

**Charakterisierung von IL-17-produzierenden
T-Zell-Populationen in der Experimentellen
Autoimmunen Enzephalomyelitis und der Einfluss
von Pathogen-assoziierten molekularen Mustern**

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

Corinna Steckner
aus Dorsten

Düsseldorf, Juni 2017

aus der Klinik für Neurologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

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

Referent: PD Dr. Harald H. Hofstetter

Korreferent: Prof. Dr. Christine R. Rose

Tag der mündlichen Prüfung: 23.11.2018

*meinen Großeltern,
meinen Eltern,
meinem Mann Jan*

Inhalt

1 Einleitung.....	1
1.1 Angeborene und adaptive Immunität.....	2
1.2 T-Lymphozyten.....	4
1.2.1 T-Zell-Entwicklung	4
1.2.2 CD4 ⁺ -T-Zellen.....	5
1.2.3 CD8 ⁺ -T-Zellen.....	6
1.3 Zytokine.....	6
1.4 Rezeptoren des Immunsystems	7
1.5 Autoimmunität	10
1.5.1 Autoimmunerkrankungen	10
1.6 Multiple Sklerose	11
1.6.1 Immunpathogenese	12
1.6.2 Biomarker für MS	13
1.6.3 Klinischer Verlauf	14
1.6.4 Therapie	15
1.7 Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis	15
1.7.1 Aktive Immunisierung der EAE.....	15
1.7.2 Myelinstruktur im ZNS und Antigenkandidaten.....	16
2 Ziel der Arbeit	18
3 Material und Methoden	19
3.1 Material	19
3.1.1 Firmen	19
3.1.2 Verwendete Geräte.....	20
3.1.3 Verbrauchsmaterialien	21
3.1.4 Chemikalien	22
3.1.5 Kits.....	23
3.1.6 Substanzen und Medien für die Zellkultur	23
3.1.7 Puffer und Lösungen.....	24

3.1.8 Software für die Datenanalyse	24
3.2 Tierexperimentelle Methoden	24
3.2.1 Induktion der EAE	25
3.2.2 Organentnahme	27
3.3 Zellbiologische Methoden	28
3.3.1 Herstellung von Single-Zellsuspensionen.....	28
3.3.2 Magnetische Separation von Zellpopulationen	28
3.3.3 Stimulation der Zellen mit Antigenen.....	31
3.4 Molekularbiologische Methoden	32
3.4.1 Isolierung von RNA aus Gewebe	32
3.4.2 Bestimmung der Konzentration von RNA und DNA.....	32
3.4.3 Synthese von cDNA.....	32
3.4.4 Quantitative RealTime-PCR.....	32
3.5 Immunologische Methoden	34
3.5.1 Enzyme-linked Spot-Assay	34
3.5.2 Durchflusszytometrie/Fluorescence-activated cell sorting (FACS)	36
3.6 Statistische Methoden	41
3.7 Bildbearbeitungen	41
4 Ergebnisse.....	42
4.1 Charakterisierung von IL-17-sezernierenden T-Zell-Populationen in der MOG ₃₇₋₅₀ - und MOG ₃₅₋₅₅ -induzierten EAE und der Einfluss von PAMPs ⁸²	42
4.1.1 Etablierung des MOG ₃₇₋₅₀ -induzierten EAE-Modells	42
4.1.2 Das IL-17-Zytokinprofil im Verlauf der MOG ₃₇₋₅₀ - und MOG ₃₅₋₅₅ -induzierten EAE	44
4.1.3 Die funktionelle Avidität der MOG ₃₇₋₅₀ -spezifischen IL-17-sezernierenden Zellen im Verlauf der EAE.....	54
4.1.4 Der Einfluss verschiedener PAMPs auf die IL-17-Sekretion von MOG ₃₇₋₅₀ - und MOG ₃₅₋₅₅ -spezifischen T-Zell-Populationen.....	56
4.2 Der Einfluss von Zymosan und CpG auf das Zytokinprofil naiver Thymozyten und Splenozyten ⁹⁸	74
4.2.1 Der Einfluss von Zymosan auf das Zytokinprofil naiver Thymozyten und Splenozyten.....	74

4.2.2 Der Einfluss von CpG auf das Zytokinprofil naiver Thymozyten und Splenozyten	78
4.2.3 Der Einfluss von Zymosan auf das Zytokinprofil der antigenspezifischen T-Zell-vermittelten Immunantwort	83
5 Diskussion	85
5.1 Die Charakterisierung von IL-17-sezernierenden T-Zell-Populationen in der MOG ₃₇₋₅₀ - und MOG ₃₅₋₅₅ -induzierten EAE und der Einfluss von PAMPs ⁸²	85
5.1.1 Etablierung der MOG ₃₇₋₅₀ -induzierten EAE und das IL-17-Zytokinprofil im Verlauf der MOG ₃₇₋₅₀ - und MOG ₃₅₋₅₅ -induzierten EAE	85
5.1.2 Der Einfluss verschiedener PAMPs auf die IL-17-Sekretion MOG ₃₇₋₅₀ - und MOG ₃₅₋₅₅ -spezifischer T-Zell-Populationen.....	92
5.2 Der Einfluss von Zymosan und CpG auf das Zytokinprofil naiver Thymozyten und Splenozyten ⁹⁸	102
6 Klinischer Bezug und Ausblick ^{82,98}	105
7 Zusammenfassung ^{82,98}	107
8 Summary ^{82,98}	108
9 Literatur	109
10 Abkürzungen	118
11 Abbildungen und Tabellen	121
11.1 Abbildungen	121
11.2 Tabellen	123
12 Anhang	124
12.1 Danksagung	124
12.2 Publikationen und Kongressbeiträge	125
12.2.1 Publikationen	125
12.2.2 Kongressbeiträge.....	125
12.3 Lebenslauf.....	126
12.4 Erklärungen.....	128

1 Einleitung

Alle Lebewesen leben in ständiger Wechselwirkung miteinander und mit ihrer Umwelt. Sie nehmen Nährstoffe auf und geben Stoffwechselendprodukte wieder ab. Lebewesen können sich gegenseitig schaden und auch die Umwelt kann Bestandteile enthalten, die für Lebewesen gefährlich werden können. Das Immunsystem schützt Lebewesen neben äußeren Gefahren wie Infektionserregern ebenfalls vor inneren, körpereigenen, potenziell schädigenden Strukturen wie bösartigen Zellen, aus denen beispielsweise ein Tumor entstehen könnte. Hierfür ist es nicht nur wichtig, potenzielle Krankheitserreger frühzeitig zu erkennen, sondern auch Abwehrmechanismen in Zusammenarbeit mit anderen, nichtimmunologischen Zellstrukturen einzuleiten, um eine Ausbreitung und einen irreparablen Schaden des Organismus zu vermeiden. Das Immunsystem ist dabei in der Lage, zwischen körpereigenen und körperfremden Strukturen zu unterscheiden. Jeder höhere Vertebrat besitzt ein individuelles Immunsystem, das sich aus miteinander wechselwirkenden Systemen, dem angeborenen und dem adaptiven (erworbenen) Immunsystem, zusammensetzt (1.1). Die Individualität des Immunsystems zeigt sich vor allem bei Transplantationen und sichert das Überleben von Individuen, bspw. beim Ausbruch von Epidemien.

Das Immunsystem ist ein kompliziertes Netzwerk bestehend aus Immunzellen (Leukozyten), löslichen Serumbestandteilen und den lymphatischen Organen. Alle zellulären Bestandteile des Blutes entstehen aus einer hämatopoetischen Stammzelle des Knochenmarks, wo mit Ausnahme der T-Lymphozyten auch alle Zellen vollständig reifen (Abb. 1.1). Die T-Zell-Progenitoren wandern in den Thymus, wo sie zu T-Zellen mit einem $\gamma\delta$ -T-Zell-Rezeptor (TZR) und zu T-Zellen mit einem $\alpha\beta$ -TZR reifen, anschließend differenzieren sie sich weiter zu T-Zellen mit den Oberflächenmolekülen CD4 und CD8¹. Die lymphatischen Organe lassen sich in primäre und sekundäre lymphatische Organe unterteilen². Zu den primären lymphatischen Organen, in denen die Ausdifferenzierung der B- und T-Zellen stattfindet, gehören das Knochenmark und der Thymus. In den sekundären lymphatischen Organen (Milz, Lymphknoten, lymphatisches Gewebe in Lunge und Darm) werden B- und T-Zellen (letztere durch antigenpräsentierende Zellen (APZ)) aktiviert. Über die Lymphbahnen und Blutstrom stehen die lymphatischen Organe miteinander in Verbindung. Die ausgereiften Leukozyten werden aus den primären lymphatischen Organen ins Blut entlassen und zirkulieren im Körper. B- und T-Zellen zirkulieren zwischen Blut und sekundär lymphatischen Organen, bis sie aktiviert und zum Entzündungsort rekrutiert werden.

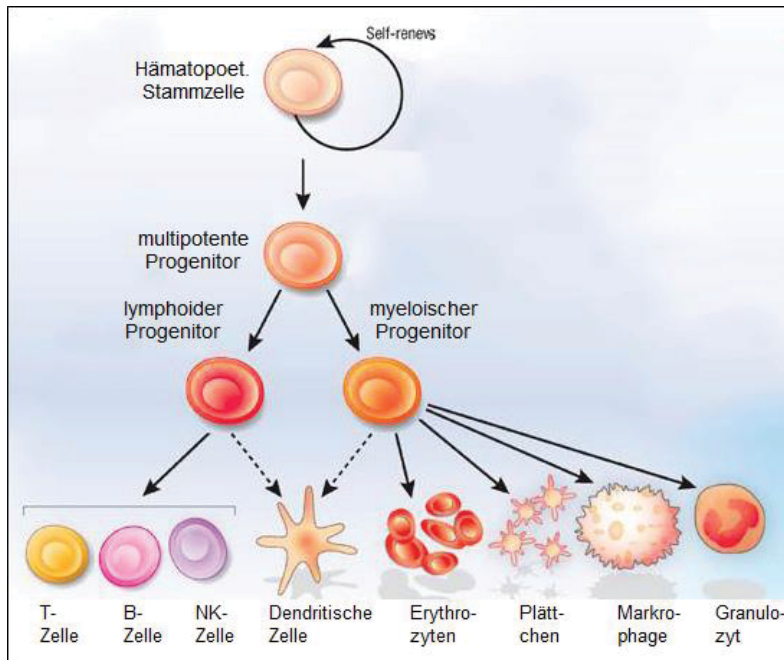


Abb. 1.1: Die Entwicklung der Blutzellen aus einer hämatopoetischen Stammzelle (modifiziert nach Tan *et al.*)¹

Alle zellulären Bestandteile des Blutes gehen aus gemeinsamen hämatopoetischen Stammzelle des Knochenmarks hervor. Mit Ausnahme der T-Lymphozyten, deren Progenitoren zur Reifung über die Blutbahnen zum Thymus wandern, reifen dort auch alle Zellen vollständig. Aus der hämatopoetischen Stammzelle gehen lymphoide und myeloide Vorläuferzellen hervor, aus denen sich die roten und weißen Blutkörperchen entwickeln.

1.1 Angeborene und adaptive Immunität

Die erste Verteidigung gegen eindringende Mikroorganismen bildet das angeborene Immunsystem³. Hauptaufgabe der dazugehörigen Zellen ist das Erkennen allgemeiner, repetitiver Strukturen auf den Mikroorganismen, *pathogen associated molecular patterns* (PAMPs), und die Einleitung einer schnellen Abwehrreaktion (ohne vorausgegangenen Erregerkontakt) innerhalb der ersten vier Stunden⁴. Die Abwehrmechanismen des angeborenen Immunsystems bestehen aus zellulären und humoralen Bestandteilen. Zu den zellulären Mechanismen gehören die dendritischen Zellen (zur Erkennung von PAMPs), Makrophagen und neutrophile Granulozyten (zur Phagozytose von Antigenen) sowie die natürlichen Killerzellen (NK, u. a. zur Erkennung von schadhaften, körpereigenen Zellen)^{5,6}. Zu den humoralen Mechanismen zählen das Komplementsystem, dessen Komponenten u. a. der schnellen und effizienten Markierung fremder Zellen zur Phagozytose dienen, zudem die Interferone sowie das Lysozym⁷. In Vertebraten entwickelte sich das evolutionär jüngere adaptive Immunsystem, das ca. vier bis 96 Stunden - abhängig von voraktivierten Lymphozyten - nach der Infektion einsetzt, wenn die angeborene Immunität keinen ausreichenden Schutz bietet. Das adaptive Immunsystem besteht aus einer großen Diversität von T- und B-Lymphozyten, die mit ihrem großen

Repertoire von Rezeptoren spezifisch an Antigene binden, außerdem aus langlebigen Zellen mit einem immunologischen Gedächtnis⁸. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass das adaptive Immunsystem durch seine Spezifität und das immunologische Gedächtnis charakterisiert wird. Über Antikörper übernehmen die B-Zellen die Vermittlung der humoralen Immunität, die T-Zellen die der zellgebundenen Immunität (Abb. 1.2).

