sup>-T-Zellen und MOG-spezifischen Th17-polarisierten CD4<sup>+</sup>-T-Zellen. Dies deutet darauf hin, dass die durch Stimulation mit Lektinen induzierte Sekretion von Zytokinen weder von einer Aktivierung des TZR, noch von einer Aktivierung über spezifische Antigene abhängig ist.

Stimulation mit Curdlan resultierte in einer erhöhten Sekretion von IFN- $\gamma$  und IL-6. Nach zusätzlicher Restimulation mit MOG-Peptid konnte zudem eine erhöhte IL-17 Sekretion nachgewiesen werden. Jedoch konnte kein Einfluss auf die IL-17 Sekretion von isolierten T-Zellen beobachtet werden, auch nicht nach zusätzlicher Restimulation mit MOG-Peptid. Auch isolierte Daraus kann geschlossen werden, dass der über den Dectin-1 Rezeptor vermittelte kostimulatorische Effekt von Curdlan nicht TZR abhängig ist, sondern dass eine Aktivierung der sekretierenden Zellen auch über spezifische Antigene erfolgen kann.

### 4.3.4 ZNS

Während dem Verlauf der MS oder der EAE kommt es zur Migration von CD4<sup>+</sup>-T-Zellen und APZ in das ZNS. Nach Präsentation des spezifischen Antigens über den MHCII-Komplex sezernieren die T-Zellen und APZ proinflammatorische Zytokine und Chemokine, was mit einer Zerstörung der Myelinscheiden beginnt und in einer signifikanten Schädigung axonaler Strukturen resultiert [156, 157]. In dieser Arbeit wurde der Einfluss von Bakterien und bakteriellen Bestandteilen auf die Zytokinproduktion von ZNS-infiltrierenden Zellen

untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die Stimulation mit gram-negativen Bakterien in einer erhöhten IL-17 Sekretion von isolierten Zellen des Rückenmarks resultiert. Zudem konnte eine erhöhte IL-17 Sekretion nach Stimulation mit dem antigenspezifischen MOG-Peptid nachgewiesen werden. Auch der Einfluss von Zellwandbestandteilen (LPS und PGN), und Lektinen (Lektin von *P. aeruginosa* und Con A) hatten einen leichten Anstieg der IL-17 Sekretion zur Folge. Nach einer zusätzlichen Gewebeverdauung und anschließenden Isolation der Lymphozyten konnten zwar deutlich höhere Spotzahlen detektiert werden, allerdings hatte weder die Stimulation mit MOG-Peptid, noch der Einfluss von Bakterien und bakteriellen Bestandteilen eine erhöhte IL-17 Sekretion zur Folge. Mögliche Ursache hierfür ist die Art der Isolationsmethode. Die zusätzliche Verdauung zerstört die Gewebematrix des Rückenmarks und resultiert somit in einer effektiveren Isolation der ZNS-infiltrierenden Zellen. Daraus geht hervor, dass die komplexe Gewebematrix des Rückenmarks und die spezifische Verteilung der verschiedenen Subpopulationen (T-Zellen, APZ, Mirkoglia) die Zytokinsekretion nach Stimulation mit Bakterien und bakteriellen Bestandteilen beeinflussen kann.

Des Weiteren konnten in Mäusen mit höheren klinischen Scores tendenziell höhere Spotzahlen nachgewiesen werden. Daraus kann geschlossen werden, dass mit zunehmender Schwere der klinischen Symptome auch die Zahl der ZNS-infiltrierenden Zellen zunimmt, von denen ca. ein Drittel CD4<sup>+</sup>- T-Zellen sind.

Im Gegensatz dazu konnten aus dem Gehirn deutlich weniger IL-17-produzierende mononukleäre Immunzellen isoliert werden. Auch nach Stimulation mit Bakterien und Zellwandbestandteilen konnten keine erhöhten IL-17 Sekretionen nachgewiesen werden. Lediglich die Stimulation mit Lektinen resultierte in einer leicht erhöhten IL-17 Ausschüttung, unabhängig von einer zusätzlichen Restimulation mit MOG-Peptid.

#### **4.3.5 Zusammenfassung**

Im letzten Teil dieser Arbeit wurde der Einfluss von Bakterien und bakteriellen Bestandteilen auf die Zytokinsekretion von antigen-spezifischen Zellen aus EAE-Mäusen untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die Immunisierung in einer erhöhten Zahl Zytokin-sekretierender Zellen resultiert, insbesondere IFN- $\gamma$  produzierende Th1-Zellen und IL-17 produzierende Th17-Zellen. Mögliche Ursache hierfür könnte die Entstehung von reifen Effektorzellen in Folge des injizierten *Mycobacterium tuberculosis* sein. Zudem erfolgte die Zytokinsekretion MOG-antigenspezifischer Milzzellen nach Kontakt mit Antigenen zeitlich verzögert, jedoch kontinuierlicher im Vergleich zu naiven Milzzellen. Des Weiteren konnte durch den Einfluss

von PGN und LPS eine erhöhte Zytokinsekretion antigen-spezifischer Zellen nachgewiesen werden. Eine Relation zwischen den detektierten Spitzahlen und dem klinischen Score der EAE-Mäuse konnte nicht festgemacht werden, was darauf hindeutet, dass kein direkter Zusammenhang zwischen der IFN- $\gamma$  bzw. IL-17 Sekretion und der Schwere der Krankheit besteht. Während für Lektine ein stimulierender Effekt auf antigen-spezifischen Zellen nachgewiesen konnte, hatte der Einfluss von HSL eine Inhibition der Zytokinsekretion zur Folge. Auch die über den Dectin-1 Rezeptor durch Curdlan vermittelte Zytokinsekretion ist nicht TZR abhängig, sondern kann auch über eine Aktivierung antigen-spezifischer Zellen erfolgen. Lediglich der Einfluss von Lektinen resultierte in einer erhöhten IL-17 Sekretion ZNS-infiltrierender Zellen, wobei die komplexe Gewebematrix und die spezifische Verteilung der verschiedenen Subpopulationen (T-Zellen, APZ, Mikrogliä) die Zytokinsekretion nach Stimulation mit Bakterien und bakteriellen Bestandteilen beeinflussen kann. Dies verdeutlicht nochmals, dass Th17-Zellen und IL-17 lediglich eine untergeordnete Rolle bei der Entstehung von Autoimmunerkrankungen einnehmen können, jedoch eine verstärkt ausgeprägte Immunantwort in Folge einer bakteriellen Infektion erfolgen kann.

## Literaturverzeichnis

1. Parkin, J. and B. Cohen (2001). An overview of the immune system. *Lancet*. **357** (9270): p. 1777-89.
2. Takeda, K., T. Kaisho and S. Akira (2003). Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol*. **21**: p. 335-76.
3. Beutler, B. (2004). Innate immunity: an overview. *Mol Immunol*. **40** (12): p. 845-59.
4. Akira, S. and H. Hemmi (2003). Recognition of pathogen-associated molecular patterns by TLR family. *Immunol Lett*. **85** (2): p. 85-95.
5. Germain, R.N. (2002). T-cell development and the CD4-CD8 lineage decision. *Nat Rev Immunol*. **2** (5): p. 309-22.
6. Godfrey, D.I., J. Kennedy, T. Suda, and A. Zlotnik (1993). A developmental pathway involving four phenotypically and functionally distinct subsets of CD3-CD4-CD8-triple-negative adult mouse thymocytes defined by CD44 and CD25 expression. *J Immunol*. **150** (10): p. 4244-52.
7. Robey, E. and B.J. Fowlkes (1994). Selective events in T cell development. *Annu Rev Immunol*. **12**: p. 675-705.
8. von Boehmer, H. (2005). Unique features of the pre-T-cell receptor alpha-chain: not just a surrogate. *Nat Rev Immunol*. **5** (7): p. 571-7.
9. Aifantis, I., J. Feinberg, H.J. Fehling, J.P. Di Santo, et al. (1999). Early T cell receptor beta gene expression is regulated by the pre-T cell receptor-CD3 complex. *J Exp Med*. **190** (1): p. 141-4.
10. Correia-Neves, M., D. Mathis and C. Benoist (2001). A molecular chart of thymocyte positive selection. *Eur J Immunol*. **31** (9): p. 2583-92.
11. von Boehmer, H., H.S. Teh and P. Kisielow (1989). The thymus selects the useful, neglects the useless and destroys the harmful. *Immunol Today*. **10** (2): p. 57-61.
12. Guidos, C.J., J.S. Danska, C.G. Fathman, and I.L. Weissman (1990). T cell receptor-mediated negative selection of autoreactive T lymphocyte precursors occurs after commitment to the CD4 or CD8 lineages. *J Exp Med*. **172** (3): p. 835-45.
13. Ellmeier, W., S. Sawada and D.R. Littman (1999). The regulation of CD4 and CD8 coreceptor gene expression during T cell development. *Annu Rev Immunol*. **17**: p. 523-54.
14. Nossal, G.J. (1994). Negative selection of lymphocytes. *Cell*. **76** (2): p. 229-39.

15. Fowlkes, B.J., L. Edison, B.J. Mathieson, and T.M. Chused (2009). Early T lymphocytes. Differentiation in vivo of adult intrathymic precursor cells. 1985. *J Immunol.* **183** (1): p. 5-25.
16. Scollay, R., A. Wilson, A. D'Amico, K. Kelly, et al. (1988). Developmental status and reconstitution potential of subpopulations of murine thymocytes. *Immunol Rev.* **104**: p. 81-120.
17. Carding, S.R., S. Kyes, E.J. Jenkinson, R. Kingston, et al. (1990). Developmentally regulated fetal thymic and extrathymic T-cell receptor gamma delta gene expression. *Genes Dev.* **4** (8): p. 1304-15.
18. McVay, L.D. and S.R. Carding (1996). Extrathymic origin of human gamma delta T cells during fetal development. *J Immunol.* **157** (7): p. 2873-82.
19. McVay, L.D., A.C. Hayday, K. Bottomly, and S.R. Carding (1991). Thymic and extrathymic development of human gamma/delta T cells. *Curr Top Microbiol Immunol.* **173**: p. 57-63.
20. Carding, S.R. and P.J. Egan (2002). Gammadelta T cells: functional plasticity and heterogeneity. *Nat Rev Immunol.* **2** (5): p. 336-45.
21. Bonneville, M., R.L. O'Brien and W.K. Born (2010). Gammadelta T cell effector functions: a blend of innate programming and acquired plasticity. *Nat Rev Immunol.* **10** (7): p. 467-78.
22. Mombaerts, P., J. Arnoldi, F. Russ, S. Tonegawa, et al. (1993). Different roles of alpha beta and gamma delta T cells in immunity against an intracellular bacterial pathogen. *Nature.* **365** (6441): p. 53-6.
23. Egan, P.J. and S.R. Carding (2000). Downmodulation of the inflammatory response to bacterial infection by gammadelta T cells cytotoxic for activated macrophages. *J Exp Med.* **191** (12): p. 2145-58.
24. Fu, Y.X., C.E. Roark, K. Kelly, D. Drevets, et al. (1994). Immune protection and control of inflammatory tissue necrosis by gamma delta T cells. *J Immunol.* **153** (7): p. 3101-15.
25. Blink, S.E. and S.D. Miller (2009). The contribution of gammadelta T cells to the pathogenesis of EAE and MS. *Curr Mol Med.* **9** (1): p. 15-22.
26. Orr, M.T. and L.L. Lanier (2010). Natural killer cell education and tolerance. *Cell.* **142** (6): p. 847-56.
27. Vivier, E., E. Tomasello, M. Baratin, T. Walzer, et al. (2008). Functions of natural killer cells. *Nat Immunol.* **9** (5): p. 503-10.

28. Di Santo, J.P. (2006). Natural killer cell developmental pathways: a question of balance. *Annu Rev Immunol.* **24**: p. 257-86.
29. Itoh, M., T. Takahashi, N. Sakaguchi, Y. Kuniyasu, et al. (1999). Thymus and autoimmunity: production of CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells as a key function of the thymus in maintaining immunologic self-tolerance. *J Immunol.* **162** (9): p. 5317-26.
30. Mueller, D.L. (2010). Mechanisms maintaining peripheral tolerance. *Nat Immunol.* **11** (1): p. 21-7.
31. Bluestone, J.A. and A.K. Abbas (2003). Natural versus adaptive regulatory T cells. *Nat Rev Immunol.* **3** (3): p. 253-7.
32. Buckner, J.H. (2010). Mechanisms of impaired regulation by CD4(+)CD25(+)FOXP3(+) regulatory T cells in human autoimmune diseases. *Nat Rev Immunol.* **10** (12): p. 849-59.
33. Ellis, J.S., X. Wan and H. Braley-Mullen (2013). Transient depletion of CD4+ CD25+ regulatory T cells results in multiple autoimmune diseases in wild-type and B-cell-deficient NOD mice. *Immunology.* **139** (2): p. 179-86.
34. Stephens, L.A., D. Gray and S.M. Anderton (2005). CD4+CD25+ regulatory T cells limit the risk of autoimmune disease arising from T cell receptor crossreactivity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **102** (48): p. 17418-23.
35. Di Rosa, F., S. Ramaswamy, J.P. Ridge, and P. Matzinger (1999). On the lifespan of virgin T lymphocytes. *J Immunol.* **163** (3): p. 1253-7.
36. Guermonprez, P., J. Valladeau, L. Zitvogel, C. Thery, et al. (2002). Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annu Rev Immunol.* **20**: p. 621-67.
37. Smith-Garvin, J.E., G.A. Koretzky and M.S. Jordan (2009). T cell activation. *Annu Rev Immunol.* **27**: p. 591-619.
38. Call, M.E. and K.W. Wucherpfennig (2005). The T cell receptor: critical role of the membrane environment in receptor assembly and function. *Annu Rev Immunol.* **23**: p. 101-25.
39. Brownlie, R.J. and R. Zamoyska (2013). T cell receptor signalling networks: branched, diversified and bounded. *Nat Rev Immunol.* **13** (4): p. 257-69.
40. Ni, K. and H.C. O'Neill (1997). The role of dendritic cells in T cell activation. *Immunol Cell Biol.* **75** (3): p. 223-30.

41. Quah, B.J. and H.C. O'Neill (2005). Maturation of function in dendritic cells for tolerance and immunity. *J Cell Mol Med.* **9** (3): p. 643-54.
42. Greenfield, E.A., K.A. Nguyen and V.K. Kuchroo (1998). CD28/B7 costimulation: a review. *Crit Rev Immunol.* **18** (5): p. 389-418.
43. Boyman, O. and J. Sprent (2012). The role of interleukin-2 during homeostasis and activation of the immune system. *Nat Rev Immunol.* **12** (3): p. 180-90.
44. Elgueta, R., M.J. Benson, V.C. de Vries, A. Wasiuk, et al. (2009). Molecular mechanism and function of CD40/CD40L engagement in the immune system. *Immunol Rev.* **229** (1): p. 152-72.
45. Lambolez, F., M. Kronenberg and H. Cheroutre (2007). Thymic differentiation of TCR alpha beta(+) CD8 alpha alpha(+) IELs. *Immunol Rev.* **215**: p. 178-88.
46. Zhang, N. and M.J. Bevan (2011). CD8(+) T cells: foot soldiers of the immune system. *Immunity.* **35** (2): p. 161-8.
47. Harty, J.T., A.R. Tvinnereim and D.W. White (2000). CD8+ T cell effector mechanisms in resistance to infection. *Annu Rev Immunol.* **18**: p. 275-308.
48. Zhu, J., H. Yamane and W.E. Paul (2010). Differentiation of effector CD4 T cell populations (\*). *Annu Rev Immunol.* **28**: p. 445-89.
49. Trinchieri, G. (2003). Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol.* **3** (2): p. 133-46.
50. Romagnani, S. (2000). T-cell subsets (Th1 versus Th2). *Ann Allergy Asthma Immunol.* **85** (1): p. 9-18; quiz 18, 21.
51. Schroder, K., P.J. Hertzog, T. Ravasi, and D.A. Hume (2004). Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol.* **75** (2): p. 163-89.
52. Boyman, O., J.H. Cho and J. Sprent (2010). The role of interleukin-2 in memory CD8 cell differentiation. *Adv Exp Med Biol.* **684**: p. 28-41.
53. Szabo, S.J., B.M. Sullivan, C. Stemann, A.R. Satoskar, et al. (2002). Distinct effects of T-bet in TH1 lineage commitment and IFN-gamma production in CD4 and CD8 T cells. *Science.* **295** (5553): p. 338-42.
54. Horvath, C.M. (2004). The Jak-STAT pathway stimulated by interferon gamma. *Sci STKE.* **2004** (260): p. tr8.
55. Abed, N.S., J.H. Chace, A.L. Fleming, and J.S. Cowdery (1994). Interferon-gamma regulation of B lymphocyte differentiation: activation of B cells is a prerequisite for IFN-gamma-mediated inhibition of B cell differentiation. *Cell Immunol.* **153** (2): p. 356-66.