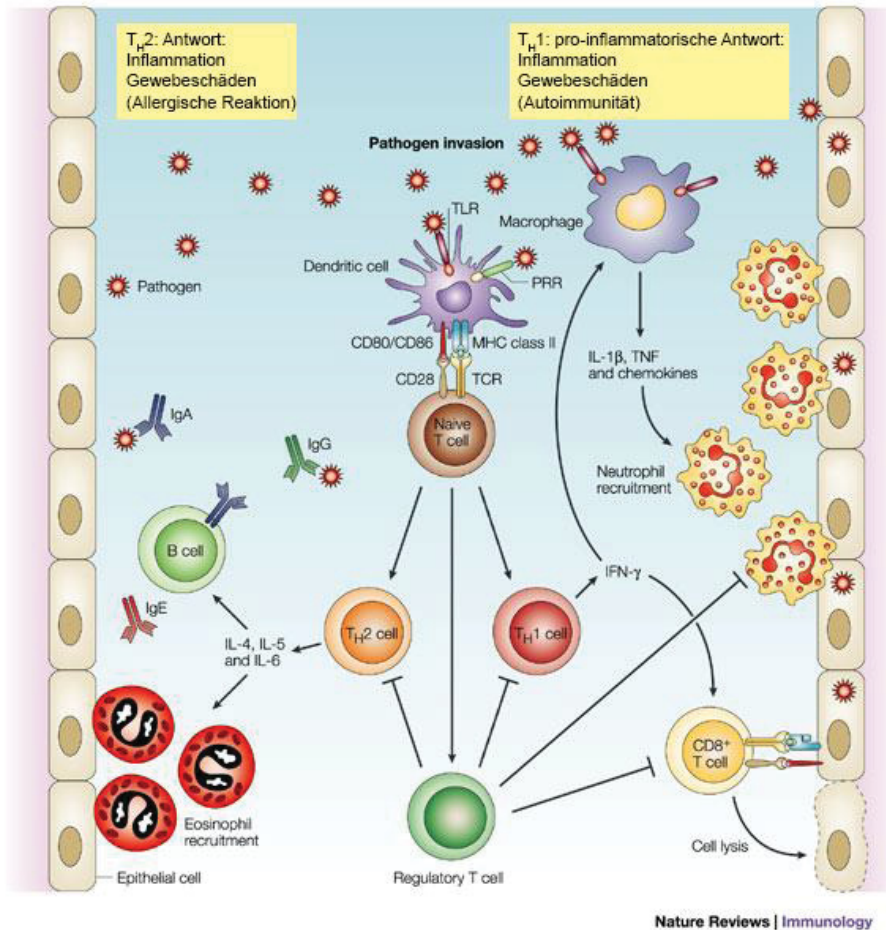


Abb. 1.2: Das Immunsystem nach einer Infektion: Ein Überblick (modifiziert nach Mills *et al.*)³ Die erste Verteidigungslinie gegen eindringende Mikroorganismen bilden die Effektorzellen des angeborenen Immunsystems: Makrophagen, dendritische Zellen (DZ), Neutrophile, natürliche Killerzellen (hier nicht gezeigt) zusammen mit dem Komplementsystem. Von *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs) aktivierte *pattern-recognition receptors* (PRRs) wie bspw. Toll-like Rezeptoren (TLR) (1.4) auf der Zelloberfläche von Makrophagen und DZ aktivieren wiederum unterschiedliche Signalkaskaden. Diese führen unter anderem zu einer Produktion verschiedener proinflammatorischer Zytokine, die dann wiederum weitere Signalkaskaden initiieren oder Effektorzellen aktivieren. Die naiven T-Zellen werden durch DZ aktiviert, indem sie Antigene auf MHC-I/MHC-II-Molekülen präsentieren. Die aktivierten naiven T-Zellen differenzieren zu verschiedenen Subpopulationen von CD4⁺- (T_H1, T_H2) und CD8⁺-T-Zellen. T_H1 führen durch Sekretion von IFN-γ zu einer Aktivierung von Makrophagen und unterstützen die B-Zellen bei der Antikörperproduktion. Auch T_H2 unterstützen B-Zellen bei der Produktion von Antikörpern. Die CD8⁺-T-Zellen lysieren die infizierten Zellen. In normalen Individuen helfen u. a. regulatorische T-Zellen, diese Abläufe unter Kontrolle zu halten. Unkontrollierte Produktion pro-inflammatorischer Zytokine oder Reaktionen gegen körpereigenes Gewebe kann jedoch zu Gewebeschäden führen. IL, Interleukin; TCR, *T-cell receptor*; T_H, T-Helferzelle; TNF, *tumor-necrosis factor*³.

1.2 T-Lymphozyten

Neben B-Zellen bilden die T-Zellen die zweite Hauptklasse der Lymphozyten. Für die zelluläre Immunität spielt die Aktivierung, Proliferation sowie die Differenzierung beider T-Lymphozyten-Typen, CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen, eine essentielle Rolle⁹. Beide T-Zell-Typen erkennen Antigene, die von antigenpräsentierenden Zellen (APZ) wie DZ als Peptide auf *major histocompatibility complex* (MHC) Klassen I und II präsentiert werden, wodurch die zellvermittelte Immunantwort initiiert wird¹⁰⁻¹².

1.2.1 T-Zell-Entwicklung

Die im Knochenmark entstandenen T-Zell-Progenitoren wandern über die Blutbahn in den Thymus, wo sie sich zu reifen, TZR-exprimierenden T-Zellen entwickeln. Zu dem Zeitpunkt der Einwanderung besitzen die Zellen jedoch weder einen CD4-, CD8-, CD3-, noch den T-Zell-Rezeptor und werden als unreife, doppelt negative (CD4⁻CD8⁻) Thymozyten bezeichnet². Im Thymus beginnen die Zellen stark zu proliferieren. Durch somatische Rekombinationsvorgänge, Umlagerungsreaktionen sowie Selektionsschritte durch Apoptose entstehen zunächst T-Zellen mit funktionalem TZR². Dabei entsteht eine große Variabilität des TZR sowie ein enormes Repertoire an individuellen Zellen, die einen für ein bestimmtes Epitop spezifischen TZR exprimieren⁸. Im nächsten Stadium exprimieren die Thymozyten CD4 und CD8 und werden als doppelt positiv (CD4⁺CD8⁺) bezeichnet. Durch die Positivselektion werden alle Thymozyten durch Apoptose aussortiert, die keinen funktionstüchtigen Antigenrezeptor besitzen und nicht mit MHC-Molekülen wechselwirken. Aus den positiv selektierten Thymozyten entstehen durch MHC-II-Kontakt CD4⁺-T-Zellen und durch MHC-I-Kontakt CD8⁺-T-Zellen¹³. Die Expression des anderen Korezeptors (CD4, CD8) wird eingestellt. Nach der Positivselektion folgt in einem weiteren Schritt die Negativselektion. Hier werden autoreaktive Zellen, die sich nach ihrer Aktivierung gegen körpereigene Zellen richten würden, ausgesiekt. Thymozyten, die einen funktionstüchtigen TZR besitzen, der nicht eigene Peptide im eigenen MHC erkennt, verlassen den Thymus als naive T-Zellen, zirkulieren zwischen Blut und Lymphe und wandern in periphere lymphatische Organe. Naiv bedeutet hierbei, dass die T-Zellen noch keinen Kontakt mit einem Antigen hatten. Die Aktivierung der Zellen geschieht durch zwei Signale:

Eine DZ präsentiert auf ihrer Oberfläche einer naiven T-Zelle ein für ihren TZR spezifisches Antigen¹⁴. Es kommt zu einer spezifischen Bindung des TZRs an seinem MHC/Peptid-Komplex auf der Oberfläche der DZ. Ein zweites, kostimulierendes Signal wird durch die Interaktion zwischen CD28 und der B7-Familie wie CD80 / CD86 vermittelt¹⁴.

Nach der Aktivierung einer naiven antigenspezifischen T-Zelle durch eine antigen-präsentierende Zelle (APZ), der DZ, treten diese in die klonale Expansion ein und es entsteht eine enorme Anzahl antigenspezifischer T-Effektorzellen¹⁵. Ein Teil dieser Zellen stirbt nicht, sondern geht als Gedächtniszellen in eine Art Ruhezustand und verbleibt im Gewebe¹⁵. Bei erneutem Kontakt mit ihrem passenden Antigen können Gedächtniszellen innerhalb weniger Stunden eine Immunreaktion auslösen und müssen nicht mehr durch DZ aktiviert werden¹⁶.

1.2.2 CD4⁺-T-Zellen

Naive CD4⁺-T-Zellen verlassen den Thymus nach ihrer Reifung als T-Helferzellen (T_H0). Abhängig von verschiedenen Mediatoren proliferieren und differenzieren sie im sekundären lymphatischen Organ nach Antigenkontakt zu unterschiedlichen Effektor-T-Zellen¹⁷. Die CD4⁺-T-Zellen erkennen Antigene, die als Peptidfragmente auf MHC-II-Molekülen präsentiert werden. Basierend auf der Sekretion unterschiedlicher Zytokinprofile sowie Effektor-Funktionen werden die Zellen u. a. in die Typen T_H1, T_H2, T_H17 oder regulatorische T-Zellen (T_{reg}) unterteilt (Abb.1.3)^{17,18}. Interferon (IFN)- γ ist das Zytokinprodukt der T_H1 und spielt eine wichtige Rolle bei der Regulierung der Antigenpräsentation sowie bei der zellulären Immunität bzw. intrazellulärer Pathogene und Autoimmunität¹⁹. T_H2 produzieren u. a. Interleukin 4 (IL-4) und IL-5, die die B-Zell-Antwort regulieren und besonders effektiv bei einer Infektion durch extrazelluläre Pathogene und Parasiten sowie bei Allergien und Asthma sind^{17,19,20}. Die Produkte der T_H17 sind IL-17, IL-17F, IL-21 sowie IL-22 und sie regulieren inflammatorische Antworten des Immunsystems, bilden eine Verteidigung gegen bestimmte Pathogene wie extrazelluläre Bakterien und Pilze und haben eine große Bedeutung in der Autoimmunität^{17,19}.

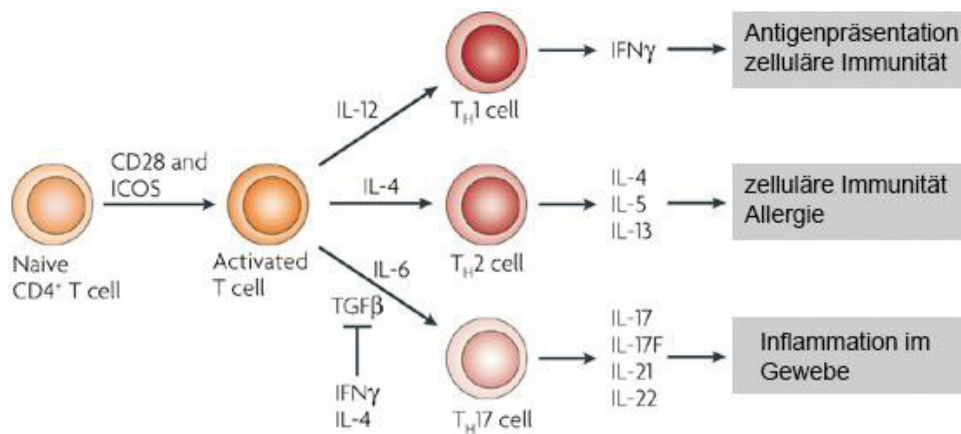


Abb. 1.3: Die Differenzierung von T-Helferzellen (modifiziert nach Dong)¹⁹

Naive CD4⁺-T-Zellen werden durch den T-Zell-Rezeptor und kostimulierende Moleküle wie CD28 aktiviert. Durch verschiedene Mediatoren differenzieren naive CD4⁺-T-Zellen in Effektor-T_H mit unterschiedlichem Zytokinprofil und immunoregulatorischer Funktion. ICOS, *T-cell co-stimulator*; IL, Interleukin; IFN, Interferon; TGF, *transforming growth factor*¹⁹.

1.2.3 CD8⁺-T-Zellen

Die CD8⁺-T-Zellen erkennen Peptide, die auf MHC-I-Molekülen präsentiert werden wie in infizierten körpereigenen Zellen und sind in der Lage, diese infizierten Zellen durch Lyse zu eliminieren¹². Naive CD8⁺-T-Zellen (zytotoxische T-Zellen; CTL, T_C) proliferieren und differenzieren in Abhängigkeit verschiedener Mediatoren unter anderem zu den Subpopulationen T_C1, T_C2, T_C17, CD8⁺-T_{reg} und CTLs⁹. Die Unterscheidung dieser Zellen basiert auf einem charakteristischen Zytokinprofil, das dem jeweiligen Gegenstück der CD4⁺-T-Zell-Version entspricht^{9,21}.

1.3 Zytokine

Bei der Entwicklung aller Zellen des Immunsystems, der Regulation und den Effektormechanismen von Immunreaktionen sind Proteinmediatoren beteiligt. Unter dem Begriff Zytokine zusammengefasst, beeinflussen diese Mediatoren unterschiedliche Zelltypen und somit verschiedene Zellfunktionen. Der Fokus liegt in dieser Arbeit auf den in Tab. 1.1 aufgelisteten Zytokinen. IL-17A, Mitglied einer Familie proinflammatorischer Zytokine (IL-17A-F), wird im weiteren Verlauf mit IL-17 abgekürzt.

Tab. 1.1: Übersicht verschiedener Zytokine, ihrer Quelle und Funktion.

Zytokin	Quelle	Funktion	Referenz
IFN-γ	T-Zellen (T _H 1, CD8), NKT Zellen, NK Zellen	aktiviert Makrophagen, zytotoxische T-Zellen und NK; stimuliert die Differenzierung von T _H 1-Zellen, inhibiert die Differenzierung von T _H 2-Zellen; proinflammatorisch	22
IL-2	T-Zellen	stimuliert die Proliferation von T-Zellen	23
IL-4	T-Zellen (T _H 2), Mastzellen	aktiviert B-Zellen, induziert die Differenzierung von T _H 2-Zellen; antiinflammatorisch	24
IL-5	T-Zellen (T _H 2), Mastzellen	stimuliert die Proliferation, die Reifung und die Aktivierung von Eosinophilen und Basophilen	25
IL-6	T-Zellen, Makrophagen, Endothelzellen	Stimuliert die Reifung und die Differenzierung von T- und B-Zellen, induziert die Synthese der Akute-Phase-Proteine in der Leber; anti- und proinflammatorisch	26,27
IL-17A	CD4 ⁺ -T-Zellen, CD8 ⁺ -T-Zellen, $\gamma\delta$ T Zellen, NKT Zellen, NK Zellen, LT α Zelle, Neutrophile, Eosinophile, Monozyten	induziert Produktion von proinflammatorischen Zytokinen, Chemokinen und weiteren Mediatoren, Wachstumsfaktoren, antimikrobielle Peptide; proinflammatorisch	22,28

1.4 Rezeptoren des Immunsystems

Die Erkennung von körpereigenen sowie körperfremden Strukturen geschieht über die Rezeptoren des angeborenen und adaptiven Immunsystems. Um ein großes Repertoire an Pathogenen zu erkennen, haben sich in Zellen, insbesondere in denen des angeborenen Immunsystems, Rezeptoren entwickelt, die Pathogene anhand pathogenassoziierter mikrobieller Muster (PAMPs, *pathogen-associated microbial patterns*) detektieren²⁹. Verschiedene Zelltypen wie DZ und Makrophagen exprimieren Mustererkennungsrezeptoren (PRRs, *pattern-recognition receptors*), die PAMPs wie LPS oder virale und bakterielle Nukleinsäuren erkennen¹⁴. Zu den PRRs gehört unter anderem die Familie der Toll-like Rezeptoren (TLR), welcher in den letzten Jahren eine große Bedeutung in der Steuerung der angeborenen sowie adaptiven Immunantwort zugesprochen wurde³⁰. TLR sind Typ-1-Transmembranproteine mit extrazellulären, leucinreichen Regionen (LRR, leucine-rich repeat), die für die spezifische Erkennung der PAMPs verantwortlich sind, und einer intrazellulären TIR Domäne (Toll/IL-1 *receptor homology*), welche für die Induktion nachfolgender Signalkaskaden benötigt wird^{30,31}. Zehn funktionale TLR im Menschen und zwölf in der Maus wurden bisher identifiziert³⁰. TLR reagieren mit spezifischen PAMPs und lösen ein für das entsprechende Pathogen spezifisches Muster der Genexpression bzw. eine charakteristische Immunantwort aus.

Neben der Erkennung unterschiedlicher PAMPs unterscheiden sich die TLR auch in ihrer Lokalisation sowie in der Rekrutierung verschiedener Adaptermoleküle (Abb. 1.4).

So sind TLR3, TLR7, TLR8 und TLR9, die durch Nukleinsäuren aktiviert werden, innerhalb intrazellulärer Vesikel bzw. an den Membranen intrazellulärer Kompartimente (Lysosomen, Endosomen) lokalisiert³². Andere Rezeptoren wie TLR2, TLR4 und TLR6 sind extrazellulär in der Plasmamembran verankert³³. Ein Ligand von TLR2, TLR6 und dem β -Glukan-Rezeptor Dectin-1 ist eine Zellwandkomponente von *Saccharomyces cerevisiae* (Zymosan)³⁴. Die doppelsträngige RNA Poly I:C induziert eine Signalkaskade durch TLR3, das Lipopolysaccharid (LPS) durch TLR4, das Guanin-Analog Loxoribine durch TLR7, CpG - präsent in Bakterien (und Viren) - durch TLR9 und das Polysaccharid (*Alcaligenes faecalis*) Curdlan durch Dectin-1^{30,35-37}. Fast alle TLR aktivieren nach Bindung ihrer Liganden den *myeloid differentiation marker 88* (*MyD88*)-abhängigen Signalweg, nur TLR3 aktiviert den *MyD88*-unabhängigen Signalweg, den *TIR domain-containing adaptor protein inducing IFN β* (TRIF)-abhängigen Signalweg³⁸. TLR4 aktiviert als einziges Mitglied beide Signalwege und rekrutiert TRIF sowie das *TRIF-related adaptor molecule* (TRAM)³⁹. Die Downstream-Kaskade der verschiedenen Signalwege führt zur Rekrutierung weiterer Moleküle. So wird beispielsweise die Signaltransduktion des Adapterproteins MyD88 über IRAK (*IL-1 receptor associated kinase*) und TRAF6 (*TNF receptor associated factor*) zu NF- κ B (*nuclear factor κ B*) und AP-1 (*activating protein-1*) vermittelt³⁰. NF- κ B, AP-1 sowie weitere induzierte Transkriptionsfaktoren wie Interferon-regulatorische IRFs (*IFN regulatory factor*) bewirken die Expression inflammatorischer Zytokine und Typ I-Interferone³⁰. In Abbildung 1.4 ist eine vereinfachte Übersicht der hier verwendeten PAMPs und ihrer Liganden dargestellt.

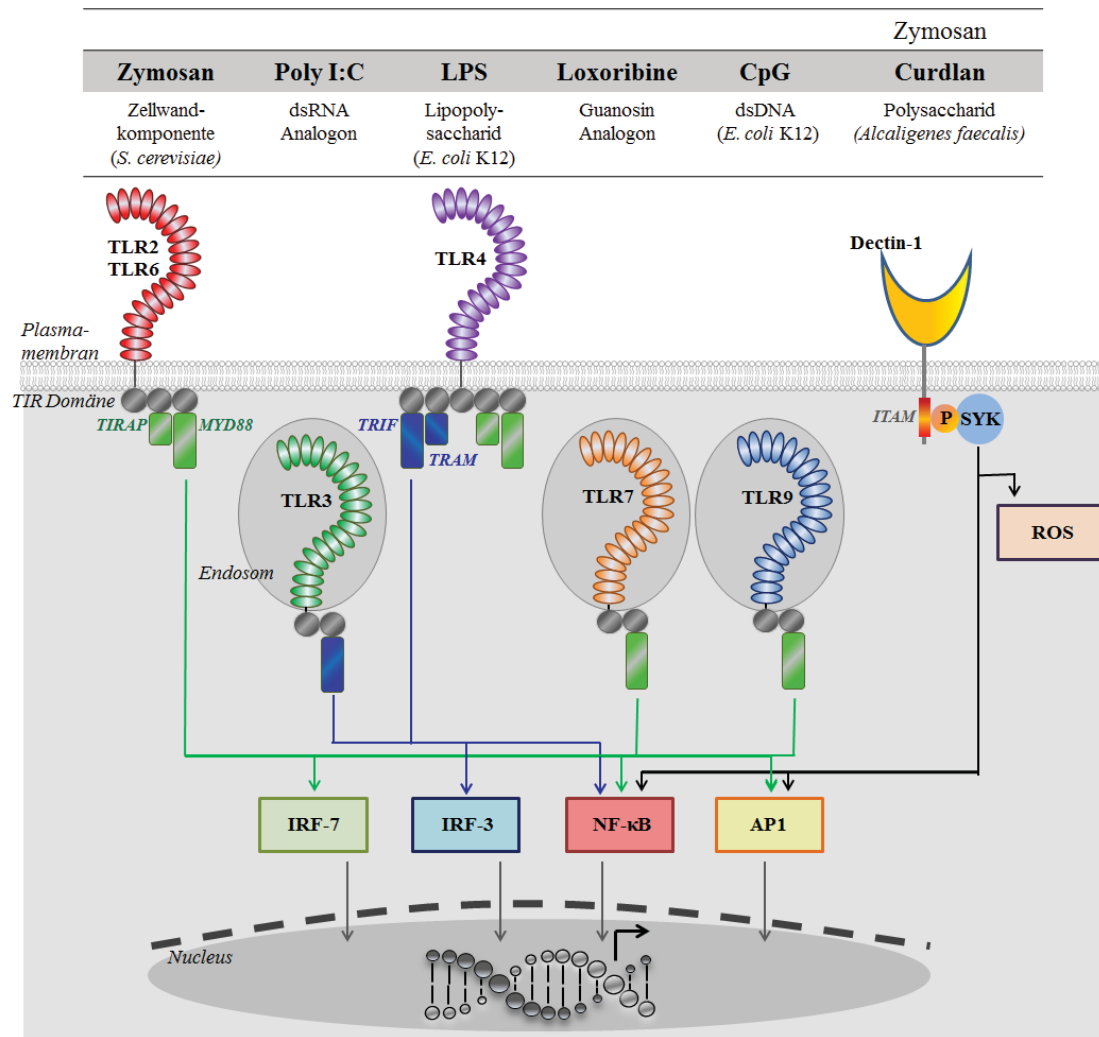


Abb. 1.4: Übersicht über die verwendeten PAMPs, ihre Rezeptoren und Signalwege

Mikrobielle Pathogene werden von verschiedenen PRRs erkannt und initiieren den MyD88-abhängigen oder -unabhängigen Signalweg. Durch Aktivierung verschiedener Adaptermoleküle und Transkriptionsfaktoren wird eine Immunantwort durch die Sekretion proinflammatorischer Zytokine ausgelöst. TLR (toll-like receptor), TIRAP (TIR domain-containing adaptor protein), MyD88 (myeloid differentiation factor 88), TRIF (TIR domain containing adapter protein inducing interferon β), TRAM (TRIF-related adapter molecule), NF- κ B (nuclear factor κ B), AP-1 (activating protein-1)^{30,30,33,40,41}.

1.5 Autoimmunität

Unter Autoimmunität werden Reaktionen des adaptiven Immunsystems zusammengefasst, die sich in Abwesenheit von Infektionen gegen körpereigenes Gewebe richten. Wird durch einen Autoantigenkontakt eine Immunantwort mit entsprechender Signalkaskade ausgelöst, kann eine Autoimmunerkrankung resultieren. Als Ursachen werden unter anderem genetische Faktoren und eine fehlgeschlagene T-Zell-Selektion (1.2.1), die zu einer Aktivierung autoreaktiver B- / T-Zellen und den Organismus schädigenden Entzündungsreaktionen führt, verantwortlich gemacht⁴². Studien mit Geschwisterpaaren und Zwillingen zeigten, dass neben genetischen Faktoren auch Umweltfaktoren in der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen, hier bei der Multiplen Sklerose, eine Rolle spielen^{40,43}. Da der Ausbruch einer Autoimmunerkrankung meist während oder nach einer Infektion erfolgt, liegt ein Zusammenhang nahe. Erkannt von PAMPs aktivierenden TLR (1.4) sind mikrobielle Pathogene in der Lage, den Krankheitsverlauf zu verstärken oder zu supprimieren. Hierzu wurden zwei Haupttheorien, die molekulare Mimikry und der Bystander-Effekt, beschrieben⁴⁴. Bei der molekularen Mimikry entwickelt der Wirt eine Immunantwort gegen ein Selbstantigen, die ursprünglich von einem strukturell ähnlichen Pathogen (Protein mit ähnlicher Aminosäuresequenz) ausgelöst wurde^{40,44-46}. Bei der Multiplen Sklerose wurde unter anderem eine Sequenzhomologie und ein gemeinsames strukturelles Motiv für das ZNS-spezifische *Myelin basic protein* (MPB) und das virale Antigen Hepatitis B (HBV-P) identifiziert⁴⁷. Die Bystander-Aktivierung autoreaktiver T-Zellen wird durch die Zerstörung körpereigener Zellen und der Freisetzung von Selbstantigenen infolge einer Inflammation im peripheren Gewebe ausgelöst^{40,44-46}. Die Selbstantigene werden mitsamt der Pathogene autoreaktiven T-Zellen präsentiert. So wurde nicht nur in Studien ein Zusammenhang zwischen einer Infektion und einer Autoimmunantwort gezeigt, sondern auch, dass mikrobielle Pathogene den Verlauf einer autoimmunen Erkrankung beeinflussen können^{40,48,49}.