56. Paul, W.E. and J. Zhu (2010). How are T(H)2-type immune responses initiated and amplified? *Nat Rev Immunol.* **10** (4): p. 225-35.
57. Zhu, J., H. Yamane, J. Cote-Sierra, L. Guo, et al. (2006). GATA-3 promotes Th2 responses through three different mechanisms: induction of Th2 cytokine production, selective growth of Th2 cells and inhibition of Th1 cell-specific factors. *Cell Res.* **16** (1): p. 3-10.
58. Luzina, I.G., A.D. Keegan, N.M. Heller, G.A. Rook, et al. (2012). Regulation of inflammation by interleukin-4: a review of "alternatives". *J Leukoc Biol.* **92** (4): p. 753-64.
59. Van Dyken, S.J. and R.M. Locksley (2013). Interleukin-4- and interleukin-13-mediated alternatively activated macrophages: roles in homeostasis and disease. *Annu Rev Immunol.* **31**: p. 317-43.
60. Kouro, T. and K. Takatsu (2009). IL-5- and eosinophil-mediated inflammation: from discovery to therapy. *Int Immunol.* **21** (12): p. 1303-9.
61. Magombedze, G., S. Eda and V.V. Ganusov (2014). Competition for antigen between Th1 and Th2 responses determines the timing of the immune response switch during *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis infection in ruminants. *PLoS Comput Biol.* **10** (1): p. e1003414.
62. Schmitt, E., M. Klein and T. Bopp (2014). Th9 cells, new players in adaptive immunity. *Trends Immunol.* **35** (2): p. 61-8.
63. Staudt, V., E. Bothur, M. Klein, K. Lingnau, et al. (2010). Interferon-regulatory factor 4 is essential for the developmental program of T helper 9 cells. *Immunity.* **33** (2): p. 192-202.
64. Licona-Limon, P., J. Henao-Mejia, A.U. Temann, N. Gagliani, et al. (2013). Th9 Cells Drive Host Immunity against Gastrointestinal Worm Infection. *Immunity.* **39** (4): p. 744-57.
65. Jager, A., V. Dardalhon, R.A. Sobel, E. Bettelli, et al. (2009). Th1, Th17, and Th9 effector cells induce experimental autoimmune encephalomyelitis with different pathological phenotypes. *J Immunol.* **183** (11): p. 7169-77.
66. Korn, T., E. Bettelli, M. Oukka, and V.K. Kuchroo (2009). IL-17 and Th17 Cells. *Annu Rev Immunol.* **27**: p. 485-517.
67. Stockinger, B., M. Veldhoen and B. Martin (2007). Th17 T cells: linking innate and adaptive immunity. *Semin Immunol.* **19** (6): p. 353-61.

68. Wei, L., A. Laurence, K.M. Elias, and J.J. O'Shea (2007). IL-21 is produced by Th17 cells and drives IL-17 production in a STAT3-dependent manner. *J Biol Chem.* **282** (48): p. 34605-10.
69. Liang, S.C., X.Y. Tan, D.P. Luxenberg, R. Karim, et al. (2006). Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides. *J Exp Med.* **203** (10): p. 2271-9.
70. Rincon, M. (2012). Special issue on interleukin-6 (IL-6). *Int J Biol Sci.* **8** (9): p. 1225-6.
71. Shi, Y. and J. Massague (2003). Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell.* **113** (6): p. 685-700.
72. Wang, Y., A.H. van Boxel-Dezaire, H. Cheon, J. Yang, et al. (2013). STAT3 activation in response to IL-6 is prolonged by the binding of IL-6 receptor to EGF receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **110** (42): p. 16975-80.
73. Yang, X.O., B.P. Pappu, R. Nurieva, A. Akimzhanov, et al. (2008). T helper 17 lineage differentiation is programmed by orphan nuclear receptors ROR alpha and ROR gamma. *Immunity.* **28** (1): p. 29-39.
74. Iwakura, Y. and H. Ishigame (2006). The IL-23/IL-17 axis in inflammation. *J Clin Invest.* **116** (5): p. 1218-22.
75. Wojkowska, D.W., P. Szpakowski, D. Ksiazek-Winiarek, M. Leszczynski, et al. (2014). Interactions between neutrophils, Th17 cells, and chemokines during the initiation of experimental model of multiple sclerosis. *Mediators Inflamm.* **2014**: p. 590409.
76. Mantovani, A., M.A. Cassatella, C. Costantini, and S. Jaillon (2011). Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol.* **11** (8): p. 519-31.
77. Marwaha, A.K., N.J. Leung, A.N. McMurchy, and M.K. Levings (2012). TH17 Cells in Autoimmunity and Immunodeficiency: Protective or Pathogenic? *Front Immunol.* **3**: p. 129.
78. Akdis, M., O. Palomares, W. van de Veen, M. van Splunter, et al. (2012). TH17 and TH22 cells: a confusion of antimicrobial response with tissue inflammation versus protection. *J Allergy Clin Immunol.* **129** (6): p. 1438-49; quiz1450-1.
79. Fujita, H. (2013). The role of IL-22 and Th22 cells in human skin diseases. *J Dermatol Sci.* **72** (1): p. 3-8.

80. Xie, Q., S.C. Wang and J. Li (2012). Interleukin 22, a potential therapeutic target for rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.* **39** (11): p. 2220; author reply 2221.
81. Acuto, O., V. Di Bartolo and F. Michel (2008). Tailoring T-cell receptor signals by proximal negative feedback mechanisms. *Nat Rev Immunol.* **8** (9): p. 699-712.
82. Mueller, S.N., T. Gebhardt, F.R. Carbone, and W.R. Heath (2013). Memory T cell subsets, migration patterns, and tissue residence. *Annu Rev Immunol.* **31**: p. 137-61.
83. Zielinski, C.E., D. Corti, F. Mele, D. Pinto, et al. (2011). Dissecting the human immunologic memory for pathogens. *Immunol Rev.* **240** (1): p. 40-51.
84. Sallusto, F., D. Lenig, R. Forster, M. Lipp, et al. (1999). Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature.* **401** (6754): p. 708-12.
85. Papadakis, K.A. and S.R. Targan (2000). The role of chemokines and chemokine receptors in mucosal inflammation. *Inflamm Bowel Dis.* **6** (4): p. 303-13.
86. MacDonald, T.T., G. Monteleone and S.L. Pender (2000). Recent developments in the immunology of inflammatory bowel disease. *Scand J Immunol.* **51** (1): p. 2-9.
87. Dinarello, C.A. (2000). Proinflammatory cytokines. *Chest.* **118** (2): p. 503-8.
88. Opal, S.M. and V.A. DePalo (2000). Anti-inflammatory cytokines. *Chest.* **117** (4): p. 1162-72.
89. Farrar, M.A. and R.D. Schreiber (1993). The molecular cell biology of interferon-gamma and its receptor. *Annu Rev Immunol.* **11**: p. 571-611.
90. Plataniias, L.C. (1995). Interferons: laboratory to clinic investigations. *Curr Opin Oncol.* **7** (6): p. 560-5.
91. Dinarello, C.A. (2009). Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annu Rev Immunol.* **27**: p. 519-50.
92. Dinarello, C.A. (1996). Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood.* **87** (6): p. 2095-147.
93. Garlanda, C., C.A. Dinarello and A. Mantovani (2013). The interleukin-1 family: back to the future. *Immunity.* **39** (6): p. 1003-18.
94. Kuziel, W.A. and W.C. Greene (1990). Interleukin-2 and the IL-2 receptor: new insights into structure and function. *J Invest Dermatol.* **94** (6 Suppl): p. 27S-32S.
95. Ortaldo, J.R., A.T. Mason, J.P. Gerard, L.E. Henderson, et al. (1984). Effects of natural and recombinant IL 2 on regulation of IFN gamma production and natural killer activity: lack of involvement of the Tac antigen for these immunoregulatory effects. *J Immunol.* **133** (2): p. 779-83.

96. Kelly-Welch, A., E.M. Hanson and A.D. Keegan (2005). Interleukin-4 (IL-4) pathway. *Sci STKE*. **2005** (293): p. cm9.
97. Lopez, A.F., C.J. Sanderson, J.R. Gamble, H.D. Campbell, et al. (1988). Recombinant human interleukin 5 is a selective activator of human eosinophil function. *J Exp Med*. **167** (1): p. 219-24.
98. Yamaguchi, Y., Y. Hayashi, Y. Sugama, Y. Miura, et al. (1988). Highly purified murine interleukin 5 (IL-5) stimulates eosinophil function and prolongs in vitro survival. IL-5 as an eosinophil chemotactic factor. *J Exp Med*. **167** (5): p. 1737-42.
99. Heinrich, P.C., I. Behrmann, S. Haan, H.M. Hermanns, et al. (2003). Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem J*. **374** (Pt 1): p. 1-20.
100. Jones, S.A. (2005). Directing transition from innate to acquired immunity: defining a role for IL-6. *J Immunol*. **175** (6): p. 3463-8.
101. Fischer, C.P. (2006). Interleukin-6 in acute exercise and training: what is the biological relevance? *Exerc Immunol Rev*. **12**: p. 6-33.
102. Rincon, M. (2012). Interleukin-6: from an inflammatory marker to a target for inflammatory diseases. *Trends Immunol*. **33** (11): p. 571-7.
103. Kolls, J.K. and A. Linden (2004). Interleukin-17 family members and inflammation. *Immunity*. **21** (4): p. 467-76.
104. Ivanov, S. and A. Linden (2009). Interleukin-17 as a drug target in human disease. *Trends Pharmacol Sci*. **30** (2): p. 95-103.
105. Gaffen, S.L. (2009). Structure and signalling in the IL-17 receptor family. *Nat Rev Immunol*. **9** (8): p. 556-67.
106. Chang, S.H., H. Park and C. Dong (2006). Act1 adaptor protein is an immediate and essential signaling component of interleukin-17 receptor. *J Biol Chem*. **281** (47): p. 35603-7.
107. Linden, A. (2007). A role for the cytoplasmic adaptor protein Act1 in mediating IL-17 signaling. *Sci STKE*. **2007** (398): p. re4.
108. Huang, F., C.Y. Kao, S. Wachi, P. Thai, et al. (2007). Requirement for both JAK-mediated PI3K signaling and ACT1/TRAF6/TAK1-dependent NF-kappaB activation by IL-17A in enhancing cytokine expression in human airway epithelial cells. *J Immunol*. **179** (10): p. 6504-13.

109. Komiyama, Y., S. Nakae, T. Matsuki, A. Nambu, et al. (2006). IL-17 plays an important role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol.* **177** (1): p. 566-73.
110. Uyttenhove, C., C. Sommereyns, I. Theate, T. Michiels, et al. (2007). Anti-IL-17A autovaccination prevents clinical and histological manifestations of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Ann N Y Acad Sci.* **1110**: p. 330-6.
111. Uyttenhove, C. and J. Van Snick (2006). Development of an anti-IL-17A auto-vaccine that prevents experimental auto-immune encephalomyelitis. *Eur J Immunol.* **36** (11): p. 2868-74.
112. Hofstetter, H.H., S.M. Ibrahim, D. Koczan, N. Kruse, et al. (2005). Therapeutic efficacy of IL-17 neutralization in murine experimental autoimmune encephalomyelitis. *Cell Immunol.* **237** (2): p. 123-30.
113. Ye, P., F.H. Rodriguez, S. Kanaly, K.L. Stocking, et al. (2001). Requirement of interleukin 17 receptor signaling for lung CXC chemokine and granulocyte colony-stimulating factor expression, neutrophil recruitment, and host defense. *J Exp Med.* **194** (4): p. 519-27.
114. Moseley, T.A., D.R. Haudenschild, L. Rose, and A.H. Reddi (2003). Interleukin-17 family and IL-17 receptors. *Cytokine Growth Factor Rev.* **14** (2): p. 155-74.
115. McGettrick, A.F. and L.A. O'Neill (2010). Localisation and trafficking of Toll-like receptors: an important mode of regulation. *Curr Opin Immunol.* **22** (1): p. 20-7.
116. Padovan, E., R.M. Landmann and G. De Libero (2007). How pattern recognition receptor triggering influences T cell responses: a new look into the system. *Trends Immunol.* **28** (7): p. 308-14.
117. Brown, G.D. (2006). Dectin-1: a signalling non-TLR pattern-recognition receptor. *Nat Rev Immunol.* **6** (1): p. 33-43.
118. Gordon, S. (2002). Pattern recognition receptors: doubling up for the innate immune response. *Cell.* **111** (7): p. 927-30.
119. Mogensen, T.H. (2009). Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses. *Clin Microbiol Rev.* **22** (2): p. 240-73, Table of Contents.
120. Shaw, P.J., M. Lamkanfi and T.D. Kanneganti (2010). NOD-like receptor (NLR) signaling beyond the inflammasome. *Eur J Immunol.* **40** (3): p. 624-7.
121. Kawai, T. and S. Akira (2006). TLR signaling. *Cell Death Differ.* **13** (5): p. 816-25.
122. Makela, S.M., M. Strengell, T.E. Pietila, P. Osterlund, et al. (2009). Multiple signaling pathways contribute to synergistic TLR ligand-dependent cytokine gene expression in

- human monocyte-derived macrophages and dendritic cells. *J Leukoc Biol.* **85** (4): p. 664-72.
123. Takeda, K. and S. Akira (2004). TLR signaling pathways. *Semin Immunol.* **16** (1): p. 3-9.
124. O'Neill, L.A., D. Golenbock and A.G. Bowie (2013). The history of Toll-like receptors - redefining innate immunity. *Nat Rev Immunol.* **13** (6): p. 453-60.
125. Kawai, T. and S. Akira (2011). Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. *Immunity.* **34** (5): p. 637-50.
126. Warner, N. and G. Nunez (2013). MyD88: a critical adaptor protein in innate immunity signal transduction. *J Immunol.* **190** (1): p. 3-4.
127. Sun, Z. and R. Andersson (2002). NF-kappaB activation and inhibition: a review. *Shock.* **18** (2): p. 99-106.
128. Horng, T., G.M. Barton and R. Medzhitov (2001). TIRAP: an adapter molecule in the Toll signaling pathway. *Nat Immunol.* **2** (9): p. 835-41.
129. Piras, V. and K. Selvarajoo (2014). Beyond MyD88 and TRIF Pathways in Toll-Like Receptor Signaling. *Front Immunol.* **5**: p. 70.
130. Yamamoto, M., S. Sato, H. Hemmi, K. Hoshino, et al. (2003). Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science.* **301** (5633): p. 640-3.
131. Yamamoto, M., S. Sato, H. Hemmi, S. Uematsu, et al. (2003). TRAM is specifically involved in the Toll-like receptor 4-mediated MyD88-independent signaling pathway. *Nat Immunol.* **4** (11): p. 1144-50.
132. Iwami, K.I., T. Matsuguchi, A. Masuda, T. Kikuchi, et al. (2000). Cutting edge: naturally occurring soluble form of mouse Toll-like receptor 4 inhibits lipopolysaccharide signaling. *J Immunol.* **165** (12): p. 6682-6.
133. LeBouder, E., J.E. Rey-Nores, N.K. Rushmere, M. Grigorov, et al. (2003). Soluble forms of Toll-like receptor (TLR)2 capable of modulating TLR2 signaling are present in human plasma and breast milk. *J Immunol.* **171** (12): p. 6680-9.
134. Lang, T. and A. Mansell (2007). The negative regulation of Toll-like receptor and associated pathways. *Immunol Cell Biol.* **85** (6): p. 425-34.
135. Sollberger, G., G.E. Strittmatter, M. Garstkiewicz, J. Sand, et al. (2014). Caspase-1: the inflammasome and beyond. *Innate Immun.* **20** (2): p. 115-25.

136. Tschopp, J. and K. Schroder (2010). NLRP3 inflammasome activation: The convergence of multiple signalling pathways on ROS production? *Nat Rev Immunol.* **10** (3): p. 210-5.
137. Latz, E. (2010). The inflammasomes: mechanisms of activation and function. *Curr Opin Immunol.* **22** (1): p. 28-33.
138. Franchi, L., R. Munoz-Planillo and G. Nunez (2012). Sensing and reacting to microbes through the inflammasomes. *Nat Immunol.* **13** (4): p. 325-32.
139. Lamkanfi, M., T.D. Kanneganti, L. Franchi, and G. Nunez (2007). Caspase-1 inflammasomes in infection and inflammation. *J Leukoc Biol.* **82** (2): p. 220-5.
140. Tang, D., R. Kang, C.B. Coyne, H.J. Zeh, et al. (2012). PAMPs and DAMPs: signal 0s that spur autophagy and immunity. *Immunol Rev.* **249** (1): p. 158-75.
141. Klune, J.R., R. Dhupar, J. Cardinal, T.R. Billiar, et al. (2008). HMGB1: endogenous danger signaling. *Mol Med.* **14** (7-8): p. 476-84.
142. Jounai, N., K. Kobiyama, F. Takeshita, and K.J. Ishii (2012). Recognition of damage-associated molecular patterns related to nucleic acids during inflammation and vaccination. *Front Cell Infect Microbiol.* **2**: p. 168.
143. Carta, S., P. Castellani, L. Delfino, S. Tassi, et al. (2009). DAMPs and inflammatory processes: the role of redox in the different outcomes. *J Leukoc Biol.* **86** (3): p. 549-55.
144. Hornung, V., F. Bauernfeind, A. Halle, E.O. Samstad, et al. (2008). Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization. *Nat Immunol.* **9** (8): p. 847-56.
145. Artavanis-Tsakonas, S., M.D. Rand and R.J. Lake (1999). Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science.* **284** (5415): p. 770-6.
146. Milner, L.A. and A. Bigas (1999). Notch as a mediator of cell fate determination in hematopoiesis: evidence and speculation. *Blood.* **93** (8): p. 2431-48.
147. Fortini, M.E. (2009). Notch signaling: the core pathway and its posttranslational regulation. *Dev Cell.* **16** (5): p. 633-47.
148. Fiuza, U.M. and A.M. Arias (2007). Cell and molecular biology of Notch. *J Endocrinol.* **194** (3): p. 459-74.
149. Amsen, D., J.M. Blander, G.R. Lee, K. Tanigaki, et al. (2004). Instruction of distinct CD4 T helper cell fates by different notch ligands on antigen-presenting cells. *Cell.* **117** (4): p. 515-26.

150. Walker, L., A. Carlson, H.T. Tan-Pertel, G. Weinmaster, et al. (2001). The notch receptor and its ligands are selectively expressed during hematopoietic development in the mouse. *Stem Cells*. **19** (6): p. 543-52.
151. Adler, S.H., E. Chiffolleau, L. Xu, N.M. Dalton, et al. (2003). Notch signaling augments T cell responsiveness by enhancing CD25 expression. *J Immunol*. **171** (6): p. 2896-903.
152. Palaga, T., L. Miele, T.E. Golde, and B.A. Osborne (2003). TCR-mediated Notch signaling regulates proliferation and IFN-gamma production in peripheral T cells. *J Immunol*. **171** (6): p. 3019-24.
153. Maekawa, Y., S. Tsukumo, S. Chiba, H. Hirai, et al. (2003). Delta1-Notch3 interactions bias the functional differentiation of activated CD4+ T cells. *Immunity*. **19** (4): p. 549-59.
154. Amsen, D., A. Antov, D. Jankovic, A. Sher, et al. (2007). Direct regulation of Gata3 expression determines the T helper differentiation potential of Notch. *Immunity*. **27** (1): p. 89-99.
155. Rashedi, I., S. Panigrahi, P. Ezzati, S. Ghavami, et al. (2007). Autoimmunity and apoptosis--therapeutic implications. *Curr Med Chem*. **14** (29): p. 3139-51.
156. Mackay, I.R. and M.E. Gershwin (1997). The nature of autoimmune disease. *Semin Liver Dis*. **17** (1): p. 3-11.
157. Kawakami, N., I. Bartholomaeus, M. Pesic, and M. Mues (2012). An autoimmunity odyssey: how autoreactive T cells infiltrate into the CNS. *Immunol Rev*. **248** (1): p. 140-55.
158. Korganow, A.S., H. Ji, S. Mangialaio, V. Duchatelle, et al. (1999). From systemic T cell self-reactivity to organ-specific autoimmune disease via immunoglobulins. *Immunity*. **10** (4): p. 451-61.
159. Cardenas-Roldan, J., A. Rojas-Villarraga and J.M. Anaya (2013). How do autoimmune diseases cluster in families? A systematic review and meta-analysis. *BMC Med*. **11**: p. 73.
160. Gold, R., C. Linington and H. Lassmann (2006). Understanding pathogenesis and therapy of multiple sclerosis via animal models: 70 years of merits and culprits in experimental autoimmune encephalomyelitis research. *Brain*. **129** (Pt 8): p. 1953-71.
161. Fletcher, J.M., S.J. Lalor, C.M. Sweeney, N. Tubridy, et al. (2010). T cells in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *Clin Exp Immunol*. **162** (1): p. 1-11.

162. Kuhlmann, T., G. Lingfeld, A. Bitsch, J. Schuchardt, et al. (2002). Acute axonal damage in multiple sclerosis is most extensive in early disease stages and decreases over time. *Brain*. **125** (Pt 10): p. 2202-12.
163. Popescu, B.F., I. Pirko and C.F. Lucchinetti (2013). Pathology of multiple sclerosis: where do we stand? *Continuum (Minneapolis Minn)*. **19** (4 Multiple Sclerosis): p. 901-21.
164. Popescu, B.F. and C.F. Lucchinetti (2012). Pathology of demyelinating diseases. *Annu Rev Pathol*. **7**: p. 185-217.
165. Kidd, D., F. Barkhof, R. McConnell, P.R. Algra, et al. (1999). Cortical lesions in multiple sclerosis. *Brain*. **122** ( Pt 1): p. 17-26.
166. Martin, R., H.F. McFarland and D.E. McFarlin (1992). Immunological aspects of demyelinating diseases. *Annu Rev Immunol*. **10**: p. 153-87.
167. Martin, R. and H.F. McFarland (1995). Immunological aspects of experimental allergic encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Crit Rev Clin Lab Sci*. **32** (2): p. 121-82.
168. de Vos, A.F., M. van Meurs, H.P. Brok, L.A. Boven, et al. (2002). Transfer of central nervous system autoantigens and presentation in secondary lymphoid organs. *J Immunol*. **169** (10): p. 5415-23.
169. Wucherpfennig, K.W. and J.L. Strominger (1995). Molecular mimicry in T cell-mediated autoimmunity: viral peptides activate human T cell clones specific for myelin basic protein. *Cell*. **80** (5): p. 695-705.
170. Chitnis, T. (2007). The role of CD4 T cells in the pathogenesis of multiple sclerosis. *Int Rev Neurobiol*. **79**: p. 43-72.
171. Boccaccio, G.L. and L. Steinman (1996). Multiple sclerosis: from a myelin point of view. *J Neurosci Res*. **45** (6): p. 647-54.
172. Goverman, J. (2009). Autoimmune T cell responses in the central nervous system. *Nat Rev Immunol*. **9** (6): p. 393-407.
173. Bo, L., S. Mork, P.A. Kong, H. Nyland, et al. (1994). Detection of MHC class II-antigens on macrophages and microglia, but not on astrocytes and endothelia in active multiple sclerosis lesions. *J Neuroimmunol*. **51** (2): p. 135-46.
174. de Rosbo, N.K. and A. Ben-Nun (1998). T-cell responses to myelin antigens in multiple sclerosis; relevance of the predominant autoimmune reactivity to myelin oligodendrocyte glycoprotein. *J Autoimmun*. **11** (4): p. 287-99.
175. Stinissen, P. and N. Hellings (2008). Activation of myelin reactive T cells in multiple sclerosis: a possible role for T cell degeneracy? *Eur J Immunol*. **38** (5): p. 1190-3.

176. Ballabh, P., A. Braun and M. Nedergaard (2004). The blood-brain barrier: an overview: structure, regulation, and clinical implications. *Neurobiol Dis.* **16** (1): p. 1-13.
177. Engelhardt, B. (2008). Immune cell entry into the central nervous system: involvement of adhesion molecules and chemokines. *J Neurol Sci.* **274** (1-2): p. 23-6.
178. Correale, J. and A. Villa (2007). The blood-brain-barrier in multiple sclerosis: functional roles and therapeutic targeting. *Autoimmunity.* **40** (2): p. 148-60.
179. Kieseier, B.C., R. Kiefer, J.M. Clements, K. Miller, et al. (1998). Matrix metalloproteinase-9 and -7 are regulated in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain.* **121** ( Pt 1): p. 159-66.
180. Wingerchuk, D.M., C.F. Lucchinetti and J.H. Noseworthy (2001). Multiple sclerosis: current pathophysiological concepts. *Lab Invest.* **81** (3): p. 263-81.
181. Merrill, J.E. (1992). Proinflammatory and antiinflammatory cytokines in multiple sclerosis and central nervous system acquired immunodeficiency syndrome. *J Immunother (1991).* **12** (3): p. 167-70.
182. Nikbin, B., M.M. Bonab, F. Khosravi, and F. Talebian (2007). Role of B cells in pathogenesis of multiple sclerosis. *Int Rev Neurobiol.* **79**: p. 13-42.
183. Tzartos, J.S., M.A. Friese, M.J. Craner, J. Palace, et al. (2008). Interleukin-17 production in central nervous system-infiltrating T cells and glial cells is associated with active disease in multiple sclerosis. *Am J Pathol.* **172** (1): p. 146-55.
184. Friese, M.A. and L. Fugger (2005). Autoreactive CD8<sup>+</sup> T cells in multiple sclerosis: a new target for therapy? *Brain.* **128** (Pt 8): p. 1747-63.
185. Lassmann, H., J. van Horssen and D. Mahad (2012). Progressive multiple sclerosis: pathology and pathogenesis. *Nat Rev Neurol.* **8** (11): p. 647-56.
186. Bettelli, E., M. Oukka and V.K. Kuchroo (2007). T(H)-17 cells in the circle of immunity and autoimmunity. *Nat Immunol.* **8** (4): p. 345-50.
187. Harrington, L.E., R.D. Hatton, P.R. Mangan, H. Turner, et al. (2005). Interleukin 17-producing CD4<sup>+</sup> effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol.* **6** (11): p. 1123-32.
188. Park, H., Z. Li, X.O. Yang, S.H. Chang, et al. (2005). A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol.* **6** (11): p. 1133-41.
189. Jadidi-Niaragh, F. and A. Mirshafiey (2011). Th17 cell, the new player of neuroinflammatory process in multiple sclerosis. *Scand J Immunol.* **74** (1): p. 1-13.

190. Silhavy, T.J., D. Kahne and S. Walker (2010). The bacterial cell envelope. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* **2** (5): p. a000414.
191. Sekirov, I., S.L. Russell, L.C. Antunes, and B.B. Finlay (2010). Gut microbiota in health and disease. *Physiol Rev.* **90** (3): p. 859-904.
192. Evans, C.A., W.M. Smith, E.A. Johnston, and E.R. Gillebert (1950). Bacterial flora of the normal human skin. *J Invest Dermatol.* **15** (4): p. 305-24.
193. Monack, D.M., A. Mueller and S. Falkow (2004). Persistent bacterial infections: the interface of the pathogen and the host immune system. *Nat Rev Microbiol.* **2** (9): p. 747-65.
194. Angus, D.C. and T. van der Poll (2013). Severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med.* **369** (21): p. 2063.
195. Stearns-Kurosawa, D.J., M.F. Osuchowski, C. Valentine, S. Kurosawa, et al. (2011). The pathogenesis of sepsis. *Annu Rev Pathol.* **6**: p. 19-48.
196. Nataro, J.P. and J.B. Kaper (1998). Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev.* **11** (1): p. 142-201.
197. Kusters, J.G., A.H. van Vliet and E.J. Kuipers (2006). Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Clin Microbiol Rev.* **19** (3): p. 449-90.
198. Low, J.C. and W. Donachie (1997). A review of *Listeria monocytogenes* and listeriosis. *Vet J.* **153** (1): p. 9-29.
199. Newton, H.J., D.K. Ang, I.R. van Driel, and E.L. Hartland (2010). Molecular pathogenesis of infections caused by *Legionella pneumophila*. *Clin Microbiol Rev.* **23** (2): p. 274-98.
200. Hawrelak, J.A., D.L. Whitten and S.P. Myers (2005). Is *Lactobacillus rhamnosus* GG effective in preventing the onset of antibiotic-associated diarrhoea: a systematic review. *Digestion.* **72** (1): p. 51-6.
201. Rottem, S. (2003). Interaction of mycoplasmas with host cells. *Physiol Rev.* **83** (2): p. 417-32.
202. Gellatly, S.L. and R.E. Hancock (2013). *Pseudomonas aeruginosa*: new insights into pathogenesis and host defenses. *Pathog Dis.* **67** (3): p. 159-73.
203. Yilmaz, O. (2008). The chronicles of *Porphyromonas gingivalis*: the microbium, the human oral epithelium and their interplay. *Microbiology.* **154** (Pt 10): p. 2897-903.
204. Plata, K., A.E. Rosato and G. Wegrzyn (2009). *Staphylococcus aureus* as an infectious agent: overview of biochemistry and molecular genetics of its pathogenicity. *Acta Biochim Pol.* **56** (4): p. 597-612.

205. Kadioglu, A., J.N. Weiser, J.C. Paton, and P.W. Andrew (2008). The role of *Streptococcus pneumoniae* virulence factors in host respiratory colonization and disease. *Nat Rev Microbiol.* **6** (4): p. 288-301.
206. Lovering, A.L., S.S. Safadi and N.C. Strynadka (2012). Structural perspective of peptidoglycan biosynthesis and assembly. *Annu Rev Biochem.* **81**: p. 451-78.
207. Takeuchi, O., K. Hoshino, T. Kawai, H. Sanjo, et al. (1999). Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity.* **11** (4): p. 443-51.
208. Travassos, L.H., S.E. Girardin, D.J. Philpott, D. Blanot, et al. (2004). Toll-like receptor 2-dependent bacterial sensing does not occur via peptidoglycan recognition. *EMBO Rep.* **5** (10): p. 1000-6.
209. Girardin, S.E., L.H. Travassos, M. Herve, D. Blanot, et al. (2003). Peptidoglycan molecular requirements allowing detection by Nod1 and Nod2. *J Biol Chem.* **278** (43): p. 41702-8.
210. Dziarski, R. (2004). Peptidoglycan recognition proteins (PGRPs). *Mol Immunol.* **40** (12): p. 877-86.
211. Girardin, S.E. and D.J. Philpott (2004). Mini-review: the role of peptidoglycan recognition in innate immunity. *Eur J Immunol.* **34** (7): p. 1777-82.
212. Philpott, D.J. and S.E. Girardin (2004). The role of Toll-like receptors and Nod proteins in bacterial infection. *Mol Immunol.* **41** (11): p. 1099-108.
213. Ginsburg, I. (2002). Role of lipoteichoic acid in infection and inflammation. *Lancet Infect Dis.* **2** (3): p. 171-9.
214. Schwandner, R., R. Dziarski, H. Wesche, M. Rothe, et al. (1999). Peptidoglycan- and lipoteichoic acid-induced cell activation is mediated by toll-like receptor 2. *J Biol Chem.* **274** (25): p. 17406-9.
215. Schroder, N.W., S. Morath, C. Alexander, L. Hamann, et al. (2003). Lipoteichoic acid (LTA) of *Streptococcus pneumoniae* and *Staphylococcus aureus* activates immune cells via Toll-like receptor (TLR)-2, lipopolysaccharide-binding protein (LBP), and CD14, whereas TLR-4 and MD-2 are not involved. *J Biol Chem.* **278** (18): p. 15587-94.
216. Hummell, D.S. and J.A. Winkelstein (1986). Bacterial lipoteichoic acid sensitizes host cells for destruction by autologous complement. *J Clin Invest.* **77** (5): p. 1533-8.
217. Wicken, A.J. and K.W. Knox (1975). Lipoteichoic acids: a new class of bacterial antigen. *Science.* **187** (4182): p. 1161-7.