1.5.1 Autoimmunerkrankungen

Autoimmunerkrankungen liegen diverse Immunmechanismen zugrunde und können interindividuell unterschiedlich ausgeprägt sein. Eine Autoimmunerkrankung kann sich sowohl organspezifisch manifestieren wie bspw. Multiple Sklerose (MS) oder Diabetes mellitus Typ I, kann aber ebenfalls systemische Wirkung entfalten wie beim Lupus erythematoses. Am Beispiel der Sepsis zeigt sich, dass die Lebensbedrohlichkeit bisweilen auch durch eine überschießende Immunreaktion mitbedingt sein kann⁵⁰.

1.6 Multiple Sklerose

Multiple Sklerose, eine klassische T-Zell-vermittelte Autoimmunkrankheit, betrifft mehr als 2,5 Millionen Menschen weltweit^{51,52}. Die Pathogenese ist in einem neuroinflammatorischen sowie einem neurodegenerativen Teil begründet und spiegelt sich in einer kumulativen neurologischen Disabilität wider^{51,53,54}. Diese charakterisiert sich durch eine autoimmune Inflammation mit Demyelinisierung und daraus resultierenden axonalen Schäden im Zentralnervensystem (ZNS)⁵¹. Trotz unbekannter Ätiologie wird dem Immunsystem eine zentrale Rolle in der Pathogenese zugeschrieben. Viele Studien zeigten, dass bei der autoimmunen Reaktion die Leukozyten in das Gehirn sowie ins Rückenmark migrieren und dort die Myelinschicht zerstören^{55,56}. Durch diese Demyelinisierung entstehen verstreut multiple, entzündliche Läsionen (Plaques) und gliöse Vernarbungen (Sklerose) innerhalb der weißen Substanz des ZNS, die zu einer Verminderung der Leitfähigkeit von Nerven führen. Durch die geschädigten Neurone im ZNS werden die peripheren Nerven und Muskeln durch die gestörte Reizweiterleitung nicht mehr mit genügend Informationen versorgt, es resultieren eine Dysfunktion und meist auch eine Degeneration. Die typischen Symptome wie Sehstörungen oder Lähmungserscheinungen treten meist im Erwachsenenalter zwischen dem 20. und 40. Lebensjahr auf, wobei das Krankheitsverhältnis von Frauen zu Männern ca. 1,6 : 1 beträgt⁵⁷.

Als Auslöser der Erkrankung wird die Kombination von genetischen Faktoren und Umweltfaktoren vermutet. Genom-Screening-Studien zeigten, dass bestimmte Gene, z.B. CTLA-4, welche Signaltransduktionsmoleküle kodieren, mit dem Auftreten von MS in Verbindung gebracht werden können⁵⁸. Zu den möglichen Umweltfaktoren, die eine Rolle in der Entwicklung der MS spielen sowie den Krankheitsverlauf stark beeinflussen können, gehören Infektionserreger wie Retroviren und Herpesviren (humanes Herpesvirus 6 und Epstein-Barr-Virus). Weitere wichtige Faktoren zeigen sich bei der geografischen Verteilung. In den nördlichen und südlichen Breiten bzw. in den westlichen Ländern ist das Auftreten von MS häufiger, die Verteilung nimmt in Richtung der äquatorialen Zone ab⁵⁹. Neben den unterschiedlichen Lebens- und Ernährungsbedingungen (u. a. durch deren Einwirkung auf den Zellmetabolismus) scheint auch Vitamin-D-Mangel eine große Rolle zu spielen⁵⁹⁻⁶¹.

1.6.1 Immunpathogenese

Für eine Immunantwort im ZNS sind zwei Voraussetzungen erforderlich: erstens ein pro-inflammatorisches Milieu im ZNS, das zu einer Hochregulation von MHC-Molekülen, kostimulierenden Rezeptoren sowie Zytokinen führt und zweitens eine antigengesteuerte Immunreaktion⁶².

Eine durch Phagozytose aktivierte antigenpräsentierende Zelle (APZ) verlässt mit einem Antigen beladen den Infektionsort und wandert über die Lymphflüssigkeit in den nächstgelegenen Lymphknoten⁶³. Im Gegensatz zu dem *Myelin basic protein* (MBP), das sich sowohl im peripheren als auch im zentralen Nervensystem befindet, beruht die Bildung spezifischer T-Zellen gegen andere ZNS-Myelinproteine wahrscheinlich auf molekularer Mimikry von Myelinantigen-ähnlichen Strukturen⁴⁴. In den sekundären lymphatischen Organen wie den Lymphknoten präsentiert die APZ das Myelinepitop oder das Myelinkreuzreaktive Epitop einer naiven T-Zelle^{62,63}. Die aktivierte, antigengeprimte T-Zelle migriert durch den Blutkreislauf zur Blut-Hirn-Schranke. Aktivierte T-Zellen exprimieren Adhäsionsmoleküle, Chemokinrezeptoren und Integrine, die es ihnen ermöglichen, die Blut-Hirn-Schranke zu überqueren und ins ZNS einzutreten⁶⁴. Dies scheint entweder direkt über die Kapillaren und Venolen oder indirekt über den Plexus choroideus und den Subarachnoidalraum via Cerebrospinalflüssigkeit zu geschehen⁶⁵. Dabei sind beide T-Zell-Populationen, CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen, unterschiedlichen Bedingungen ausgesetzt. Während die zerebralen Endothelzellen MHC-Klasse I exprimieren und den CD8⁺-T-Zellen das Antigen direkt präsentieren, müssen die CD4⁺-T-Zellen erst von MHC-Klasse II exprimierenden APZ reaktiviert werden⁶⁵. Im ZNS sezernieren die aktivierten CD4⁺-T-Zellen, CD8⁺-T-Zellen, Makrophagen und Mikrogliazellen lösliche Mediatoren wie Zytokine (1.1.4), die eine Demyelinisierung bewirken. Im Gegensatz zu CD4⁺-T-Effektorzellen sind CD8⁺-T-Effektorzellen in der Lage, Oligodendrozyten (Gliazellen im ZNS, die die Myelinscheiden der Axone bilden) direkt zu lysieren, da diese MHC-Klasse-I-Moleküle exprimieren (Abb. 1.5)⁶². Fragmente des zerstörten Myelins im ZNS können die Immunreaktion verstärken, indem sie von APZ phagozytiert werden oder in die Peripherie gelangen und dort weitere Zellen aktivieren.

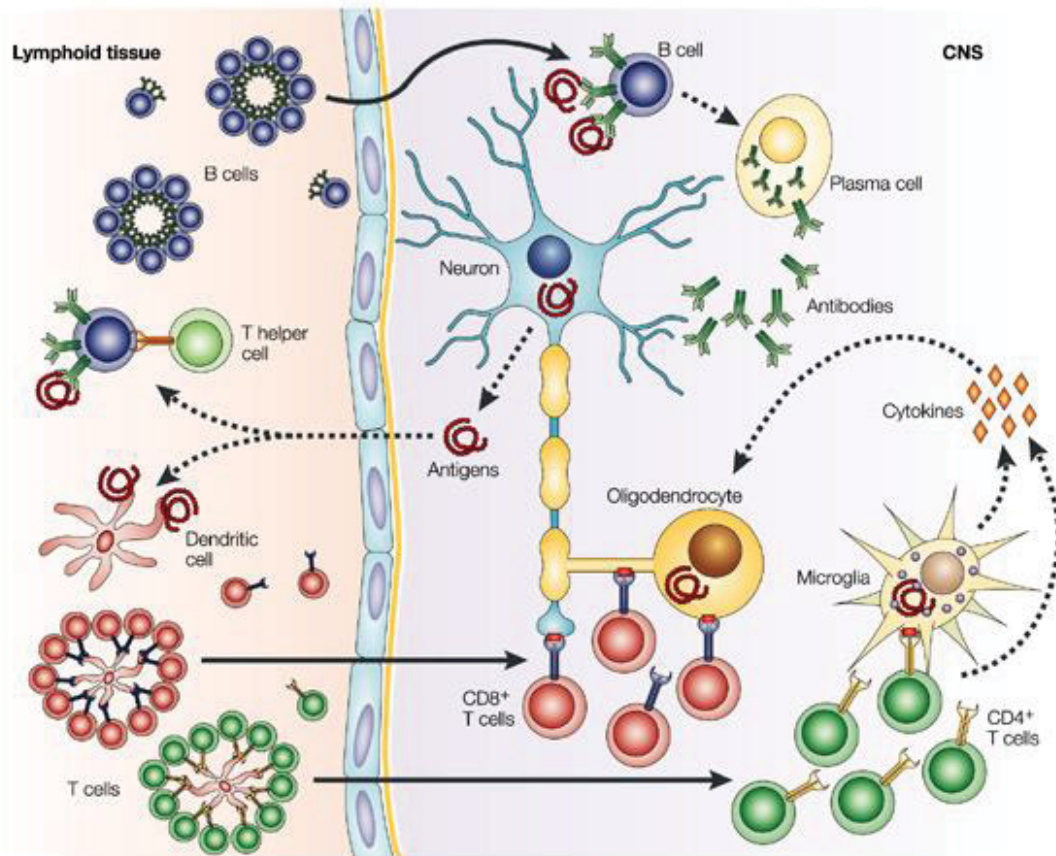


Abb. 1.5: Immunpathogenese der Multiplen Sklerose (modifiziert nach Hemmer *et al.* ⁶²)

Zwei Schritte werden benötigt, um eine Immunantwort auszulösen: 1. ein proinflammatorisches Milieu im ZNS, das zu einer Hochregulation von MHC-Molekülen, kostimulierenden Rezeptoren sowie Zytokinen führt und 2. eine antigengesteuerte Immunreaktion. Die T- und B-Zellen werden im peripheren Lymphsystem durch Antigene (Myelinepitope oder Myelin-kreuzreaktive Epitope) aktiviert. Die dendritischen Zellen als antigenpräsentierende Zellen sind starke Stimulatoren der T-Zellen. Nach klonaler Expansion infiltrieren die T- und B-Zellen das ZNS, wo B-Zellen nach Restimulation mit spezifischen Antigenen zu IgG-Antikörper-sezernierenden Plasmazellen reifen, CD8⁺-T-Zellen können Oligodendrozyten (exprimieren MHC-I-Moleküle) direkt lysieren und CD4⁺-T-Zellen sezernieren nach ihrer Reaktivierung durch APZ und MHC II inflammatorische Zytokine.

1.6.2 Biomarker für MS

Zur Diagnose von MS werden verschiedene Untersuchungen durchgeführt, bspw. die Messung evozierter Potenziale (womit die Leitfähigkeit des Nervensystems untersucht wird) oder die Magnetresonanztomografie (mit welcher demyelinisierende Plaques im ZNS visualisiert werden können). Ein weiterer wichtiger Aspekt in der Diagnostik der MS sind sogenannte Biomarker, die zusätzlich Aufschluss über die Krankheitsaktivität (immunologische Prozesse) und Behandlungsmöglichkeiten geben⁶⁶. Hierfür kommen alle Faktoren in Frage, die in der Immunpathogenese - bestimmt durch Blutproben oder Proben des Liquor cerebrospinalis (*cerebrospinal fluid*, CSF) - eine Rolle spielen. Eine große

Bedeutung in der Krankheitsentwicklung wird unter anderem den von T_H1 sezernierten inflammatorischen Zytokinen IFN- γ und IL-2 sowie dem von T_H17 sezernierten Zytokin IL-17 zugesprochen. Weitere Kandidaten sind Adhäsionsmoleküle und Matrix-Metalloproteinasen, die für die Leukozytenmigration in das ZNS essentiell sind sowie alle Faktoren, die in die Immunantwort oder immunregulatorische Mechanismen involviert sind und somit Einfluss auf den Krankheitsverlauf der MS haben⁶⁶.

1.6.3 Klinischer Verlauf

Aus klinischer Sicht gibt es zwei Hauptformen der MS: Die *relapsing-remitting* MS (RRMS, schubförmig-remittierende MS) mit einer Häufigkeit von über 85% und die *primary-progressive* MS (PPMS, primäre-progrediente MS) mit einer Häufigkeit von 15% (Abb. 1.6)⁵⁹. Bei der RRMS treten in unregelmäßigen Zeitabständen Schübe auf, die sich vollständig zurückbilden oder teilweise bestehen bleiben. Auf Dauer bleiben leichte Behinderungen. Nach mehreren Jahren entwickeln viele Patienten einen sekundär-chronisch progredienten Verlauf. Von einer anfänglich schubförmigen Phase geht diese Form in eine Phase mit einer kontinuierlichen Verschlechterung (mit oder ohne auftretende Schübe) über. Bei der eher selten auftretenden PPMS entwickeln sich die Beschwerden chronisch-progredient - mit oder ohne zusätzliche Schübe, die sich vollständig zurückbilden.

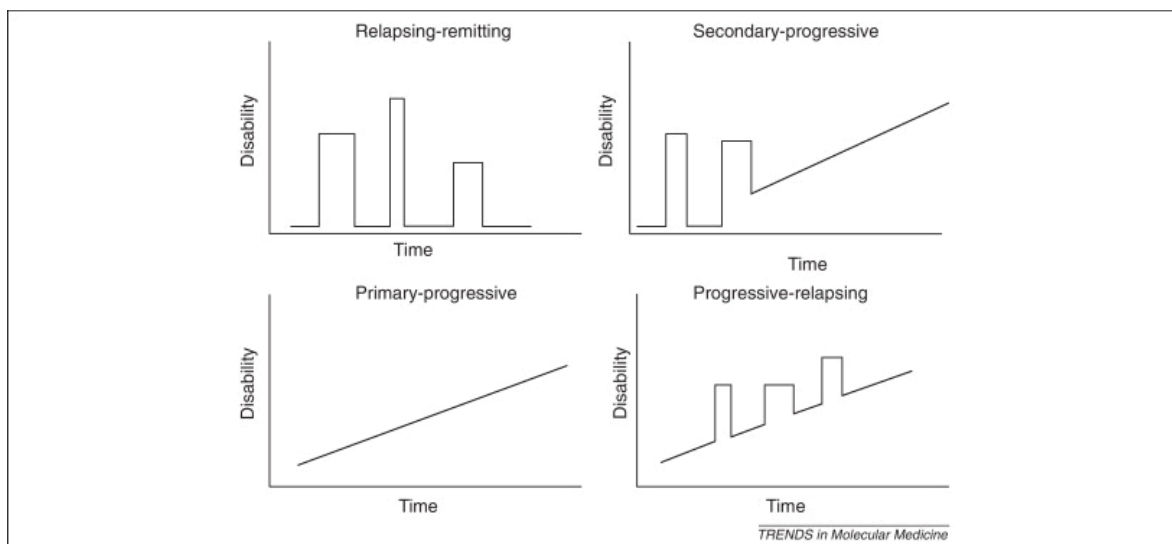


Abb. 1.6: Verlaufsformen der Multiplen Sklerose (modifiziert nach Cavone und Chiarugi)⁶⁷

Aus klinischer Sicht wird die *relapsing-remitting* MS (RRMS, schubförmiger Verlauf) von der *primary-progressive* MS (PPMS, chronisch-progredienter Verlauf mit und ohne zusätzlich auftretende Schübe) unterschieden. Viele Patienten mit einer RRMS entwickeln auf Dauer einen sekundär-chronisch-progredienten Verlauf mit oder ohne auftretende Schübe.

1.6.4 Therapie

Die Basistherapie bei MS besteht aus Immunsuppressiva wie Mitoxantron oder Immunmodulatoren wie Glatirameracetat und Interferon- β ^{68,69}. Ein großer therapeutischer Fortschritt in der Behandlung der MS sind monoklonale Antikörper („Biologicals“), die hochspezifisch binden. Die monoklonalen Antikörper können je nach therapeutischem Wirkmechanismus in drei Kategorien eingeteilt werden: Antikörper, die auf die Modulation der Immunzellmigration in das ZNS wirken (Natalizumab), zytolytische Wirkstoffe (Ocrelizumab, Ofatumumab, Alemtuzumab) sowie Antikörper, die auf Signalwege von Zytokinen, Chemokinen und ihre Rezeptoren wirken (Daclizumab, Secukinumab/AIN457)⁶⁸⁻⁷⁰.

1.7 Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis

Tiermodelle sind sehr hilfreich, um die Induktion und die Pathogenese humaner Erkrankungen zu verstehen, neue Medikamente zu entwickeln oder weitere therapeutische Strategien zu finden. Bei MS wird häufig das murine Tiermodell der Experimentellen Autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE) verwendet, das neuropathologische und neurobiologische Aspekte dieser Erkrankung reflektiert.

Innerhalb der letzten 60 Jahre wurden verschiedene pathophysiologische Formen der EAE entwickelt, abhängig von der Tierspezies, von dem verwendeten Peptid und der Art der Immunisierung. Die EAE kann aktiv durch Immunisierung mit einem Myelinautoantigen in *complete Freund's adjuvant* (CFA) und zusätzlicher Applikation von Pertussistoxin (PTX) oder passiv durch adoptiven Transfer von antigenspezifischen, aktivierten T-Zellen induziert werden⁷¹.

1.7.1 Aktive Immunisierung der EAE

Für die aktive Immunisierung wird in den meisten Protokollen ein Myelinprotein gemischt in CFA verwendet. Die Öl-in-Wasser-Emulsion CFA beinhaltet hitzeinaktivierte *Mycobacteria tuberculosis*, die eine starke Immunreaktion und die Sekretion proinflammatorischer Zytokine induzieren⁷². Etabliert hat sich innerhalb der EAE-Induktion auch die zusätzliche Applikation des Immunverstärkers PTX, wobei die genaue Wirkung noch unbekannt ist. PTX soll durch eine irreversible Inhibierung von *second messengern* wie G-Proteinen Einfluss auf die T-Zell-Differenzierung in den APZ haben, durch eine Erhöhung der vaskulären Permeabilität die Migration autoreaktiver T-Zellen in das ZNS fördern und behilflich sein, der Induktion einer Anergie autoreaktiver T-Zellen vorzubeugen⁷³⁻⁷⁶. Bislang sind viele enzephalitogene Proteine bzw. Myelinantigene entdeckt worden, die eine EAE

induzieren können wie Proteolipid-Protein (PLP), Myelin-basisches Protein (MBP), Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein (MOG) oder Myelin-assoziiertes Glykoprotein (MAG). Der klinische Verlauf der EAE kann wie bei der MS variieren und ist abhängig vom Myelinprotein, der Spezies (z.B. Maus oder Ratte), dem Stamm und wird zudem individuell beeinflusst von Alter und Geschlecht des Tieres (Tab. 1.2)⁷⁷. Klassisch ist die EAE charakterisiert durch eine zunehmende Paralyse, beginnend mit einer (1) Schwanzparese, einer folgenden (2) Ataxie, einer (3) bilateralen Hinterlaufparese, einer (4) Tetraparese und einen (5) moribunden Zustand des Tieres.

Tab. 1.2: Übersicht ausgewählter muriner EAE-Modelle (modifiziert nach Libbey und Fujinami)^{77,78}

Stamm	Enzephalitogen	Klinischer Verlauf/Pathophysiologie	Referenz
C57BL/6	MOG ₃₅₋₅₅	chronisch-progressive inflammatorische demyelinisierende Form	79,80
C57BL/6	MOG ₃₅₋₅₅	chronisch-progressiv, immundominantes Epitop für CD4 ⁺ -T-Zellen	81
C57BL/6	MOG ₃₇₋₅₀	chronisch-progressiv, EAE induziert durch MOG-spez. CD8 ⁺ -T-Zellen	81,82
C57BL/6	PLP ₁₇₈₋₁₉₁	milder ausgeprägte Form im Vergleich zu MOG-induzierter EAE in BL6	83
SJL/J	MOG ₉₂₋₁₀₆	RR mit milder ZNS Demyelinisierung	84
SJL/J	PLP ₁₃₉₋₁₅₁	akute RR Form, ZNS Demyelinisierung und Inflammation	85,86
Biozzi AB/H	MBP ₁₂₋₂₆	milde EAE	87

1.7.2 Myelinstruktur im ZNS und Antigenkandidaten

Die Pathologie der MS wird initiiert durch die Infiltration autoreaktiver T-Zellen in das ZNS, die dort das Myelin immunologisch angreifen⁷¹. Das Tiermodell der MS, die EAE, kann unter anderem aktiv durch die Immunisierung mit einer Myelinkomponente induziert werden. Zu diesen Myelinantigenen zählen MBP, PLP, MOG und MAG (Abb. 1.7).

MBP nimmt etwa 30% des Gesamtproteins ein und ist an der zytoplasmatischen Oberfläche lokalisiert⁸⁸. In Mäusen konnten verschiedene Epitope des MBP (z.B. MBP₈₉₋₁₀₁ / MBP₉₆₋₁₀₉ in SJL/J) identifiziert werden, die von T-Zellen erkannt werden und fähig sind, eine EAE zu induzieren. PLP, ein hydrophobes Protein, ist mit einem Anteil von bis zu 50% das Hauptprotein des Myelins⁸⁸. In Mäusen werden zwei Isoformen, PLP (276 As) und DM-20 (35 As weniger als PLP) exprimiert^{89,90}. DM-20 wird im Thymus exprimiert und kann PLP, im ZNS exprimiert, funktionell nicht ausgleichen^{89,90}. Bei SJL/J Mäusen ist PLP₁₃₉₋₁₅₁ enzephalitogen, dieser Teil von PLP fehlt in DM-20. MAG nimmt etwa 1% des Gesamtproteins ein und ist im inneren Bereich der Myelinscheide lokalisiert⁸⁸. In Nagern gibt es zwei Spleißvarianten. Auch von MAG konnten enzephalitogene Epitope identifiziert

werden⁹¹. MOG beschränkt sich auf die äußere Schicht der Myelinscheide mit einem Anteil von 0,05% des Myelinproteins und ist ein gut untersuchtes Zielantigen enzephalitogener T-Zellen, das in C57BL/6-Mäusen eine EAE induziert⁹². Je nach enzephalitogenem Epitop (MOG₃₅₋₅₅, MOG₃₇₋₅₀, MOG₃₇₋₄₆, MOG₄₂₋₅₀) sind bei der EAE-Induktion mehr CD4⁺-T-Zellen, CD8⁺-T-Zellen oder auch beide Zelltypen involviert⁸¹.

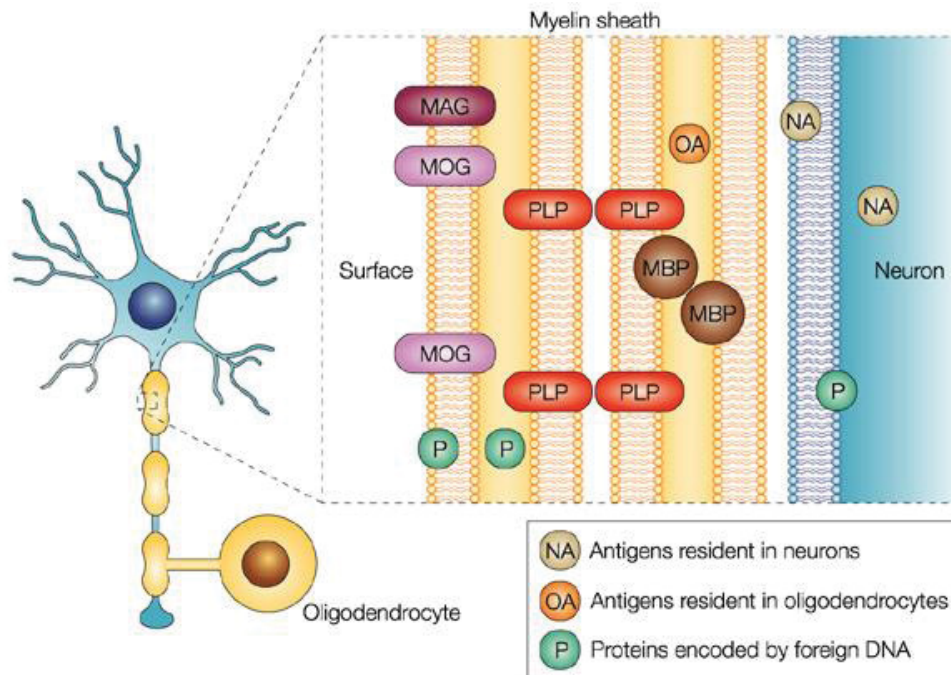


Abb. 1.7: Myelinstruktur im ZNS und Antigenkandidaten (modifiziert nach Hemmer *et al.*)⁶² Potenzielle Ziele einer Immunantwort in MS und EAE sind Proteine der Myelinscheide, Oligodendrozyten und Neurone. Mögliche Antigenkandidaten sind Myelinantigene, neuronale Antigene und Proteine aus Infektionserregern. Proteolipid-Protein (PLP), Myelin-basisches Protein (MBP), Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein (MOG) oder Myelin-assoziiertes Glykoprotein (MAG).