218. Miller, S.I., R.K. Ernst and M.W. Bader (2005). LPS, TLR4 and infectious disease diversity. *Nat Rev Microbiol.* **3** (1): p. 36-46.
219. Raetz, C.R. and C. Whitfield (2002). Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu Rev Biochem.* **71**: p. 635-700.
220. Andreakos, E., S.M. Sacre, C. Smith, A. Lundberg, et al. (2004). Distinct pathways of LPS-induced NF-kappa B activation and cytokine production in human myeloid and nonmyeloid cells defined by selective utilization of MyD88 and Mal/TIRAP. *Blood.* **103** (6): p. 2229-37.
221. Jiang, Z., P. Georgel, X. Du, L. Shamel, et al. (2005). CD14 is required for MyD88-independent LPS signaling. *Nat Immunol.* **6** (6): p. 565-70.
222. Ramos, H.C., M. Rumbo and J.C. Sirard (2004). Bacterial flagellins: mediators of pathogenicity and host immune responses in mucosa. *Trends Microbiol.* **12** (11): p. 509-17.
223. Hayashi, F., K.D. Smith, A. Ozinsky, T.R. Hawn, et al. (2001). The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature.* **410** (6832): p. 1099-103.
224. Mizel, S.B., A.N. Honko, M.A. Moors, P.S. Smith, et al. (2003). Induction of macrophage nitric oxide production by Gram-negative flagellin involves signaling via heteromeric Toll-like receptor 5/Toll-like receptor 4 complexes. *J Immunol.* **170** (12): p. 6217-23.
225. Zhao, Y., J. Yang, J. Shi, Y.N. Gong, et al. (2011). The NLRC4 inflammasome receptors for bacterial flagellin and type III secretion apparatus. *Nature.* **477** (7366): p. 596-600.
226. Schuster, M., D.J. Sexton, S.P. Diggle, and E.P. Greenberg (2013). Acyl-homoserine lactone quorum sensing: from evolution to application. *Annu Rev Microbiol.* **67**: p. 43-63.
227. Waters, C.M. and B.L. Bassler (2005). Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. *Annu Rev Cell Dev Biol.* **21**: p. 319-46.
228. Sifri, C.D. (2008). Healthcare epidemiology: quorum sensing: bacteria talk sense. *Clin Infect Dis.* **47** (8): p. 1070-6.
229. Winzer, K., C. Falconer, N.C. Garber, S.P. Diggle, et al. (2000). The *Pseudomonas aeruginosa* lectins PA-IL and PA-IIL are controlled by quorum sensing and by RpoS. *J Bacteriol.* **182** (22): p. 6401-11.

230. Sharon, N. and H. Lis (2004). History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. *Glycobiology*. **14** (11): p. 53R-62R.
231. Dodd, R.B. and K. Drickamer (2001). Lectin-like proteins in model organisms: implications for evolution of carbohydrate-binding activity. *Glycobiology*. **11** (5): p. 71R-9R.
232. Murphy, J.R. (2011). Mechanism of diphtheria toxin catalytic domain delivery to the eukaryotic cell cytosol and the cellular factors that directly participate in the process. *Toxins (Basel)*. **3** (3): p. 294-308.
233. Pappenheimer, A.M., Jr. (1977). Diphtheria toxin. *Annu Rev Biochem*. **46**: p. 69-94.
234. Wick, M.J., D.W. Frank, D.G. Storey, and B.H. Iglewski (1990). Structure, function, and regulation of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A. *Annu Rev Microbiol*. **44**: p. 335-63.
235. Wang, H.X., M. Liu, S.Y. Weng, J.J. Li, et al. (2012). Immune mechanisms of Concanavalin A model of autoimmune hepatitis. *World J Gastroenterol*. **18** (2): p. 119-25.
236. McIntosh, M., B.A. Stone and V.A. Stanisich (2005). Curdlan and other bacterial (1-->3)-beta-D-glucans. *Appl Microbiol Biotechnol*. **68** (2): p. 163-73.
237. Goodridge, H.S., A.J. Wolf and D.M. Underhill (2009). Beta-glucan recognition by the innate immune system. *Immunol Rev*. **230** (1): p. 38-50.
238. Kankkunen, P., L. Teirila, J. Rintahaka, H. Alenius, et al. (2010). (1,3)-beta-glucans activate both dectin-1 and NLRP3 inflammasome in human macrophages. *J Immunol*. **184** (11): p. 6335-42.
239. Miller, R.L., J.F. Gerster, M.L. Owens, H.B. Slade, et al. (1999). Imiquimod applied topically: a novel immune response modifier and new class of drug. *Int J Immunopharmacol*. **21** (1): p. 1-14.
240. Ma, F., J. Zhang and C. Zhang (2010). The TLR7 agonists imiquimod and gardiquimod improve DC-based immunotherapy for melanoma in mice. *Cell Mol Immunol*. **7** (5): p. 381-8.
241. Schon, M.P. and M. Schon (2008). TLR7 and TLR8 as targets in cancer therapy. *Oncogene*. **27** (2): p. 190-9.
242. Gupta, A.K., V. Davey and H. McPhail (2005). Evaluation of the effectiveness of imiquimod and 5-fluorouracil for the treatment of actinic keratosis: Critical review and meta-analysis of efficacy studies. *J Cutan Med Surg*. **9** (5): p. 209-14.

243. Lee, J., T.H. Chuang, V. Redecke, L. She, et al. (2003). Molecular basis for the immunostimulatory activity of guanine nucleoside analogs: activation of Toll-like receptor 7. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **100** (11): p. 6646-51.
244. Li, H., S.B. Willingham, J.P. Ting, and F. Re (2008). Cutting edge: inflammasome activation by alum and alum's adjuvant effect are mediated by NLRP3. *J Immunol*. **181** (1): p. 17-21.
245. Dostert, C., G. Guarda, J.F. Romero, P. Menu, et al. (2009). Malarial hemozoin is a Nalp3 inflammasome activating danger signal. *PLoS One*. **4** (8): p. e6510.
246. Waite, J.C. and D. Skokos (2012). Th17 response and inflammatory autoimmune diseases. *Int J Inflam*. **2012**: p. 819467.
247. Haak, S., A.L. Croxford, K. Kreymborg, F.L. Heppner, et al. (2009). IL-17A and IL-17F do not contribute vitally to autoimmune neuro-inflammation in mice. *J Clin Invest*. **119** (1): p. 61-9.
248. van de Veerdonk, F.L., M.S. Gresnigt, B.J. Kullberg, J.W. van der Meer, et al. (2009). Th17 responses and host defense against microorganisms: an overview. *BMB Rep*. **42** (12): p. 776-87.
249. Hofstetter, H.H., F. Luhder, K.V. Toyka, and R. Gold (2006). IL-17 production by thymocytes upon CD3 stimulation and costimulation with microbial factors. *Cytokine*. **34** (3-4): p. 184-97.
250. Kim, J.S., J.E. Smith-Garvin, G.A. Koretzky, and M.S. Jordan (2011). The requirements for natural Th17 cell development are distinct from those of conventional Th17 cells. *J Exp Med*. **208** (11): p. 2201-7.
251. Kim, J.S., T. Sklarz, L.B. Banks, M. Gohil, et al. (2013). Natural and inducible TH17 cells are regulated differently by Akt and mTOR pathways. *Nat Immunol*. **14** (6): p. 611-8.
252. Lutz, M.B., N. Kukutsch, A.L. Ogilvie, S. Rossner, et al. (1999). An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. *J Immunol Methods*. **223** (1): p. 77-92.
253. Pino, P.A. and A.E. Cardona (2011). Isolation of brain and spinal cord mononuclear cells using percoll gradients. *J Vis Exp* (48).
254. Rangachari, M. and V.K. Kuchroo (2013). Using EAE to better understand principles of immune function and autoimmune pathology. *J Autoimmun*. **45**: p. 31-9.
255. Miller, S.D., W.J. Karpus and T.S. Davidson (2010). Experimental autoimmune encephalomyelitis in the mouse. *Curr Protoc Immunol*. **Chapter 15**: p. Unit 15 1.

256. Constantinescu, C.S., N. Farooqi, K. O'Brien, and B. Gran (2011). Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) as a model for multiple sclerosis (MS). *Br J Pharmacol.* **164** (4): p. 1079-106.
257. Hofstetter, H.H., C.L. Shive and T.G. Forsthuber (2002). Pertussis toxin modulates the immune response to neuroantigens injected in incomplete Freund's adjuvant: induction of Th1 cells and experimental autoimmune encephalomyelitis in the presence of high frequencies of Th2 cells. *J Immunol.* **169** (1): p. 117-25.
258. Flierl, M.A., D. Rittirsch, H. Gao, L.M. Hoesel, et al. (2008). Adverse functions of IL-17A in experimental sepsis. *FASEB J.* **22** (7): p. 2198-205.
259. Cua, D.J. and C.M. Tato (2010). Innate IL-17-producing cells: the sentinels of the immune system. *Nat Rev Immunol.* **10** (7): p. 479-89.
260. Marks, B.R., H.N. Nowyhed, J.Y. Choi, A.C. Poholek, et al. (2009). Thymic self-reactivity selects natural interleukin 17-producing T cells that can regulate peripheral inflammation. *Nat Immunol.* **10** (10): p. 1125-32.
261. Tanaka, S., T. Yoshimoto, T. Naka, S. Nakae, et al. (2009). Natural occurring IL-17 producing T cells regulate the initial phase of neutrophil mediated airway responses. *J Immunol.* **183** (11): p. 7523-30.
262. Billard, M.J., A.L. Gruver and G.D. Sempowski (2011). Acute endotoxin-induced thymic atrophy is characterized by intrathymic inflammatory and wound healing responses. *PLoS One.* **6** (3): p. e17940.
263. Wang, S.D., K.J. Huang, Y.S. Lin, and H.Y. Lei (1994). Sepsis-induced apoptosis of the thymocytes in mice. *J Immunol.* **152** (10): p. 5014-21.
264. Kimura, A. and T. Kishimoto (2010). IL-6: regulator of Treg/Th17 balance. *Eur J Immunol.* **40** (7): p. 1830-5.
265. Smolianov, V., T. Dehmel, B.C. Kieseier, B. Hemmer, et al. (2012). Ex vivo activation of naturally occurring IL-17-producing T cells does not require IL-6. *Cytokine.* **58** (2): p. 231-7.
266. Abe, R., S. Oda, T. Sadahiro, M. Nakamura, et al. (2010). Gram-negative bacteremia induces greater magnitude of inflammatory response than Gram-positive bacteremia. *Crit Care.* **14** (2): p. R27.
267. Alexandraki, I. and C. Palacio (2010). Gram-negative versus Gram-positive bacteremia: what is more alarmin(g)? *Crit Care.* **14** (3): p. 161.
268. Percy, M.G. and A. Grundling (2014). Lipoteichoic Acid synthesis and function in gram-positive bacteria. *Annu Rev Microbiol.* **68**: p. 81-100.

269. Butler, N.S., M.M. Monick, T.O. Yarovinsky, L.S. Powers, et al. (2002). Altered IL-4 mRNA stability correlates with Th1 and Th2 bias and susceptibility to hypersensitivity pneumonitis in two inbred strains of mice. *J Immunol.* **169** (7): p. 3700-9.
270. Mitaka, K., Y. Miyazaki, M. Yasui, M. Furuie, et al. (2011). Th2-biased immune responses are important in a murine model of chronic hypersensitivity pneumonitis. *Int Arch Allergy Immunol.* **154** (3): p. 264-74.
271. Schoenborn, J.R. and C.B. Wilson (2007). Regulation of interferon-gamma during innate and adaptive immune responses. *Adv Immunol.* **96**: p. 41-101.
272. Scheller, J., A. Chalaris, D. Schmidt-Arras, and S. Rose-John (2011). The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochim Biophys Acta.* **1813** (5): p. 878-88.
273. Luckheeram, R.V., R. Zhou, A.D. Verma, and B. Xia (2012). CD4(+)T cells: differentiation and functions. *Clin Dev Immunol.* **2012**: p. 925135.
274. Andersson, E.R., R. Sandberg and U. Lendahl (2011). Notch signaling: simplicity in design, versatility in function. *Development.* **138** (17): p. 3593-612.
275. Jurynczyk, M. and K. Selmaj (2010). Notch: a new player in MS mechanisms. *J Neuroimmunol.* **218** (1-2): p. 3-11.
276. Vollmer, W., D. Blanot and M.A. de Pedro (2008). Peptidoglycan structure and architecture. *FEMS Microbiol Rev.* **32** (2): p. 149-67.
277. Johannsen, L. (1993). Biological properties of bacterial peptidoglycan. *APMIS.* **101** (5): p. 337-44.
278. Long, E.M., B. Millen, P. Kubes, and S.M. Robbins (2009). Lipoteichoic acid induces unique inflammatory responses when compared to other toll-like receptor 2 ligands. *PLoS One.* **4** (5): p. e5601.
279. Ellingsen, E., S. Morath, T. Flo, A. Schromm, et al. (2002). Induction of cytokine production in human T cells and monocytes by highly purified lipoteichoic acid: involvement of Toll-like receptors and CD14. *Med Sci Monit.* **8** (5): p. BR149-56.
280. Honko, A.N. and S.B. Mizel (2005). Effects of flagellin on innate and adaptive immunity. *Immunol Res.* **33** (1): p. 83-101.
281. Lu, Y.C., W.C. Yeh and P.S. Ohashi (2008). LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine.* **42** (2): p. 145-51.
282. Rossol, M., H. Heine, U. Meusch, D. Quandt, et al. (2011). LPS-induced cytokine production in human monocytes and macrophages. *Crit Rev Immunol.* **31** (5): p. 379-446.

283. Rutherford, S.T. and B.L. Bassler (2012). Bacterial quorum sensing: its role in virulence and possibilities for its control. *Cold Spring Harb Perspect Med.* **2** (11).
284. Ritchie, A.J., A. Jansson, J. Stallberg, P. Nilsson, et al. (2005). The *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing molecule N-3-(oxododecanoyl)-L-homoserine lactone inhibits T-cell differentiation and cytokine production by a mechanism involving an early step in T-cell activation. *Infect Immun.* **73** (3): p. 1648-55.
285. Hadfield, T.L., P. McEvoy, Y. Polotsky, V.A. Tzinslerling, et al. (2000). The pathology of diphtheria. *J Infect Dis.* **181 Suppl 1**: p. S116-20.
286. Wolf, P. and U. Elsasser-Beile (2009). *Pseudomonas* exotoxin A: from virulence factor to anti-cancer agent. *Int J Med Microbiol.* **299** (3): p. 161-76.
287. Kimata, Y. and K. Kohno (1994). Elongation factor 2 mutants deficient in diphthamide formation show temperature-sensitive cell growth. *J Biol Chem.* **269** (18): p. 13497-501.
288. Cha, J.H., M.Y. Chang, J.A. Richardson, and L. Eidels (2003). Transgenic mice expressing the diphtheria toxin receptor are sensitive to the toxin. *Mol Microbiol.* **49** (1): p. 235-40.
289. Meyer Zu Horste, G., A.L. Zozulya, H. El-Haddad, H.C. Lehmann, et al. (2010). Active immunization induces toxicity of diphtheria toxin in diphtheria resistant mice--implications for neuroinflammatory models. *J Immunol Methods.* **354** (1-2): p. 80-4.
290. Schultz, M.J., P. Speelman, S.A. Zaat, C.E. Hack, et al. (2000). The effect of *Pseudomonas* exotoxin A on cytokine production in whole blood exposed to *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Immunol Med Microbiol.* **29** (3): p. 227-32.
291. Chemani, C., A. Imberty, S. de Bentzmann, M. Pierre, et al. (2009). Role of LecA and LecB lectins in *Pseudomonas aeruginosa*-induced lung injury and effect of carbohydrate ligands. *Infect Immun.* **77** (5): p. 2065-75.
292. Funken, H., K.M. Bartels, S. Wilhelm, M. Brocker, et al. (2012). Specific association of lectin LecB with the surface of *Pseudomonas aeruginosa*: role of outer membrane protein OprF. *PLoS One.* **7** (10): p. e46857.
293. Moller, S.A., L. Danielsson and C.A. Borrebaeck (1986). Concanavalin A-induced B-cell proliferation mediated by allogeneically derived helper factors. *Immunology.* **57** (3): p. 387-93.
294. Palacios, R. (1982). Concanavalin A triggers T lymphocytes by directly interacting with their receptors for activation. *J Immunol.* **128** (1): p. 337-42.

295. Tiegs, G., J. Hentschel and A. Wendel (1992). A T cell-dependent experimental liver injury in mice inducible by concanavalin A. *J Clin Invest.* **90** (1): p. 196-203.
296. Gantner, F., M. Leist, A.W. Lohse, P.G. Germann, et al. (1995). Concanavalin A-induced T-cell-mediated hepatic injury in mice: the role of tumor necrosis factor. *Hepatology.* **21** (1): p. 190-8.
297. Kusters, S., F. Gantner, G. Kunstle, and G. Tiegs (1996). Interferon gamma plays a critical role in T cell-dependent liver injury in mice initiated by concanavalin A. *Gastroenterology.* **111** (2): p. 462-71.
298. Evans-Osses, I., I. de Messias-Reason and M.I. Ramirez (2013). The emerging role of complement lectin pathway in trypanosomatids: molecular bases in activation, genetic deficiencies, susceptibility to infection, and complement system-based therapeutics. *ScientificWorldJournal.* **2013**: p. 675898.
299. Gabor, F., E. Bogner, A. Weissenboeck, and M. Wirth (2004). The lectin-cell interaction and its implications to intestinal lectin-mediated drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev.* **56** (4): p. 459-80.
300. Elmore, S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol.* **35** (4): p. 495-516.
301. Martinon, F. and J. Tschopp (2004). Inflammatory caspases: linking an intracellular innate immune system to autoinflammatory diseases. *Cell.* **117** (5): p. 561-74.
302. Shi, J., Y. Zhao, Y. Wang, W. Gao, et al. (2014). Inflammatory caspases are innate immune receptors for intracellular LPS. *Nature.* **514** (7521): p. 187-92.
303. Hemmi, H., T. Kaisho, O. Takeuchi, S. Sato, et al. (2002). Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway. *Nat Immunol.* **3** (2): p. 196-200.
304. Testerman, T.L., J.F. Gerster, L.M. Imbertson, M.J. Reiter, et al. (1995). Cytokine induction by the immunomodulators imiquimod and S-27609. *J Leukoc Biol.* **58** (3): p. 365-72.
305. Weeks, C.E. and S.J. Gibson (1994). Induction of interferon and other cytokines by imiquimod and its hydroxylated metabolite R-842 in human blood cells in vitro. *J Interferon Res.* **14** (2): p. 81-5.
306. Arany, I., S.K. Tying, M.A. Stanley, M.A. Tomai, et al. (1999). Enhancement of the innate and cellular immune response in patients with genital warts treated with topical imiquimod cream 5%. *Antiviral Res.* **43** (1): p. 55-63.

307. Wagner, T.L., C.L. Ahonen, A.M. Couture, S.J. Gibson, et al. (1999). Modulation of TH1 and TH2 cytokine production with the immune response modifiers, R-848 and imiquimod. *Cell Immunol.* **191** (1): p. 10-9.
308. Latz, E., T.S. Xiao and A. Stutz (2013). Activation and regulation of the inflammasomes. *Nat Rev Immunol.* **13** (6): p. 397-411.
309. Davis, B.K., H. Wen and J.P. Ting (2011). The inflammasome NLRs in immunity, inflammation, and associated diseases. *Annu Rev Immunol.* **29**: p. 707-35.
310. Mittal, M., M.R. Siddiqui, K. Tran, S.P. Reddy, et al. (2014). Reactive oxygen species in inflammation and tissue injury. *Antioxid Redox Signal.* **20** (7): p. 1126-67.
311. Rosanna, D.P. and C. Salvatore (2012). Reactive oxygen species, inflammation, and lung diseases. *Curr Pharm Des.* **18** (26): p. 3889-900.
312. Marcato, L.G., A.P. Ferlini, R.C. Bonfim, M.L. Ramos-Jorge, et al. (2008). The role of Toll-like receptors 2 and 4 on reactive oxygen species and nitric oxide production by macrophage cells stimulated with root canal pathogens. *Oral Microbiol Immunol.* **23** (5): p. 353-9.
313. West, A.P., I.E. Brodsky, C. Rahner, D.K. Woo, et al. (2011). TLR signalling augments macrophage bactericidal activity through mitochondrial ROS. *Nature.* **472** (7344): p. 476-80.
314. Murugaiyan, G. and B. Saha (2009). Protumor vs antitumor functions of IL-17. *J Immunol.* **183** (7): p. 4169-75.
315. Ivanov, II, B.S. McKenzie, L. Zhou, C.E. Tadokoro, et al. (2006). The orphan nuclear receptor ROR $\gamma$  directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. *Cell.* **126** (6): p. 1121-33.
316. Rudensky, A.Y. (2011). Regulatory T cells and Foxp3. *Immunol Rev.* **241** (1): p. 260-8.
317. Geenen, V. (2012). The appearance of the thymus and the integrated evolution of adaptive immune and neuroendocrine systems. *Acta Clin Belg.* **67** (3): p. 209-13.
318. Alexander, C. and E.T. Rietschel (2001). Bacterial lipopolysaccharides and innate immunity. *J Endotoxin Res.* **7** (3): p. 167-202.
319. Tsao, P.N., S.C. Wei, M.T. Huang, M.C. Lee, et al. (2011). Lipopolysaccharide-induced Notch signaling activation through JNK-dependent pathway regulates inflammatory response. *J Biomed Sci.* **18**: p. 56.
320. Hofstetter, H., R. Gold and H.P. Hartung (2009). Th17 Cells in MS and Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *Int MS J.* **16** (1): p. 12-8.

321. Huppert, J., D. Closhen, A. Croxford, R. White, et al. (2010). Cellular mechanisms of IL-17-induced blood-brain barrier disruption. *FASEB J.* **24** (4): p. 1023-34.

## **Selbstständigkeitserklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Literaturangaben angefertigt habe.

Ich versichere, dass ich diese Arbeit noch an keiner anderen Hochschule eingereicht habe, um ein Promotionsverfahren eröffnen zu lassen.

---

Ort, Datum

---

Andreas Weber

## Publikationsliste

### Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

**Weber A.**, Zimmermann C., Mausberg A.K., Dehmel T., Kieseier B.C., Hartung H.P., Hofstetter H.H. (2015). *Pseudomonas aeruginosa* and its bacterial components influence the cytokine response in thymocytes and splenocytes. Accepted at *Infection and Immunity*

**Weber A.**, Zimmermann C, Kieseier B.C., Hartung H.P., Hofstetter H.H. (2014). Bacteria and their cell wall components uniformly co-activate IL-17-producing thymocytes. *Clin Exp Immunol* **178** (3):504-15

**Weber A.**, Zimmermann C, Meyer zu Hörste G., Kieseier B.C., Hartung H.P., Hofstetter H.H. (2013). Bacterial flagellin and diphtheria toxin co-stimulate IL-17-producing thymocytes. *Cytokine* **64**(1): p. 221-6.

**Weber A.**, Zimmermann C, Mausberg A.K., Kieseier B.C., Hartung H.P., Hofstetter H.H. (2013). Induction of pro-inflammatory cytokine production in thymocytes by the immune response modifiers Imiquimod and Gardiquimod. *Int Immunopharmacol* **17**(2): p. 427-31.

### Weitere Publikationen:

Zimmermann C., **Weber A.**, Mausberg A.K., Kieseier B.C., Hartung H.P., Hofstetter H.H. (2016). Alteration of the cytokine signature by various TLR ligands in different T cell populations in MOG<sub>37-50</sub> and MOG<sub>35-55</sub>- induced EAE in C57.BL/6 mice. *Clin Immunol.* **S1521-6616**(16)30080-8

Zimmermann C., **Weber A.**, Mausberg A.K., Kieseier B.C., Hartung H.P., Hofstetter H.H. (2012). T cell activation status determines the cytokine pattern induced by zymosan and bacterial DNA both in thymocytes and splenocytes. *Clin Exp Immunol*, **172**(2): p. 245-53.

## Lebenslauf

## **Danksagung**

### **Danken möchte ich ...**

... PD Dr. med. Harald H. Hofstetter für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und die Möglichkeit, hier promovieren zu können. Zudem bedanke ich mich für die stets engagierte Betreuung, die Hilfestellungen und die kritischen Anregungen, die entscheidend zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen haben.

... Prof. Dr. rer. nat. Vlada Urlacher für die Übernahme der Zweitbetreuung am Fachbereich Chemie an der mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Düsseldorf

... meiner Mitdoktorandin Corinna für die gute Zusammenarbeit, die Unterstützung und die Gesellschaft während langer Labor- und Bürostunden

... Felicitas für das ständige Korrekturlesen meiner Arbeiten.

... bei meinen ehemaligen Laborkollegen für die Hilfestellungen, die mir insbesondere im Laboralltag zugekommen sind.

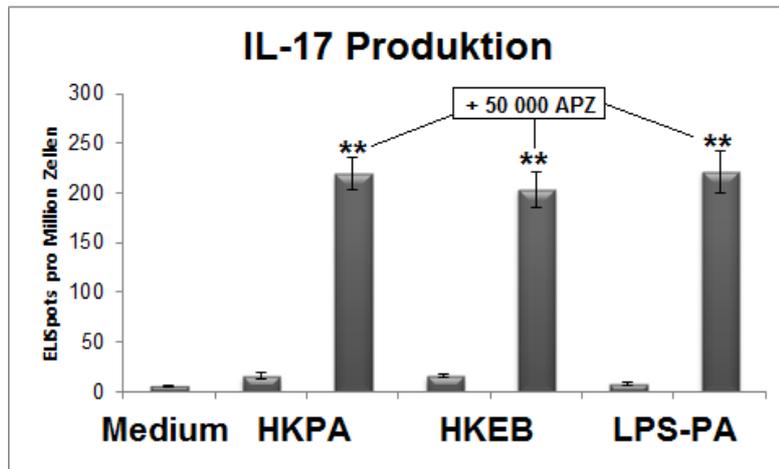
... bei allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der anderen Arbeitsgruppen, für das stets gute Arbeitsklima und die Unterstützung bei Problemen.

... meinen Eltern, die mich immer in jeder Hinsicht unterstützt haben.

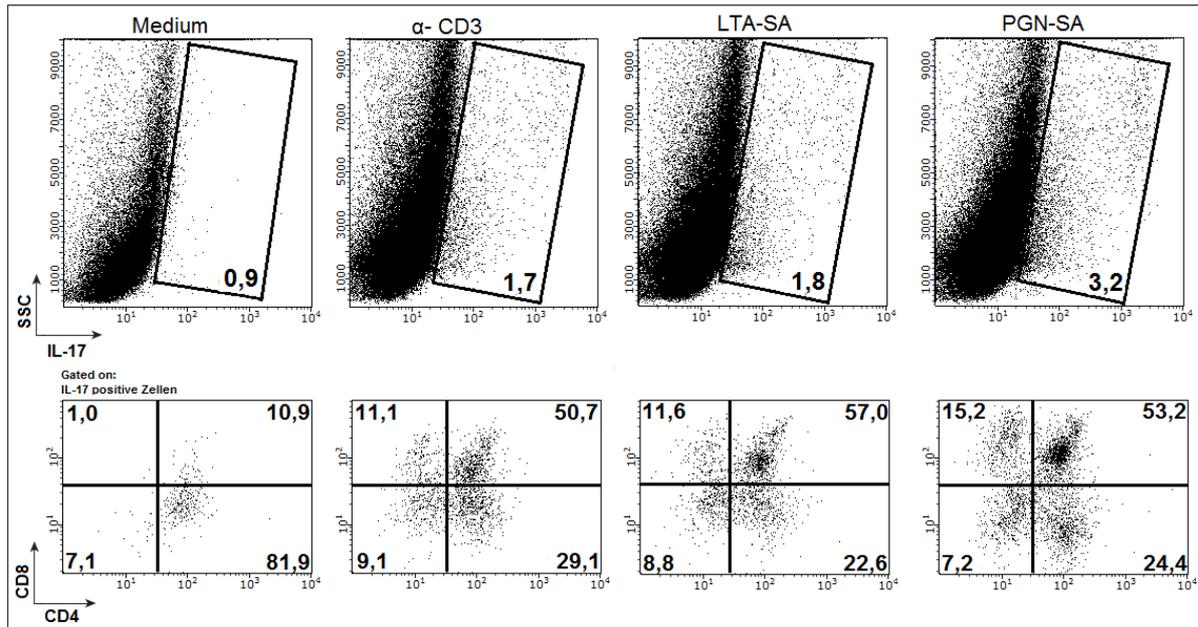
...meiner geliebten Freundin Angela für die stetige Unterstützung und Motivation seit Beginn meines Studiums.