2 Ziel der Arbeit

In vielen Studien werden IL-17-sezernierende CD4⁺- und CD8⁺-T-Zell-Populationen sowie die Aktivierung von PRRs (durch eine Infektion bzw. PAMPs) mit verschiedenen Autoimmunerkrankungen in Verbindung gebracht. Ziel dieser Arbeit war es, die Rolle IL-17-sezernierender CD8⁺-T-Zellen (T_C17) in der EAE, dem Tiermodell der MS, und den Einfluss von PAMPs auf antigengeprimte (MOG₃₇₋₅₀, MOG₃₅₋₅₅) und ungeprimte T-Zell-Populationen zu untersuchen. Die Arbeit kann insgesamt in drei Teilziele untergliedert werden:

1. Die Charakterisierung von IL-17-sezernierenden T-Zell-Populationen in der MOG₃₇₋₅₀- und MOG₃₅₋₅₅-induzierten EAE

In diesem Teil soll das MOG₃₇₋₅₀-induzierte EAE-Modell etabliert werden, ein Modell, bei dem eine EAE-Induktion durch die Präsenz peptidspezifischer CD8⁺-T-Zellen charakteristisch ist. Ein Zytokinprofil verschiedener T-Zell-Populationen soll im fortschreitenden Krankheitsverlauf (Peripherie und ZNS) erstellt und mit dem des MOG₃₅₋₅₅-induzierten EAE-Modells (immundominantes Epitop für CD4⁺-T-Zellen) verglichen werden.

2. Der Einfluss verschiedener PAMPs auf die IL-17-Sekretion von MOG₃₇₋₅₀- und MOG₃₅₋₅₅-spezifischen T-Zell-Populationen

Ein weiteres Ziel war es, den Einfluss verschiedener PAMPs auf das Zytokinmuster antigen-geprimter und ungeprimter T-Zell-Populationen zu untersuchen. Bis auf den Dectin-1-Liganden Curdlan wurden Liganden verschiedener TLR, einer Schlüsselfamilie von PRRs in der Steuerung inflammatorischer Prozesse, eingesetzt.

3. Der Einfluss von Zymosan und CpG auf das Zytokinprofil naiver Thymozyten und Splenozyten

Eine bakterielle oder fungale Infektion kann komplexe inflammatorische Prozesse auslösen und zu einer Sepsis führen. In diesem Teil soll der Einfluss von Zymosan (fungale Infektion) und CpG (bakterielle Infektion) auf reife und unreife Immunzellen (Thymozyten und Splenozyten) untersucht werden.

3 Material und Methoden

Alle Verbrauchsmaterialien und Chemikalien, die unter sterilen Bedingungen Verwendung finden sollten, wurden vor ihrer Benutzung autoklaviert bzw. steril filtriert. Alle Puffer und Lösungen wurden mit deionisiertem, *Millipore*-gereinigtem Wasser angesetzt. Die pH-Werte wurden mit HCl bzw. NaOH eingestellt.

3.1 Material

3.1.1 Firmen

Tab. 3.1: Firmen und ihr Sitz

Firma	Sitz	
Actavis Deutschland GmbH	München	Deutschland
Aeskulap	Tuttlingen	Deutschland
Applied Biosystem	Darmstadt	Deutschland
BD Bioscience	Heidelberg	Deutschland
Biolegend	San Diego	USA
Biometra	Göttingen	Deutschland
BioRad Laboratories GmbH	München	Deutschland
BioTrend	Köln	Deutschland
Braun	Melsungen	Deutschland
Carl Roth	Karlsruhe	Deutschland
Corning	New York	USA
C.T.L.	Shaker Heights	USA
Difco Laboratories	Detroit	USA
eBioscience	Frankfurt am Main	Deutschland
Eppendorf	Hamburg	Deutschland
Ginco	Karlsruhe	Deutschland
GraphPad Software Inc.	San Diego	USA
Greiner Bio One	Kremsmünster	Deutschland
Heraus	Hanau	Deutschland
Hettich	Tuttlingen	Deutschland
Hirschmann-Laborgeräte	Eberstadt	Deutschland
Hund	Wetzlar	Deutschland
Invivogen	San Diego	USA
Janvier Labs	Le Genest-Saint-Isle	Frankreich
Labinco	Breda	Niederlande
Leica Microsystems	Wetzlar	Deutschland
Liebich	Bielefeld	Deutschland

Liebherr	Biberbach	Deutschland
Life Technologies	Carlsbad	Deutschland
LO – Laboroptik GmbH	Friedrichsdorf	Deutschland
Lonza	Basel	Schweiz
Memmert	Schwabach	Deutschland
Merck	Darmstadt	Deutschland
Miltenyi Biotec	Bergisch Gladbach	Deutschland
MWG Eurofins	Ebersberg	Deutschland
neoLab	Heidelberg	Deutschland
PAA Laboratories	Cölbe	Deutschland
Peqlab	Erlangen	Deutschland
Roth	Karlsruhe	Deutschland
Sartorius	Göttingen	Deutschland
Sigma-Aldrich	Steinheim	Deutschland
Starlab	Ahrensberg	Deutschland
Stemcell Technologies	Köln	Deutschland
Thermo Fisher Scientific	Waltham	USA
Wolfram Droh GmbH	Mainz	Deutschland

3.1.2 Verwendete Geräte

Tab. 3.2: Verwendete Geräte und ihre Hersteller

Geräte	Hersteller
Analysenwaage	Sartorius
Brutschrank HERAccl	Thermo Fisher Scientific
Durchflusszytometer FACSCanto™	BD Biosciences
Durchflusszytometer Guava EasyCyte8	Merck
EasySep™ Magnet	StemCell Technologies
ELISpot Plate Reader ImmunoSpot®	CTL
Heizblock Thermochem	Liebis
Kühlschrank 4°C	Liebherr
MACS-Separator OctoMACS™	Miltenyi Biotec
Mikroskop Leica DME	Leica Microsystems
Mikroskop Wilovert S	Hund
Millipore DestWasserAnlage	Merck
Multistep Pipette	Eppendorf

Nanodrop®ND-1000 Spectrophotometer	Peqlab
Neubauer-Zählkammer	LO – Laboroptik GmbH
PCR System 7900HT Fast Real-Time PCR	Applied Biosystems
Pipetten (2,5; 10; 20; 100; 200; 1.000 µl)	Eppendorf
Pipettus	Hirschmann-Laborgeräte
Präparationsbesteck	Aeskulap
Reinstwassersystem, Milli-Q®	Merck
Sterilbank Modell HeraSafe KS / KSP	Heraus
Thermomixer comfort 1,5 ml	Eppendorf
Tiefkühlschrank -20°C	Liebherr
TRIO-Thermoblock	Biometra
Vortex Mixer L46	Labinco
Waage Acculab vicon	Sartorius
Wasserbad	Memmert
Zentrifuge Heraeus Fresco 17	Thermo Fisher Scientific
Multifuge 3S-R	Thermo Fisher Scientific
Megafuge 40 R	Thermo Fisher Scientific
minispin	Eppendorf
EBA 12	Hettich

3.1.3 Verbrauchsmaterialien

Tab. 3.3: Verwendete Verbrauchsmaterialien und ihre Hersteller

Material	Hersteller
Cryo.s	Greiner Bio One
Combitips (0,5 – 5 ml)	Eppendorf
Drei-Wege-Hahn	Braun
Einwegpipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml)	Corning
FACS-Röhrchen	BD
Kanülen Microlance	BD
MicroAmp® Optical 96- <i>well</i> reaction plate	Applied Biosystems
MultiScreen HTS 96- <i>well</i> Plate	Merck
MS Columns	Miltenyi Biotec

Petrischalen (3,5 – 9 cm)	Greiner Bio One
Pipettenspitzen (10 - 1.000 µl)	Starlab, Ahrensberg
Reagenzröhrchen Falcon (15 ml, 50 ml)	Greiner Bio One
Reaktionsgefäße (0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml, 5 ml)	Eppendorf
Spritzen (1, 3, 5, 10, 20 ml)	Braun
Sterilfilter 0,45 µm Durchmesser	Roth
well Platten (6 - 96 wells)	Greiner Bio One
Zellkulturschalen	Greiner Bio One
Zellsiebe (40 µm, 70 µm)	BD

3.1.4 Chemikalien

Tab. 3.4: Verwendete Chemikalien und die Bezugsquelle

Chemikalien	Bezugsquelle
2-Propanol	Sigma Aldrich
Ammoniumchlorid (NH ₄ Cl)	Merck
Brefeldin A	eBioscience
Bovines Serumalbumin (Fraktion V)	Carl Roth
Calciumchlorid (CaCl ₂)	Merck
Chloroform	Carl Roth
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Merck
Dinatrium-ethylendiamin-tetraacetat (Na ₂ H ₂ EDTA)	Carl Roth
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma Aldrich
Fixable Viability Dye-eFluor® 660	eBioscience
Ethanol	Carl Roth
Isofluran	Actavis Deutschland GmbH
Kaliumcarbonat (K ₂ CO ₃)	Merck
Kaliumchlorid (KCl)	Merck
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Merck
Natriumchlorid (NaCl)	Merck
TRIzol®	Gibco

3.1.5 Kits

Tab. 3.5: Verwendete Kits und die Bezugsquelle

Bezeichnung des Kits	Bezugsquelle
AP Conjugate Substrate Kit	BioRad
BD Cytofix/Cytoperm™	BD Bioscience
Fixation/Permeabilization solution Kit with BD GolgiStop	
CD4 (L3T4) MicroBeads, mouse	Miltenyi Biotec
CD8a (Ly-2) MicroBeads, mouse	Miltenyi Biotec
EasySep Mouse CD4+ T Cell Isolation Kit	StemCell Technologies
EasySep Mouse CD8+ T Cell Isolation Kit	StemCell Technologies
Intracellular Fixation & Permeabilization Buffer Set	eBioscience
Power SYBR® Green PCR Master Mix	Life Technologies
SuperScript® III First-Strand Synthesis System for RT-PCR	Life Technologies

3.1.6 Substanzen und Medien für die Zellkultur

3.1.6.1 Medien und Zusätze

Tab. 3.6: Verwendete Substanzen und die Bezugsquelle

Substanzen	Bezugsquelle
Fetales Rinderserum (FCS)	PAA Laboratories
L-Glutamin	Life Technologies
Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep)	Life Technologies

3.1.6.2 Lösungen

Tab. 3.7: Verwendete Lösungen und die Bezugsquelle

Lösungen	Bezugsquelle
Trypanblau-Lösung (0,4 %)	Sigma Aldrich

3.1.6.3 Medien

Tab. 3.8: Verwendete Medien und die Bezugsquelle

Medien	Bezugsquelle
Dublecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Gibco
HL-1 serumfreies Medium	Lonza

3.1.7 Puffer und Lösungen

Tab. 3.9: Verwendete Puffer und ihre Zusammensetzung

Lösungen	Bezugsquelle
FACS-Puffer	PBS 2% FCS
MACS-Puffer	PBS 0,5 % BSA 2 mM EDTA pH 7,2
PBS	1,37 M NaCl 27 mM KCl 65 mM Na ₂ HPO ₄ 15 mM KH ₂ PO ₄ in H ₂ O; pH 7,4
PBS/BSA	PBS 2,5% BSA

3.1.8 Software für die Datenanalyse

Tab. 3.10: Verwendete Software und ihre Hersteller

Software	Hersteller
DIVA v6.1.3	BD
Guava EasyCyte version 2.2.2	Merck
Immunospot 5.0	C.T.L.
PRISM 5	GraphPad Software Inc.

3.2 Tierexperimentelle Methoden

In allen Experimenten wurden weibliche Wildtyp-Mäuse im Alter zwischen 8 und 12 Wochen verwendet. Überwiegend wurden diese von Janvier (Le Genest Saint Isle, Frankreich) bezogen, selten entstammten sie aus interner Zucht der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf. Alle verwendeten Mäuse wurden im zentralen Tierlaboratorium Düsseldorf der Heinrich-Heine-Universität gehalten. Die Tiere lebten unter standardisierten Bedingungen in einem 12-stündigen Hell-Dunkel-Rhythmus bei konstanter Temperatur ($20\pm 2^\circ\text{C}$) und Luftfeuchtigkeit. Wasser und pelletiertes Futter erhielten die Tiere *ad libitum*. Für die Versuche wurden die in Tabelle 3.11 aufgeführten Mauslinien verwendet.

Tab. 3.11: Verwendete Mauslinien und ihre Herkunft

Mauslinie	Herkunft
C57BL/6J	Hauseigene Zucht, Janvier Labs
Swiss Jim Lambert (SJL)/J	Janvier Labs

3.2.1 Induktion der EAE

Die EAE ermöglicht die Nachahmung der Symptome der Autoimmunkrankheit Multiple Sklerose im Tiermodell, um die Ursache der Krankheit zu untersuchen sowie neue Behandlungsstrategien entwickeln zu können. Durch autoimmune Reaktionen werden Axone im ZNS demyelinisiert und dadurch Lähmungserscheinungen der Extremitäten hervorgerufen. Induziert wird die EAE durch die Injektion einer Emulsion - bestehend aus einem Myelinautoantigen in *complete Freund's adjuvant* (CFA) (Difco, Detroit, MI, USA) - und Pertussis Toxin (PTX) (Sigma-Aldrich).