## Anhang

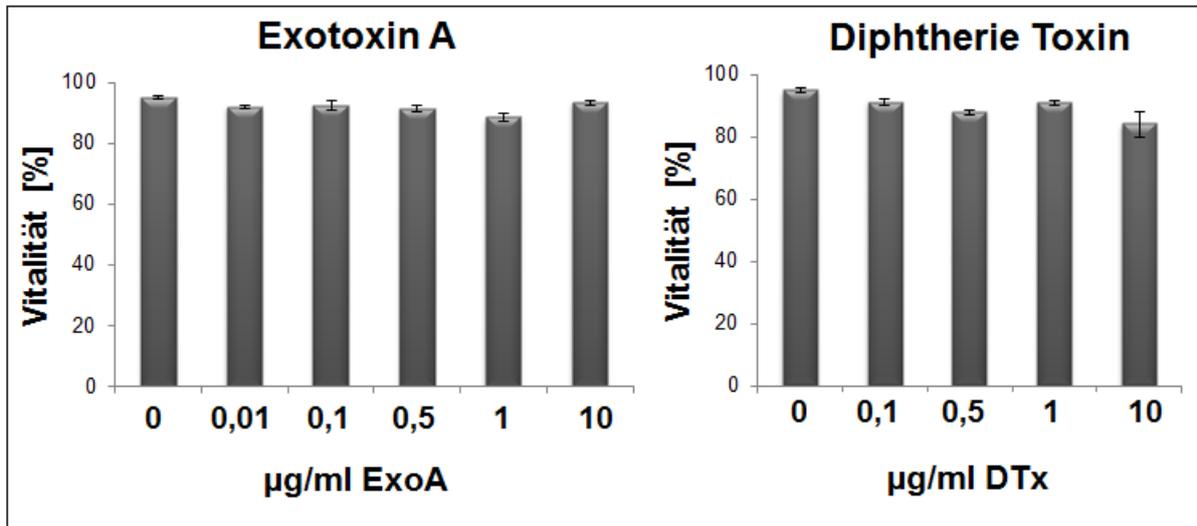
### Experimente mit Thymuszellen



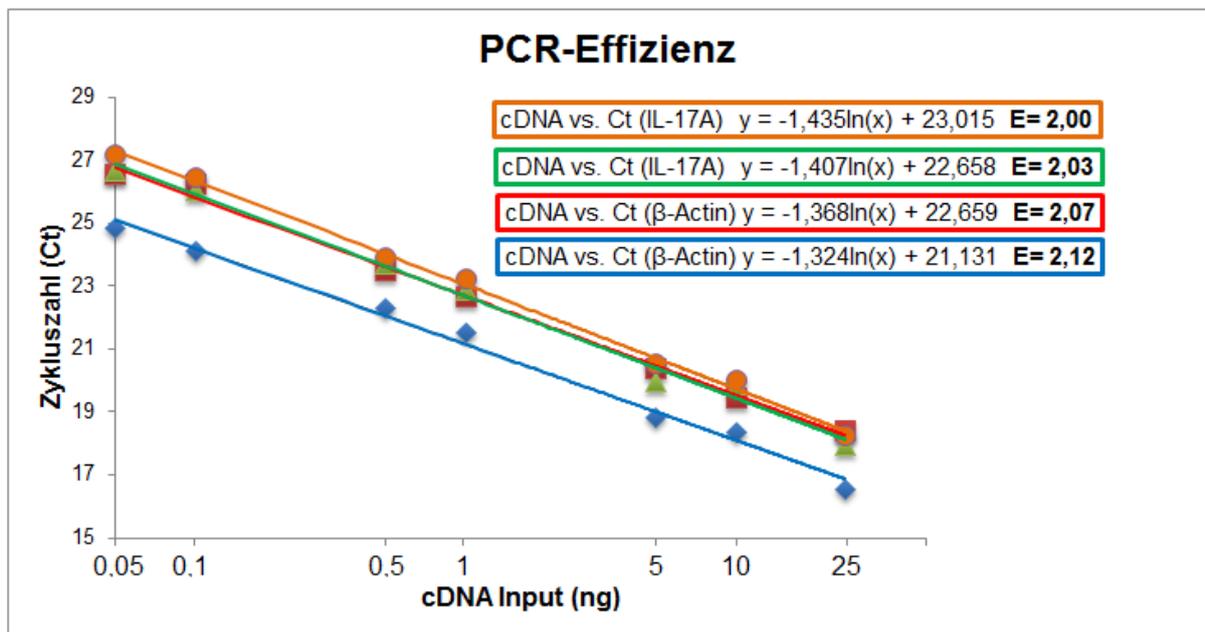
**Einfluss von HKPA, HKEB und LPS auf die IL-17 Produktion von Thymuszellen in Abhängigkeit von APZ.** Thymuszellen von weiblichen C57.BL/6 Mäusen (6-8 Wochen) wurden zu  $10^6$ -Zellen pro well ausgesät und nach Zugabe von 50 000 APZ mit HKPA ( $10^8$ /ml), HKEB ( $10^8$ /ml) und LPS ( $1 \mu\text{g/ml}$ ) stimuliert. Nach 24 h Inkubationszeit wurde die IL-17 Produktion mittels ELISpot Assay ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM aus drei unabhängigen Experimenten mit  $n=6$  Mäusen. Signifikante Unterschiede sind mit Sternen gekennzeichnet (\*\*  $p < 0,01$ ).



**FACS-Analyse von IL-17 nach Anreicherung mittels MACS-Separation.** Thymuszellen von weiblichen C57.BL/6 Mäusen (6-8 Wochen) wurden mit  $\alpha$ -CD3 aktiviert ( $1 \mu\text{g/ml}$ ) und mit LTA-SA ( $1 \mu\text{g/ml}$ ) und PGN-SA ( $5 \mu\text{g/ml}$ ) für 20 h stimuliert. Nach Anreicherung der IL-17-produzierenden Zellen mittels MACS-Separation und Färbung der Oberflächen mit CD4 und CD8 wurden die Proben am Durchflusszytometer analysiert. Dargestellt ist die IL-17 Produktion in Prozent als *frequency of parent* bezogen auf alle Zellen (obere Reihe) und die prozentualen Anteile der IL-17-produzierenden CD4<sup>+</sup>-, CD8<sup>+</sup>-, CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>- und CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>- T-Zellen (untere Reihe). Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment ( $n=3$ ).

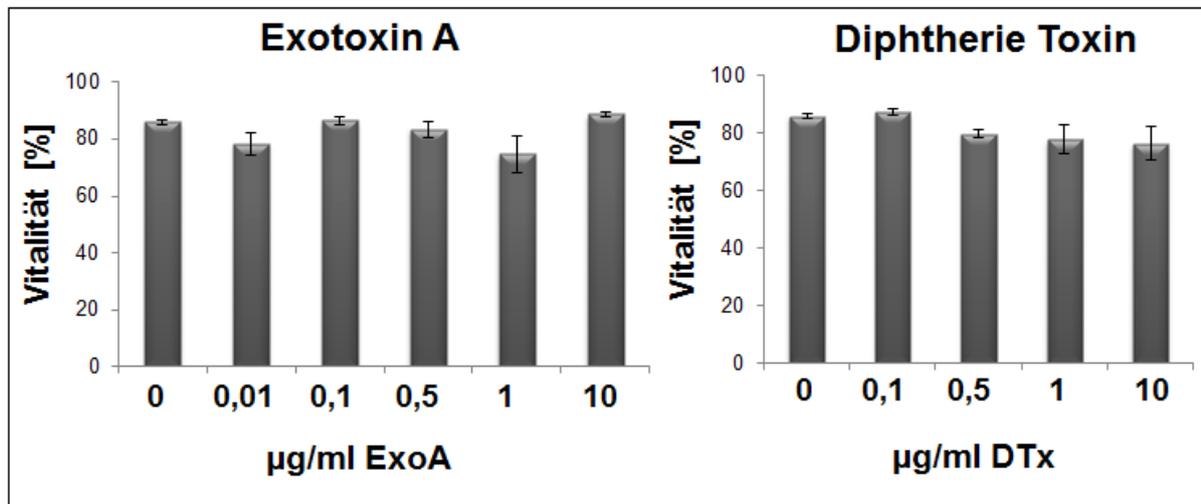


**Einfluss von Exotoxin A und Diphtherie Toxin auf die Zellvitalität von Thymuszellen.** Thymuszellen von weiblichen C57.BL/6 Mäusen (6-8 Wochen) wurden für 24 h mit Exo A (0,01 – 10 µg/ml) und DTx (0,1 – 10 µg/ml) stimuliert. Nach Färbung mit Fixable Viability Dye® 780 wurden die Proben durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM aus drei unabhängigen Experimenten mit n=3 Mäusen.

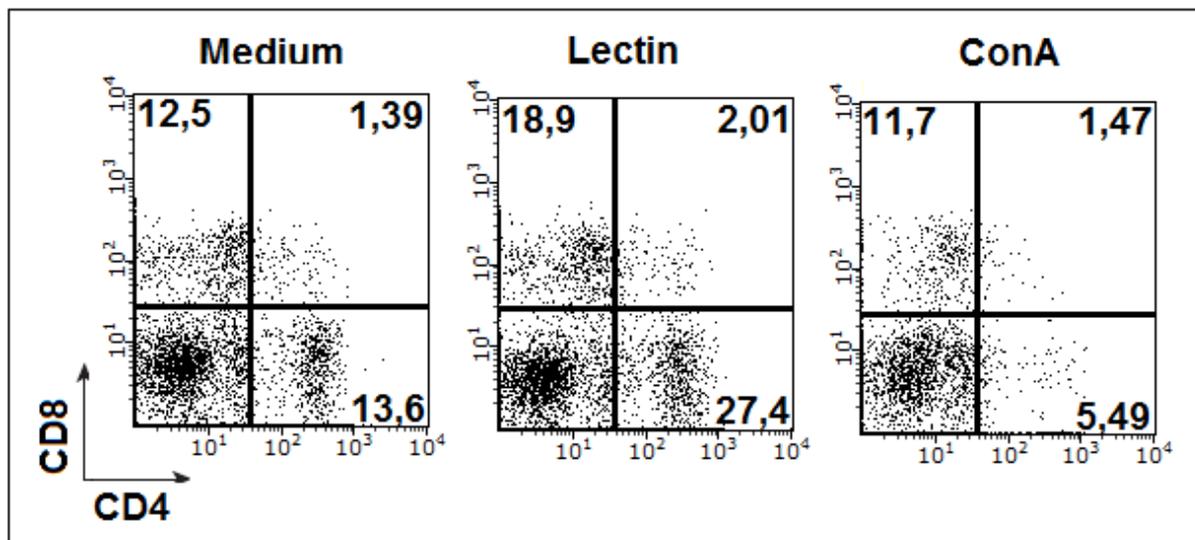


**PCR Effizienz.** Die Abbildung zeigt die Ergebnisse der Standardkurven von 2 verschiedenen cDNA Proben und 2 verschiedenen Primern.

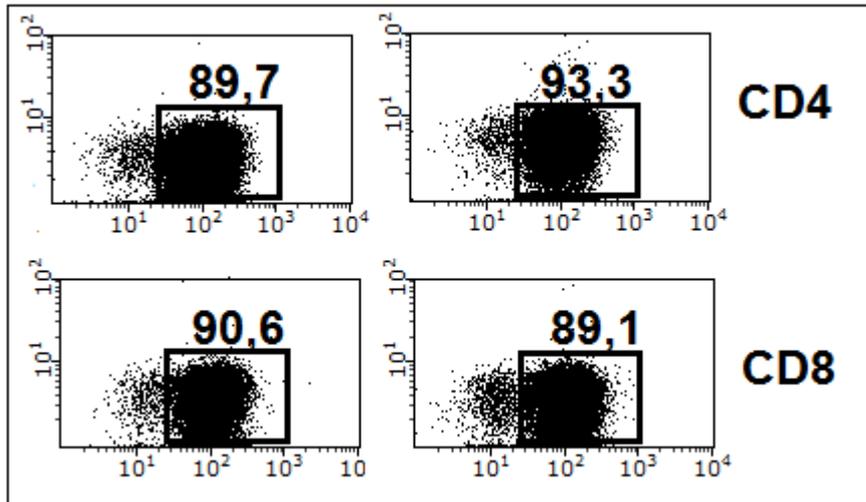
## Experimente mit Milzzellen



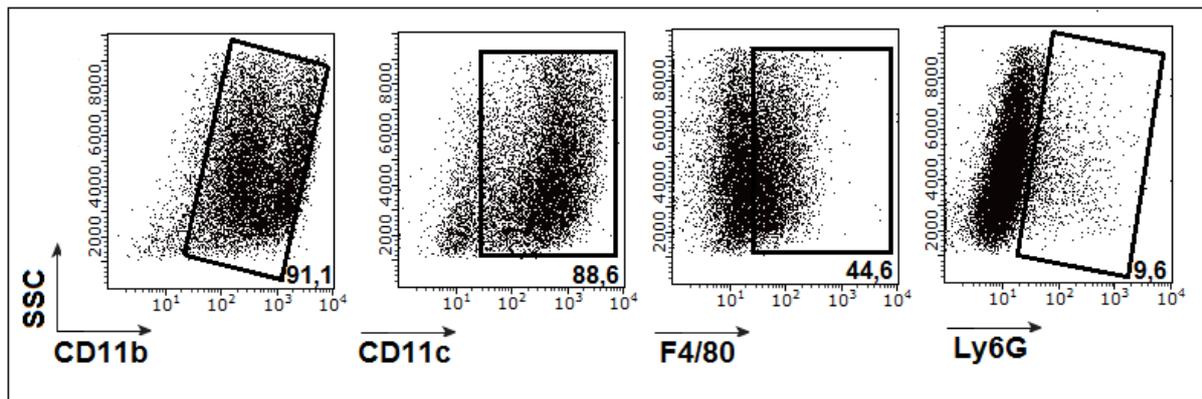
**Einfluss von Exotoxin A und Diphtherie Toxin auf die Zellvitalität von Milzzellen.** Milzzellen von weiblichen C57.BL/6 Mäusen (6-8 Wochen) wurden für 24 h mit Exo A (0,01 – 10 µg/ml) und DTx (0,1 – 10 µg/ml) stimuliert. Nach Färbung mit Fixable Viability Dye® 780 wurden die Proben durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM aus drei unabhängigen Experimenten mit n=3 Mäusen.



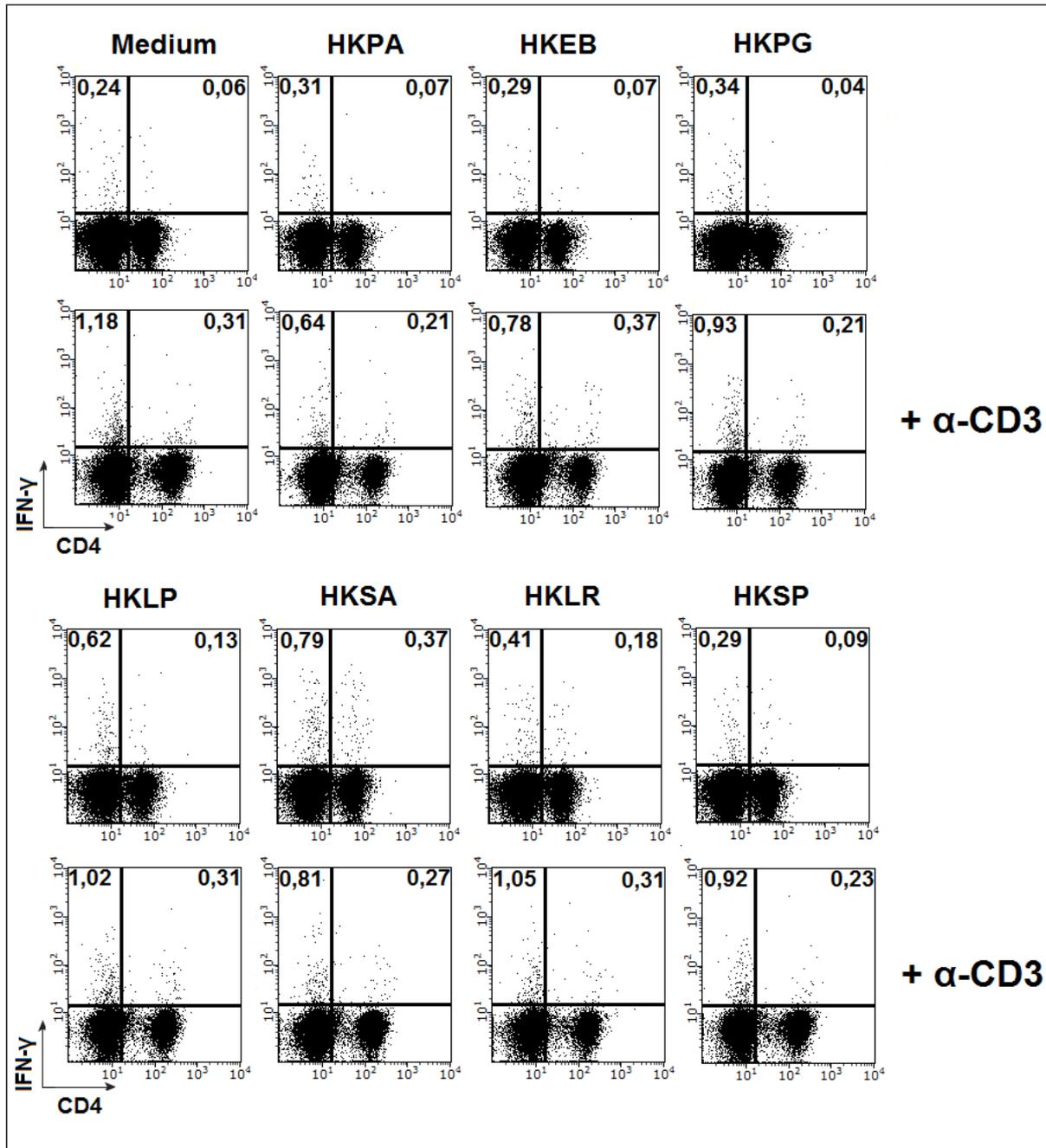
**FACS-Analyse der Oberflächenmoleküle CD4 und CD8 nach Stimulation mit Lectin und ConA.** Milzzellen von weiblichen C57.BL/6 Mäusen (6-8 Wochen) wurden mit Lectin (1 µg/ml) und ConA (1 µg/ml) für 24 h stimuliert. Nach Färbung mit Fixable Viability Dye® 660 wurden die Oberflächen mit CD4 und CD8 gefärbt und durchflusszytometrisch bestimmt. Dargestellt sind die prozentualen Anteile CD4<sup>+</sup>-, CD8<sup>+</sup>-, CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>- und CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> T-Zellen nach dem Ausschluss toter Zellen. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment (n=3).



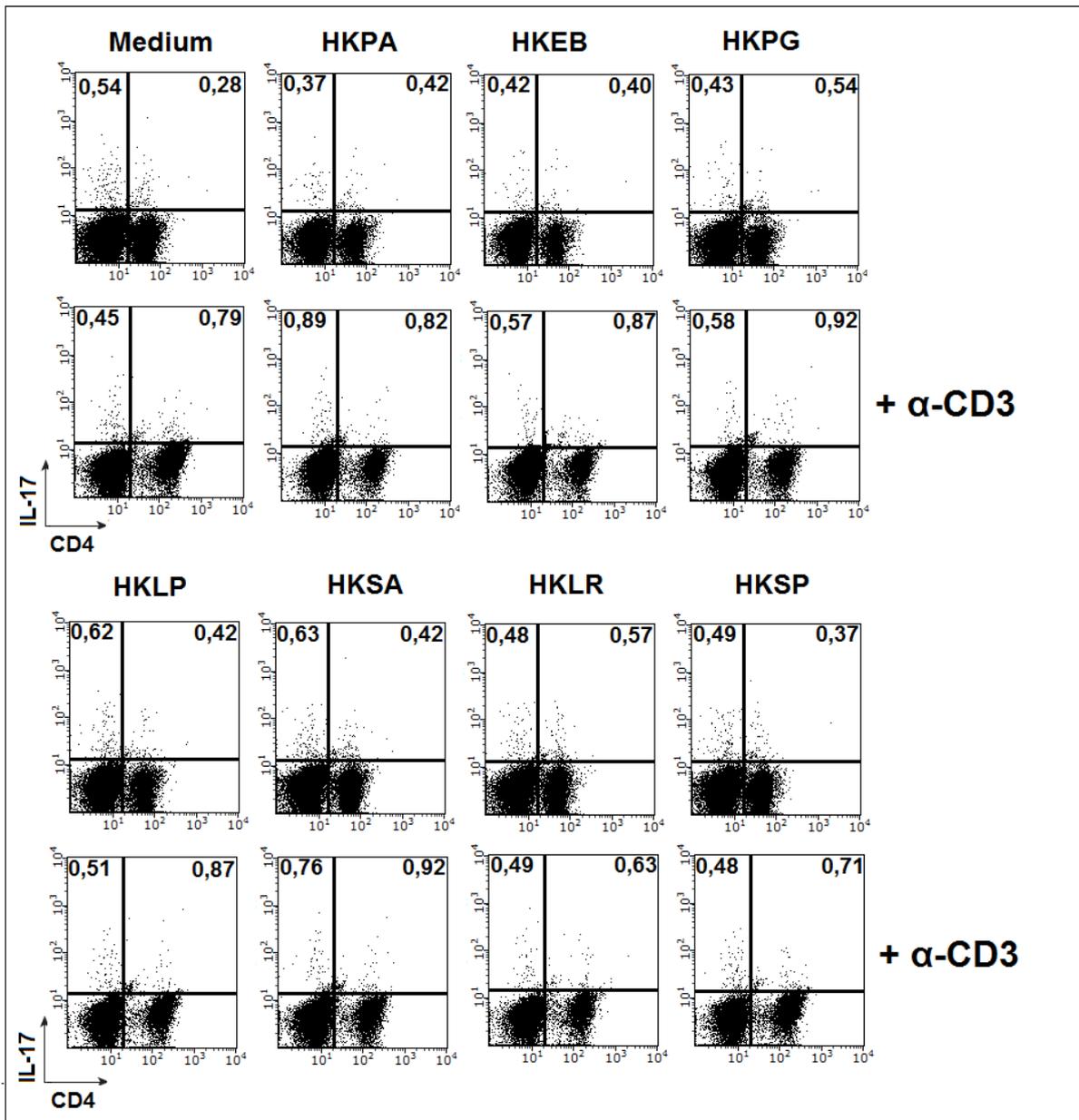
**Charakterisierung der isolierten CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>- T-Zellen.** Nach der MACS-Separation wurden die Oberflächen der isolierten Zellen mit CD4 und CD8 gefärbt und mittels FACS analysiert. Dargestellt sind die CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>- T-Zellen in Prozent als *frequency of parent* bezogen auf alle Zellen. Gezeigt sind zwei repräsentative Charakterisierungen.



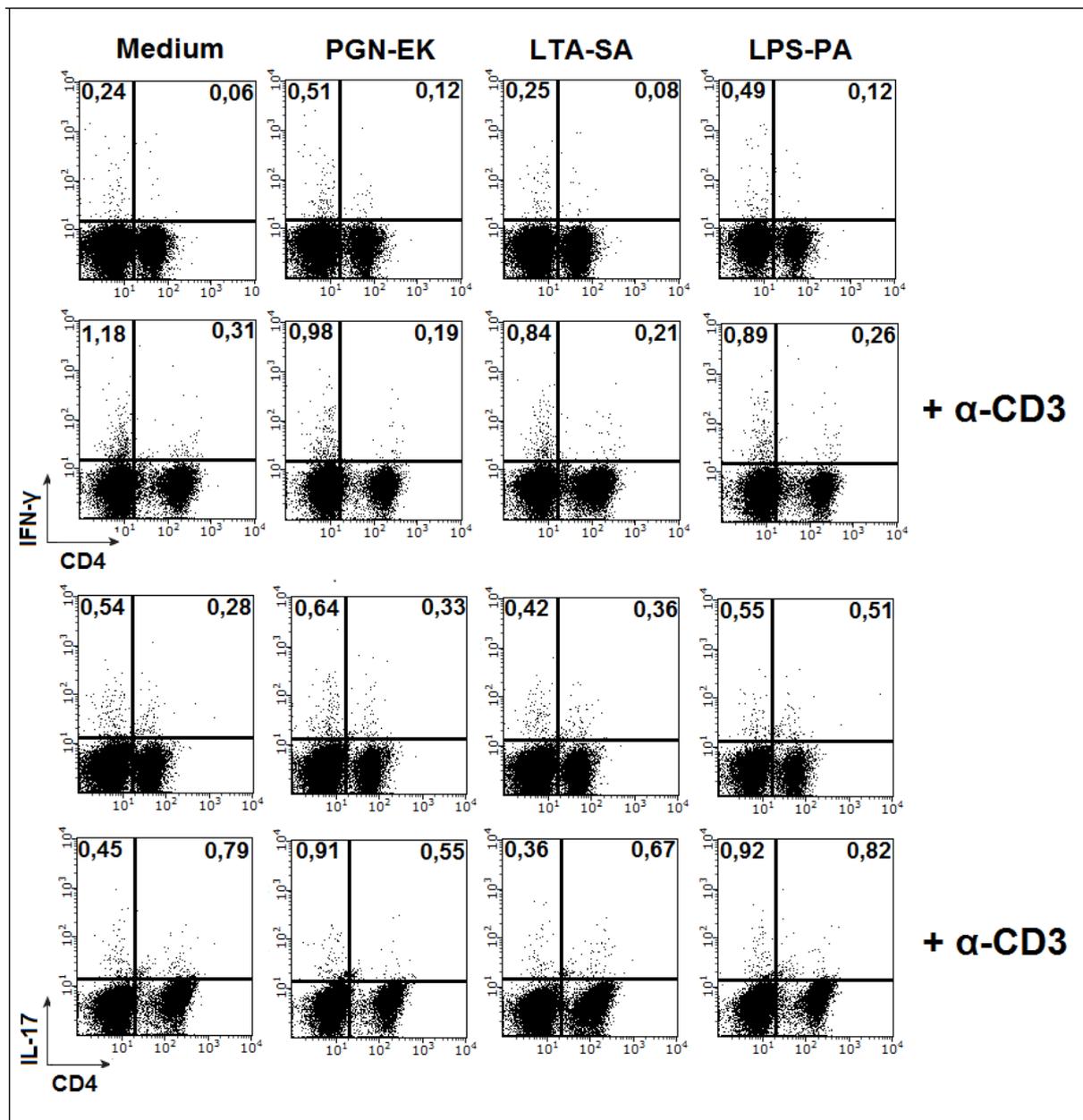
**Charakterisierung der generierten APZ.** Nach der Generierung wurden die APZ vor der Beladung mit Antigenen mit CD11b, CD11c, F4/80 und Ly6G gefärbt und mittels FACS analysiert. Dargestellt sind die positiven Zellen in Prozent als *frequency of parent* bezogen auf alle Zellen. Gezeigt ist eine repräsentative Charakterisierung.



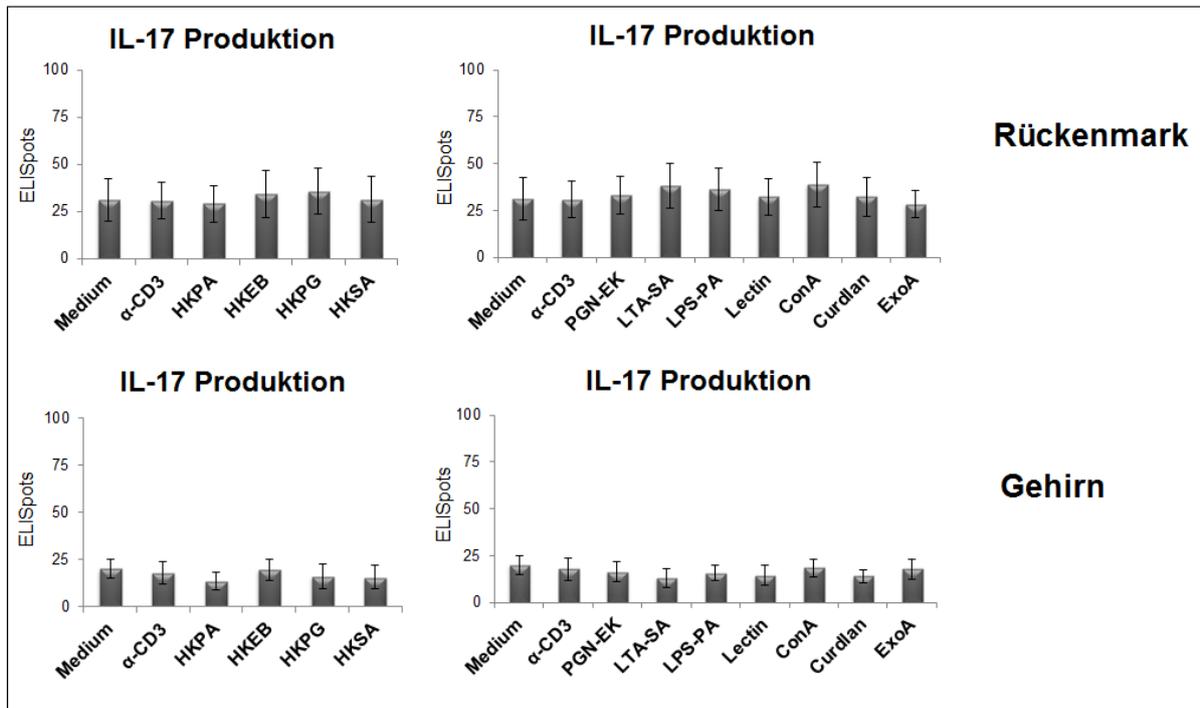
**Intrazelluläre IFN- $\gamma$  Färbung von Milzzellen nach Stimulation mit hitze-getöteten Bakterien.** Milzzellen von weiblichen C57.BL/6 Mäusen (6-8 Wochen) wurden mit  $10^8$ /ml HKPA, HKEB, HKPG, HKLP, HKSA und HKSP für 48 h stimuliert ( $\pm$   $\alpha$ -CD3-Aktivierung). 4 h vor Ende der Restimulationszeit wurde Brefeldin A zu den Zellen gegeben. Nach Färbung mit Fixable Viability Dye® 660 wurden die Oberflächen mit CD4 und CD8, sowie das Zytokin IFN- $\gamma$  gefärbt und durchflusszytometrisch bestimmt. Dargestellt sind die IFN- $\gamma^+$ CD4<sup>+</sup>- und CD4<sup>-</sup> Zellen in Prozent als *frequency of parent* bezogen auf alle Zellen nach dem Ausschluss toter Zellen. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment (n=4).



**Intrazelluläre IL-17 Färbung von Milzzellen nach Stimulation mit hitze-getöteten Bakterien.** Milzzellen von weiblichen C57.BL/6 Mäusen (6-8 Wochen) wurden mit  $10^8$ /ml HKPA, HKEB, HKPG, HKLP, HKSA und HKSP für 48 h stimuliert ( $\pm$   $\alpha$ -CD3-Aktivierung). 4 h vor Ende der Restimulationszeit wurde Brefeldin A zu den Zellen gegeben. Nach Färbung mit Fixable Viability Dye® 660 wurden die Oberflächen mit CD4 und CD8, sowie das Zytokin IL-17 gefärbt und durchflusszytometrisch bestimmt. Dargestellt sind die IL-17<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>- und CD4<sup>-</sup> Zellen in Prozent als *frequency of parent* bezogen auf alle Zellen nach dem Ausschluss toter Zellen. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment (n=4).

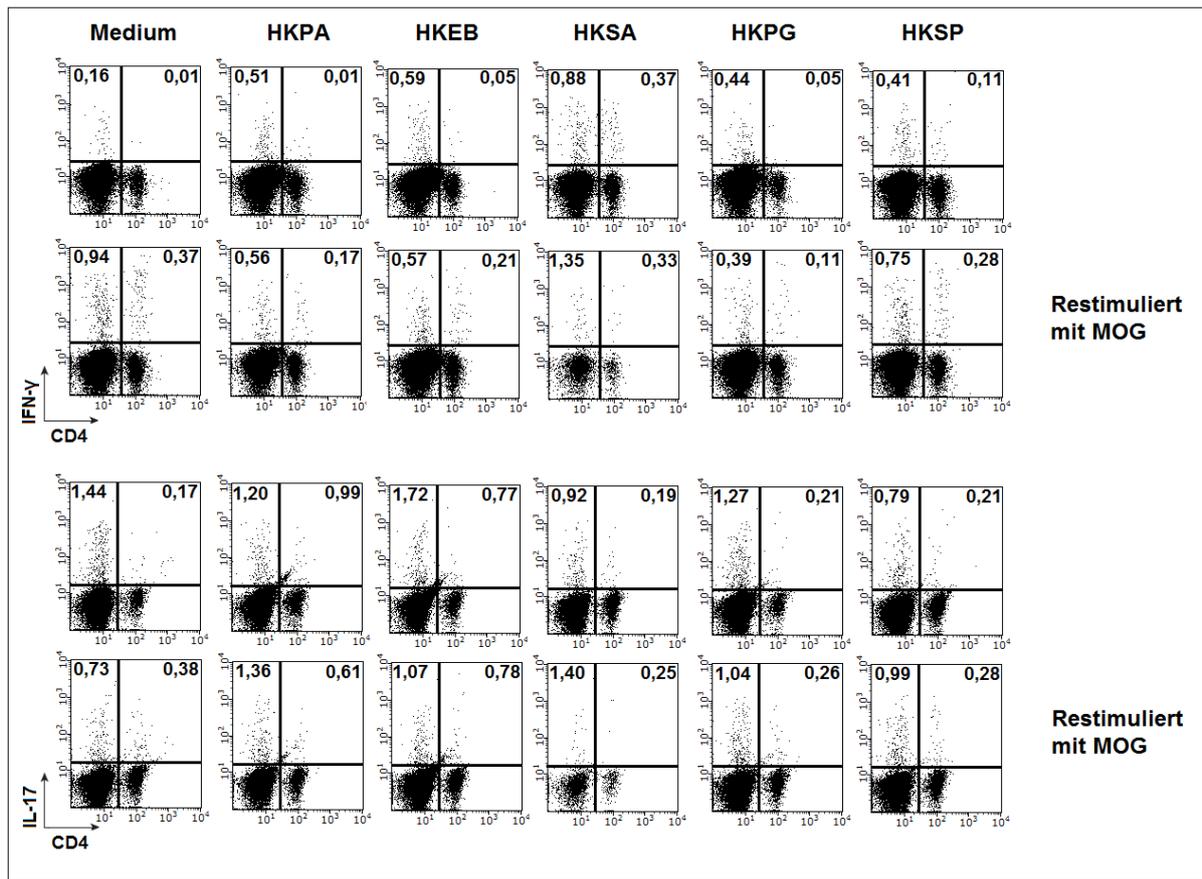


**Intrazelluläre IFN- $\gamma$  und IL-17 Färbung von Milzzellen nach Stimulation mit PGN, LTA und LPS.** Milzzellen von weiblichen C57.BL/6 Mäusen (6-8 Wochen) wurden mit PGN-EK (5  $\mu\text{g/ml}$ ), LTA-SA (1  $\mu\text{g/ml}$ ) und LPS-PA (1  $\mu\text{g/ml}$ ) für 48 h stimuliert ( $\pm$   $\alpha$ -CD3-Aktivierung, 1  $\mu\text{g/ml}$ ). 4 h vor Ende der Restimulationszeit wurde Brefeldin A zu den Zellen gegeben. Nach Färbung mit Fixable Viability Dye® 660 wurden die Oberflächen mit CD4 und CD8, sowie die Zytokine IFN- $\gamma$  und IL-17 gefärbt und durchflusszytometrisch bestimmt. Dargestellt sind die IFN- $\gamma^+$ /IL-17 $^+$  CD4 $^+$ - und CD4 $^-$  Zellen in Prozent als *frequency of parent* bezogen auf alle Zellen nach dem Ausschluss toter Zellen. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment (n=4).