3.2.1.1 Herstellung der Emulsion

Für die Herstellung der Emulsion wurden drei verschiedene Myelinautoantigene (BioTrend, Köln, Deutschland) verwendet. Das jeweilige Autoantigen wurde in PBS in einer Konzentration von 2 mg/ml gelöst und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert. Zur Herstellung des *complete Freund's adjuvant* (CFA) wurden 10 mg/ml abgetötete Mykobakterien (*Mycobacterium tuberculosis*) in *incomplete Freund's adjuvant* (IFA) (Difco, Detroit, MI, USA) gelöst, bei 4°C gelagert und vor der Verwendung weiter mit IFA verdünnt. Beide Komponenten, das jeweilige Autoantigen und CFA, wurden durch zwei Spritzen mithilfe eines Dreivegehahns emulgiert, kühl (4°C) gelagert und zur Applikation in eine 1ml-Spritze überführt. PTX wurde in PBS in einer Konzentration von 0,8 µg/ml in PBS vermengt, da pro Tier 500 µl injiziert wurden, entspricht dies 0,4 µg PTX pro Tier. Die eingesetzten Adjuvans-Komponenten und Injektionsvolumina sind in Tabelle 3.12 aufgeführt.

Tab. 3.12: Komponenten der Antigen-Emulsion

Autoantigen	Injektion pro Tier
MOG ₃₇₋₅₀ Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein Peptid	200 µg MOG ₃₇₋₅₀ in PBS + 400 µg CFA in IFA
MOG ₃₅₋₅₅ Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein Peptid	200 µg MOG ₃₅₋₅₅ in PBS + 400 µg CFA in IFA
PLPp ₁₃₉₋₁₅₁ Proteolipid Protein Peptid	100 µg PLPp + 50 µg CFA in IFA

3.2.1.2 Immunisieren der Mäuse

Den Mäusen wurde insgesamt jeweils 200 µl MOG-Emulsion oder 100 µl PLPp-Emulsion subkutan in die rechte obere Flanke injiziert (Abbildung 3.1). Zusätzlich wurden an Tag 0 und Tag 2 intraperitoneal je 500 µl PTX pro Tier appliziert.

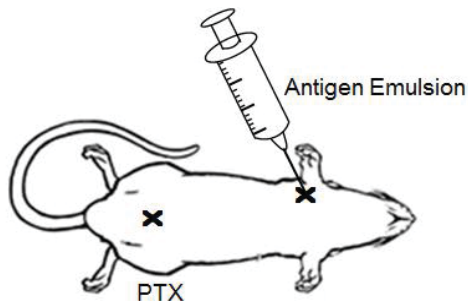


Abb. 3.1: Immunisierung der Mäuse mit Antigen-Emulsion und PTX (modifiziert nach Gage *et al.*⁹³) Die Antigen-Emulsion, bestehend aus einem Myelinautoantigen und in *incomplete Freund's adjuvant* gelösten Mykobakterien, wurde subkutan in die rechte obere Flanke injiziert (Kreuz). An Tag 0 und 2 erfolgte zusätzlich die Injektion von Pertussistoxin (PTX) intraperitoneal.

3.2.1.3 Klinische Evaluation der Mäuse

Der Allgemeinzustand der Versuchstiere wurde täglich untersucht und bewertet. Um den fortschreitenden Verlauf der EAE bzw. den Schweregrad der Lähmungserscheinung zu quantifizieren, wurde den Mäusen ein in Tabelle 3.13 aufgeführter klinischer Score zugeordnet.

Tab. 3.13: Klinischer EAE-Score

Score/Grad	klinische Symptome
0	keine Symptome
0,5	partielle Schwanzparese
1,0	vollständige Schwanzparese
1,5	Herabsetzen des Hinterleibs
2,0	Ataxie, watschelnder Gang
2,5	unilaterale Hinterlaufparese
3,0	bilaterale Hinterlaufparese
3,5	bilaterale Hinterlaufparese und Vorderlaufschwäche
4,0	Tetraparese (Abbruchkriterium)
5,0	moribund

3.2.2 Organentnahme

Puffer und Medien für die Organentnahme

PBS

Medium: DMEM

3.2.2.1 Tötung der Tiere

Die Versuchstiere wurden in verschiedenen Stadien des Krankheitsverlaufs getötet, um Organe zu entnehmen und immunologische sowie biochemische Analysen zur Pathogenese durchführen zu können. Die Tötung der Tiere erfolgte gemäß § 4 TierSchG unter Narkose mit Isofluran durch zervikale Dislokation. Für die Betäubung wurde ein Papiertuch mit Isofluran getränkt und zu dem Versuchstier in eine Glasglocke gelegt.

3.2.2.2 Perfusion und Präparation der Mäuse

Das Fell wurde auf der ventralen Seite unter dem Thorax eingeschnitten und vorsichtig abgezogen. Vor der Entnahme der Organe wurde der Blutkreislauf mit 10 ml eiskaltem PBS gespült, um die Erythrozyten für weitere immunologische Untersuchungen zu entfernen. Hierzu wurde der Thorax vorsichtig geöffnet und das Herz frei präpariert. Der rechte Herzventrikel wurde mit einer Schere geöffnet und das PBS mit der Spritze in den linken Herzventrikel appliziert. Die entsprechenden Organe wie Milz, Thymus und Rückenmark wurden nach der Perfusion herauspräpariert, in DMEM überführt und bis zur weiteren Verarbeitung auf Eis belassen.

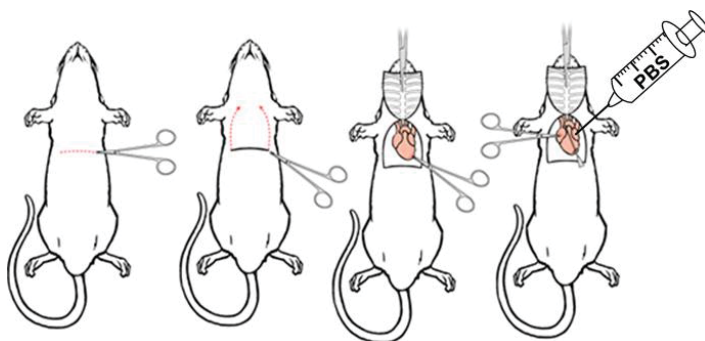


Abb. 3.2: Perfusion der Tiere (modifiziert nach Gage *et al.*)⁹³

Nach der Entfernung des Fells wurde der Thorax mit einer Schere geöffnet und das Herz frei präpariert. Der rechte Herzventrikel wurde mit einer Schere geöffnet. Durch das Spritzen von PBS in den linken Herzventrikel wurde das Blut im Kreislauf durch PBS ersetzt.

3.3 Zellbiologische Methoden

Alle in dieser Arbeit verwendeten Primärkulturen wurden bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert.

3.3.1 Herstellung von Single-Zellsuspensionen

Puffer und Medien für die Organentnahme

PBS

Medium: DMEM

HL-1 (BioWhittaker), 1% Glutamin, 1% Penicillin/Streptomycin

Die Organe wurden in 10 ml DMEM überführt. Um Einzelzellsuspensionen zu erhalten, wurden die Organe mithilfe eines sterilen Spritzenkolbens homogenisiert und durch ein 40 µm/70 µm Zellsieb gegeben. Vor Zentrifugation der Zellsuspension (1200 rpm, 10 min, 4°C) wurde die Zellzahl mittels einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Hierbei wird durch das Auflegen eines Deckglases auf die Neubauer-Zählkammer ein bekannter Zwischenraum von $0,1 \text{ mm}^3 = 0,1 \text{ µl}$ pro Großquadrat geschaffen. Nach Verdünnung mit Trypanblau (1:10) wurde die Zellsuspension in den Zwischenraum gegeben und die vier Großquadrate, bestehend aus je vier kleineren Quadraten, unter dem Mikroskop ausgezählt und der Mittelwert gebildet. Durch Einbeziehen der Verdünnung und des Ausgangsvolumens ergibt sich die Zellzahl pro $0,1 \text{ µl}$ ($\times 10^4$ pro ml). Die Zellen wurden auf das gewünschte Volumen eingestellt und je nach Weiterverarbeitung entsprechend mit Medium oder Puffer verdünnt.

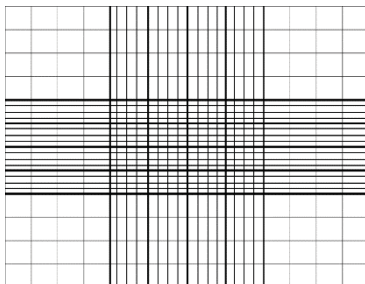


Abb. 3.3: Neubauer-Zählkammer Die Teilchenzahl pro Volumeneinheit einer Flüssigkeit kann mittels Neubauer-Zählkammer bestimmt werden.

3.3.2 Magnetische Separation von Zellpopulationen

Die magnetische Separation ermöglicht die positive und die negative Isolierung verschiedener Zellpopulationen anhand ihrer Oberflächenmoleküle. Einzelzellsuspensionen werden hierbei mit Antikörpern inkubiert, die an magnetische Nanopartikel, sogenannte MicroBeads, gekoppelt sind. Diese Antikörper binden an die Oberflächenmoleküle der gewünschten

(Positivselektion) oder der nicht gewünschten (Negativselektion) Zellpopulation. Mittels eines Magnetfeldes wird die markierte von der unmarkierten Zellpopulation getrennt.

Die magnetische Zellseparation erfolgte hier mit der EasySep Methode der Firma Stemcell™ Technologies (3.3.2.1) und mit der *Magnetic Activated Cell Sorting* (MACS) Methode der Firma Miltenyi Biotec (3.3.2.2).

3.3.2.1 Negativselektion von CD4⁺- und CD8⁺-Zellen mit EasySep

Puffer und Medien für die Zellseparation mit EasySep

PBS, RoboSep™-Puffer

Medium: HL-1 (BioWhittaker), 1% Glutamin, 1% Penicillin/Streptomycin

Die Zellen wurden mit PBS gewaschen, und für 10 min bei 1200 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert. In einer Konzentration von 10^8 Zellen/ml wurden die Zellen in RoboSep™-Puffer aufgenommen. CD4⁺- sowie CD8⁺-T-Zellen wurden gemäß des Mouse CD4⁺ T Cell Isolation Kits' bzw. 'Mouse CD8⁺ T Cell Isolation Kits' durch Negativselektion und unter Verwendung des EasySep™ Magneten (geeignet für die Isolation von bis zu $2,5 \times 10^8$ Zellen) separiert. Alle Schritte erfolgten bei Raumtemperatur. Für die Isolierung wurden die Zellen in ein 5 ml *Polystyrene Round-Bottom Tube* überführt und 50 µl/ml Rattenserum sowie 50 µl/ml des EasySep™ Mouse CD4⁺ Cell Isolation Cocktail oder EasySep™ Mouse CD8⁺ Cell Isolation Cocktail hinzugefügt. Nach 10-minütiger Inkubation folgte die Zugabe von EasySep™ Streptavidin Rapid Spheres™ - 75 µl/ml Zellen für 2,5 min zu dem CD4⁺- und 125 µl/ml für 5 min zu dem CD8⁺-Separationsansatz. Das Volumen wurde im Anschluss mit dem RoboSep™-Puffer auf 2,5 ml gebracht und für 2,5 min in dem Magneten belassen. Durch Invertieren des Tubes und Magneten für 2-3 Sekunden wurde die gewünschte Zellpopulation in ein 15 ml Falcon überführt bzw. separiert. Die Zellsuspension wurde bei 2400 rpm für 4 min und bei Raumtemperatur zentrifugiert, in 1 ml PBS aufgenommen und erneut zentrifugiert. Nach der Zellzahlbestimmung wurden die Zellen in 10^6 Zellen pro ml in HL-1 Medium aufgenommen und bis zur Weiterverarbeitung auf Eis belassen. Die Reinheit der Zellen wurde mittels FACS-Analyse überprüft (Abb. 3.4 B).