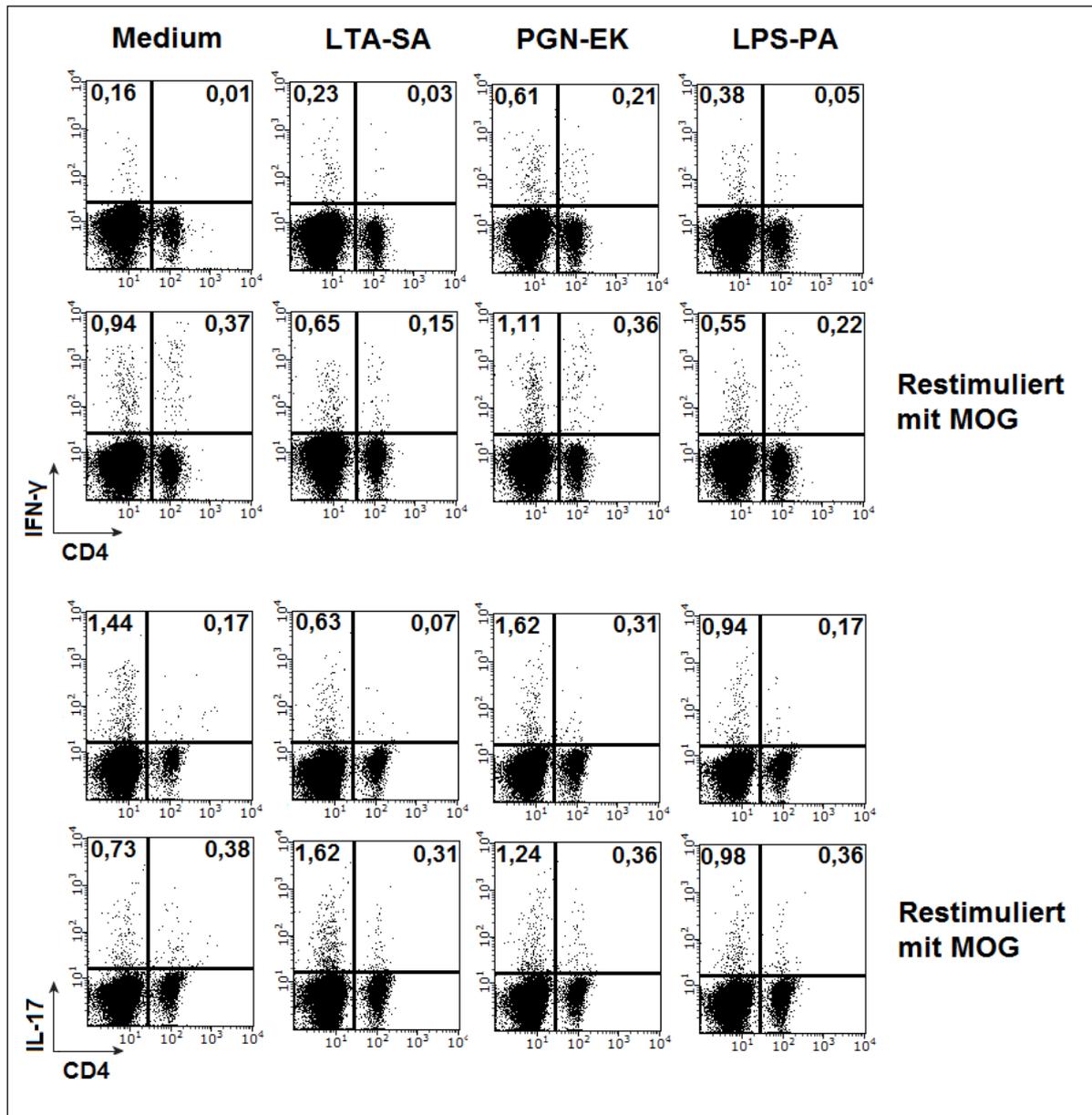


**Einfluss von hitze-getöteten Bakterien und bakteriellen Bestandteilen auf die IL-17 Produktion von ZNS-Zellen aus naiven Mäusen.** Rückenmark und Gehirn von weiblichen C57.BL/6 Mäusen (6 – 8 Wochen) wurden isoliert und mit Collagenase D/DNase verdaut. Nach Aufreinigung mittels Percoll-Lösung wurden die isolierten Zellen für 24 h mit HKPA ( $10^8$ /ml), HKEB ( $10^8$ /ml), HKPG ( $10^8$ /ml), HKSA ( $10^8$ /ml), PGN-EK ( $5 \mu\text{g/ml}$ ), LTA-SA ( $1 \mu\text{g/ml}$ ), LPS-PA ( $1 \mu\text{g/ml}$ ), Lectin ( $1 \mu\text{g/ml}$ ), ConA ( $1 \mu\text{g/ml}$ ), Curdlan ( $100 \mu\text{g/ml}$ ) und ExoA ( $1 \mu\text{g/ml}$ ) stimuliert und die IL-17 Produktion mittels ELISpot Assay ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM aus zwei unabhängigen Experimenten mit  $n=4$  Mäusen.

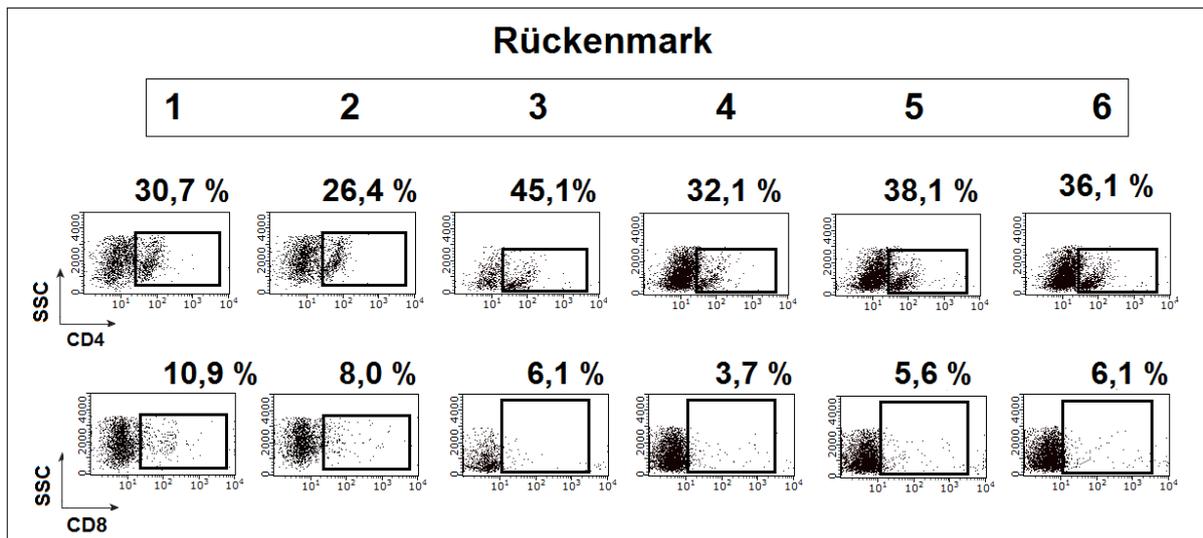
## Experimente mit EAE-Mäusen



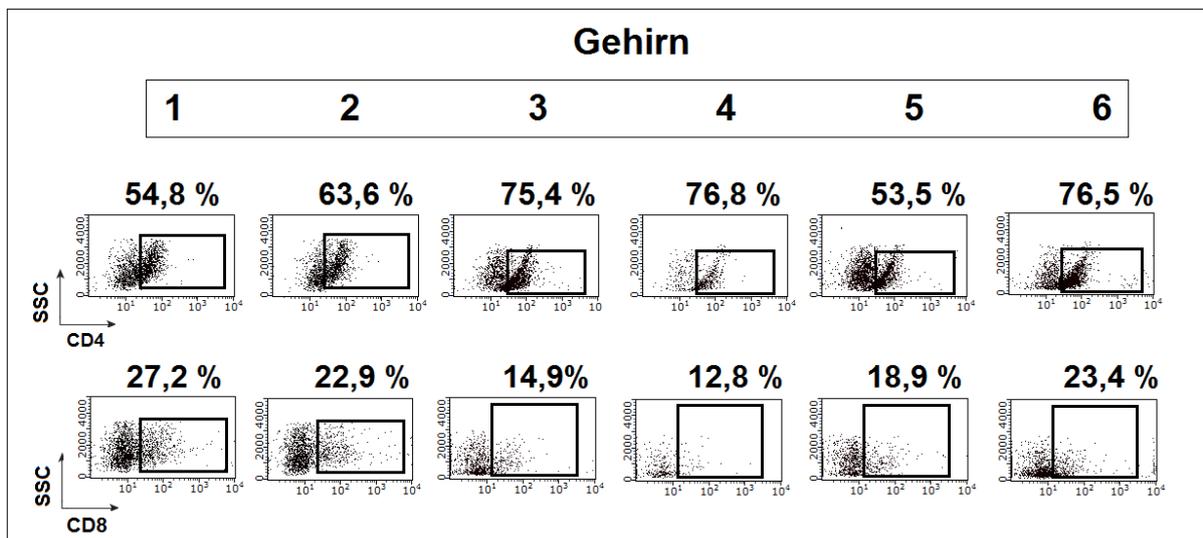
**Intrazelluläre IFN- $\gamma$  und IL-17 Färbung von Milzzellen aus EAE-Mäusen nach Stimulation mit hitzegetöteten Bakterien.** Milzzellen von EAE-Tieren (Tag 15 nach Immunisierung) wurden mit  $10^8$ /ml HKPA, HKEB, HKSA, HKPG und HKLP ( $\pm$  MOG<sub>35-55</sub>-Restimulation, 20  $\mu$ g/ml) für 20 h stimuliert. 4 h vor Ende der Restimulationszeit wurde Brefeldin A zu den Zellen gegeben. Nach Färbung mit Fixable Viability Dye® 660 wurden die Oberflächen mit CD4 und CD8, sowie die Zytokine IFN- $\gamma$  und IL-17 gefärbt und durchflusszytometrisch bestimmt. Dargestellt sind die IFN- $\gamma^+$ /IL-17<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>- und CD4<sup>-</sup> Zellen in Prozent als *frequency of parent* bezogen auf alle Zellen nach dem Ausschluss toter Zellen. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment (Score = 2,5)



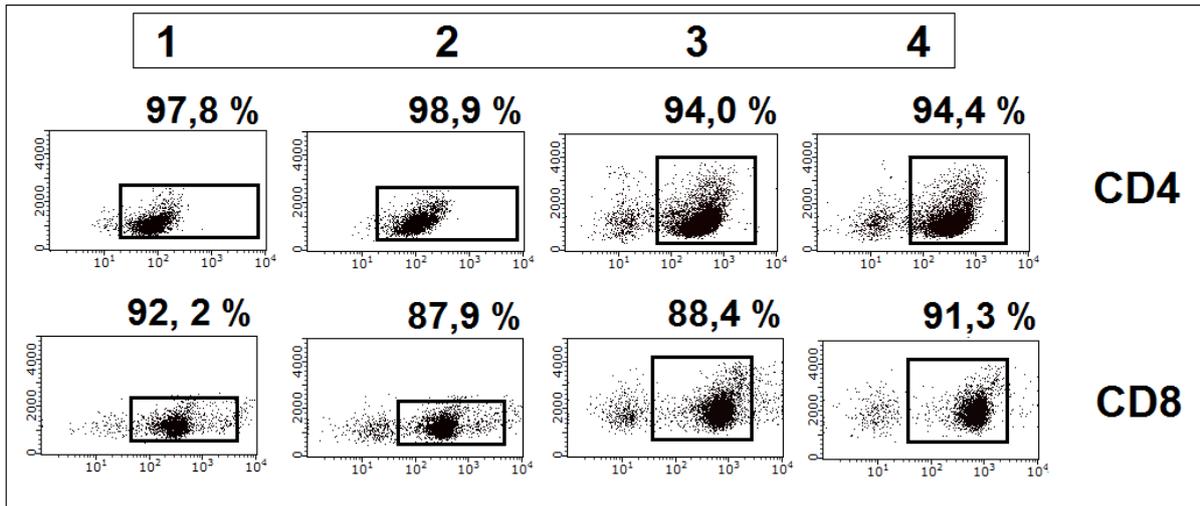
**Intrazelluläre IFN- $\gamma$  und IL-17 Färbung von Milzzellen nach Stimulation mit PGN, LTA und LPS.** Milzzellen von EAE-Tieren (Tag 15 nach Immunisierung) wurden mit PGN-EB (5  $\mu\text{g/ml}$ ), LTA-SA (1  $\mu\text{g/ml}$ ) und LPS-PA (1  $\mu\text{g/ml}$ ) für 20 h stimuliert ( $\pm$  MOG<sub>35-55</sub>-Restimulation, 20  $\mu\text{g/ml}$ ). 4 h vor Ende der Restimulationszeit wurde Brefeldin A zu den Zellen gegeben. Nach Färbung mit Fixable Viability Dye® 660 wurden die Oberflächen mit CD4 und CD8, sowie die Zytokine IFN- $\gamma$  und IL-17 gefärbt und durchflusszytometrisch bestimmt. Dargestellt sind die IFN- $\gamma^+$ /IL-17<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>- und CD4<sup>-</sup> Zellen in Prozent als *frequency of parent* bezogen auf alle Zellen nach dem Ausschluss toter Zellen. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment (Score = 2,5).



**Charakterisierung der isolierten Rückenmark-infiltrierenden Zellen von EAE-Mäusen.** Nach Aufreinigung der isolierten Rückenmarkszellen mittels Percoll-Lösung wurden die Oberflächen der isolierten Zellen mit CD4 und CD8 gefärbt und mittels FACS analysiert. Dargestellt sind die CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>- T-Zellen in Prozent als *frequency of parent* bezogen auf alle Zellen. Gezeigt sind sechs repräsentative Charakterisierungen.



**Charakterisierung der isolierten Gehirn-infiltrierenden Zellen von EAE-Mäusen.** Nach Aufreinigung der isolierten Gehirnzellen mittels Percoll-Lösung wurden die Oberflächen der isolierten Zellen mit CD4 und CD8 gefärbt und mittels FACS analysiert. Dargestellt sind die CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>- T-Zellen in Prozent als *frequency of parent* bezogen auf alle Zellen. Gezeigt sind sechs repräsentative Charakterisierungen.



**Charakterisierung der isolierten CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>- T-Zellen.** Nach der MACS-Separation wurden die Oberflächen der isolierten Zellen mit CD4 und CD8 gefärbt und mittels FACS analysiert. Dargestellt sind die CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>- T-Zellen in Prozent als *frequency of parent* bezogen auf alle Zellen. Gezeigt sind vier repräsentative Charakterisierungen.