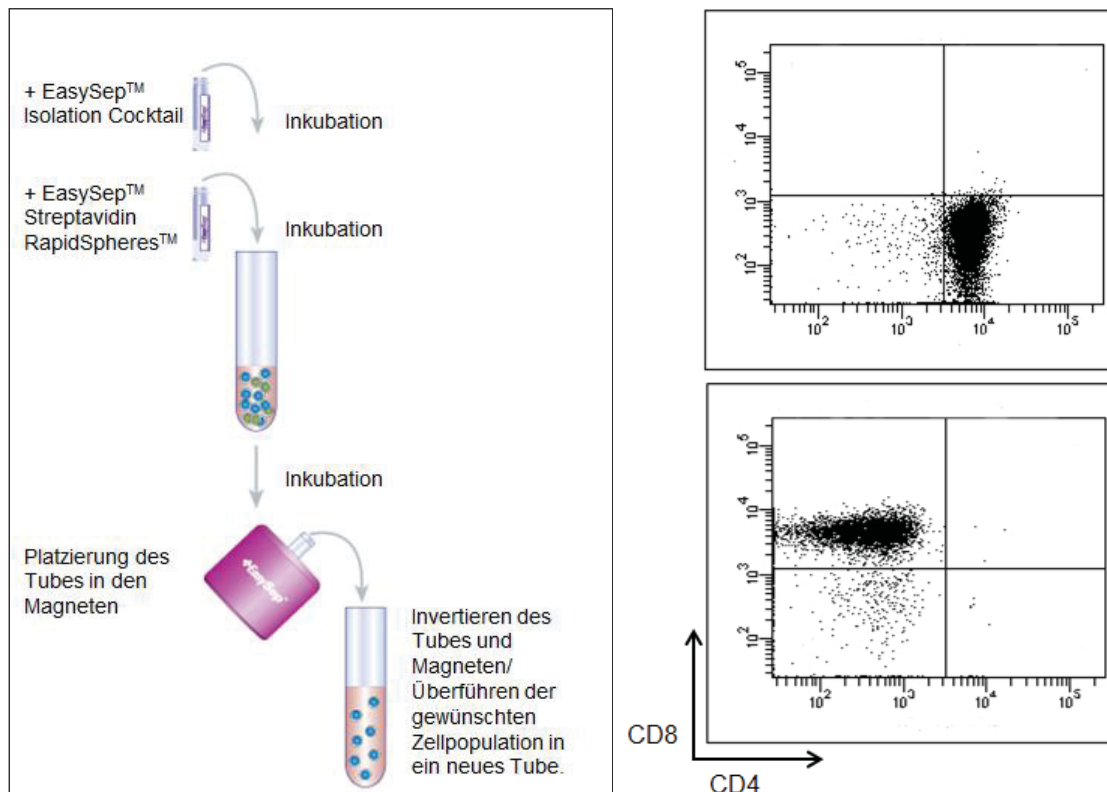


Abb. 3.4: Schematische Darstellung der Zellseparation mit EasySep™ und die Reinheitsüberprüfung mittels FACS-Analyse (3.5.2) (A) Die Einzelzellsuspensionen werden mit dem EasySep™ Isolation Cocktail und im Anschluss mit dem EasySep™ Streptavidin RapidSpheres™ inkubiert. Nach dem Belassen der Zellsuspension im Magneten werden die markierten Zellen im Tube zurückgehalten, während die unmarkierten Zellen durch das Invertieren ungehindert in ein neues Tube überführt werden können. (B) Überprüfung der Reinheit der CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen mittels FACS-Analyse. Die Zellen wurden gated auf Lymphozyten > lebende Zellen.

3.3.2.2 Separation der APZ / Positivselektion von CD4⁺- und CD8⁺-Zellen mit MACS-Separation

Puffer und Medien für die Zellseparation mit MACS

PBS, MACS-Puffer (0.5 % BSA, 2mM EDTA, PBS; pH: 7,2)

Medium: HL-1 (BioWhittaker), 1% Glutamin, 1% Penicillin/Streptomycin

Die Einzelzellsuspensionen wurden 1x mit 10 ml MACS-Puffer gewaschen und für 10 min bei 1200 rpm und 4°C zentrifugiert. In 90 µl MACS-Puffer pro 10⁷ Zellen aufgenommen, wurde den Zellen 10 µl pro 10⁷ Zellen der CD4⁺-MACS-Beads hinzugefügt. Mittels Vortexen wurde die Suspension gut vermischt und für 15 min bei 4°C inkubiert. Nach Zugabe von 1 ml MACS-Puffer pro 10⁷ Zellen wurde die Suspension für 10 min bei 1300 rpm und 4°C zentrifugiert und im Anschluss in 500 µl MACS-Puffer (bei weniger als 10⁸ Zellen) resuspendiert. Die Zellsuspension wurde auf Säulen (MS Columns, Miltenyi Biotec) gegeben (Abb. 3.5), die sich in einem Magnetfeld, bestehend aus dem MultiStand und dem OctoMACS™ Separator (Miltenyi Biotec) befanden und zuvor 2x mit MACS-Puffer vorgespült wurden. Sobald die

Zellsuspension die Säule durchlaufen hatte, wurde diese 3x mit 500 µl MACS-Puffer nachgespült. Die durchgelaufenen und damit CD4⁺-Zellen wurden für 10 min bei 1200 rpm und 4°C zentrifugiert. Es erfolgte ein erneuter Durchgang mit CD8⁺-MACS-Beads. Die Ausgangssuspension wurde im Anschluss 1x mit PBS gewaschen, für 10 min bei 1200 rpm zentrifugiert und in 1 ml Medium aufgenommen. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Zellen bei 4°C belassen.

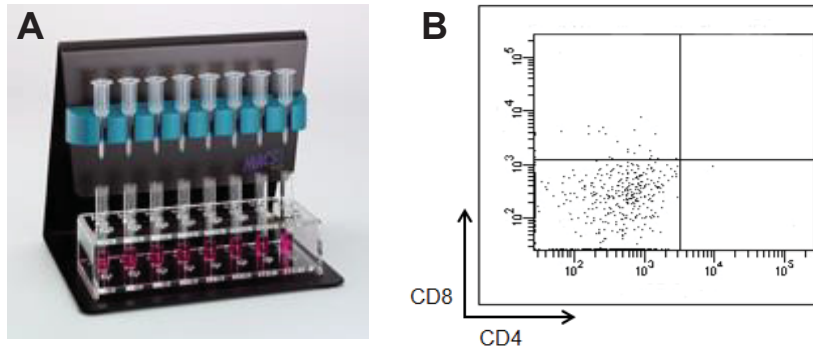


Abb. 3.5: Manuelle Zellseparation mit der MACS-Technologie (Miltenyi Biotec) und die Reinheitsüberprüfung mittels FACS-Analyse (3.5.2) (A) MultiStand, OctoMACS™, MACS 15 ml Tube Rack und MS Columns für die negative und positive Selektion von Zellpopulationen. (B) Überprüfung der Reinheit der antigenpräsentierenden Zellen mittels FACS-Analyse. Die Zellen wurden gated auf Lymphozyten > lebende Zellen.

3.3.3 Stimulation der Zellen mit Antigenen

Die Zellen wurden mit den in Tab. 3.14 aufgeführten Antigenen entweder alleine oder in Kombination stimuliert - ein Myelinpeptid bzw. αCD3 aus dem oberen Tabellenabschnitt mit einem Reagenz aus dem unteren Tabellenabschnitt. Alle Reagenzien wurden gemäß der Herstellerangaben gelöst und gelagert.

Tab. 3.14: Verwendete Antigene

Antigen	Bezugsquelle	Konzentration
MOG ₃₅₋₅₅	BioTrend	20 µg/ml
MOG ₃₇₋₅₀	BioTrend	20 µg/ml
PLP ₁₃₉₋₁₅₁	BioTrend	20 µg/ml
<i>Purified anti mouse CD3 (145-2C11)</i>	BD	1 µg/ml
Curdan AL	Invivogen	100 µg/ml
dsDNA-EC (endotoxin-free bacterial DNA from <i>E. coli</i> K12; CpG)	Invivogen	2,5 µg/ml
Loxoribine	Invivogen	0,5 mM
LPS-EB	Invivogen	1 µg/ml
Polyinosinic-polycytidylic acid sodium salt (Poly I:C)	Sigma-Aldrich	50 µg/ml
Zymosan	Invivogen	1 µg/ml

3.4 Molekularbiologische Methoden

3.4.1 Isolierung von RNA aus Gewebe

Für die RNA-Isolierung wurde die Probe mit 1 ml Trizol-Reagenz lysiert und mithilfe eines Spritzenstempels und einer Pipette homogenisiert. Um die RNA durch eine Chloroform-Isopropanol-Fällung zu gewinnen, wurde dem Ansatz zunächst 200 µl Chloroform hinzugefügt. Nach einer Inkubationszeit von 10 min bei Raumtemperatur erfolgte eine Zentrifugation für weitere 10 min bei 13.000 rpm. Die wässrige Phase wurde mit einer Pipette abgezogen und zu gleichen Anteilen Isopropanol hinzugefügt. Der Ansatz wurde für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert, nachdem das Gefäß mehrfach invertiert wurde. Die RNA wurde durch Zentrifugation für 30 min bei 13.000 rpm und 4°C pelletiert und nach Entfernen der wässrigen Phase in 1 ml 75%igem Ethanol aufgenommen. Der Ansatz wurde erneut zentrifugiert (15 min, 13.000 rpm, 4°C), das Ethanol vorsichtig abgenommen und die gereinigte RNA wurde für mindestens eine Stunde bei Raumtemperatur getrocknet. Die RNA wurde für 5 min bei 65°C in 20 µl DEPC-behandeltem Wasser eluiert und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

3.4.2 Bestimmung der Konzentration von RNA und DNA

Die Konzentration der Nukleinsäure wurde photometrisch mit dem Nanodrop®ND-1000 Spectrophotometer (Peqlab) bestimmt. Gemessen wurde die optische Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 260 nm, dies entspricht dem Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren. Eine OD₂₆₀ von 1 ist dabei äquivalent zu 50 µg/ml doppelsträngiger DNA und 40 µg/ml RNA. Der Quotient aus OD₂₆₀ und OD₂₈₀ - Verunreinigungen von Proteinen werden bei diesem Wert detektiert - liegt bei reinen Nukleinsäure-Präparationen zwischen 1,8 und 2,0. Nur reine Proben wurden im Rahmen dieser Arbeit verwendet.

3.4.3 Synthese von cDNA

Die reverse Transkription zur Synthese von komplementärer DNA (cDNA) aus mRNA erfolgte mittels der SuperScript® III First-Strand Synthesis System for RT-PCR. Das Kit wurde nach Herstellergabe verwendet und die synthetisierte cDNA bei -20°C gelagert.

3.4.4 Quantitative RealTime-PCR

Die Methode der quantitativen RealTime Polymerase-Kettenreaktion (PCR) dient zur Analyse der Transkription spezifischer Gene und beruht auf dem Prinzip herkömmlicher PCR. 1985 wurde das Prinzip der PCR, in der DNA-Sequenzen vervielfältigt werden können, von Saiki et

al. entwickelt⁹⁴. Die PCR besteht aus einer Ausgangs-DNA (*template*), zwei spezifischen Oligonukleotidprimern, einer thermostabilen Polymerase und Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs) in einem Puffer und verläuft in drei Reaktionsschritten. Im Denaturierungsschritt (94°C) wird das *template* in seine beiden Einzelstränge aufgetrennt, an welche die Primer im Annealingschritt hybridisieren. Im Elongationsschritt wird durch die Polymerase aus dem gebundenen Primer das *template* (Temperaturoptimum der Polymerase) neu synthetisiert. Bei optimalen Bedingungen wird das *template* in jedem der 25-40 PCR-Zyklen verdoppelt.

Bei der qRT-PCR wird die cDNA während der Amplifikation mit einem Fluoreszenzfarbstoff versetzt. Dieser Farbstoff interkaliert in die DNA und die messbare Fluoreszenz der Probe nimmt proportional zur DNA-Menge zu. Den PCR-Zyklus, an dem die Fluoreszenz erstmalig die Hintergrund-Fluoreszenz übersteigt, wird als Schwellenwert-Zyklus (Ct-Wert) bezeichnet. Für die cDNA-Analyse wurde der *Power SYBR® Green Master Mix* (Life Technologies) verwendet. Das Gesamtvolumen des PCR-Ansatzes betrug 20 µl pro *well* in einer MicroAmp® Optical 96-*well* Platte. Die einzelnen Komponenten des qRT-PCR-Ansatzes und die verwendeten Oligonukleotidprimer sind tabellarisch zusammengefasst (Tab. 3.15 und Tab. 3.16).

Tab. 3.15: Einzelne Komponenten des qRT-PCR-Ansatzes

Reagenz	Volumen [µl]
<i>Power SYBR® Green Master Mix 2x</i>	10
Primer <i>fwd.</i> (0,75 µM)	1,5
<i>rev.</i> (0,75 µM)	1,5
cDNA (140 ng)	7
	20

Tab. 3.16: Oligonukleotidprimer für die qRT-PCR

fwd = forward; *rev* = reverse.

Bezeichnung	Sequenz (5'-3')
β-actin	<i>fwd: agagggaaatcgctgctgac</i> <i>rev: caatagtgatgacctggccgt</i>
IL-17	<i>fwd: cagcagcgatcatccctcaaag</i> <i>rev: tgagggtgaccttcacattctgga</i>

In Doppelbestimmungen wurde die PCR unter den in Tab. 3.17 aufgeführten Standardeinstellungen durchgeführt.

Tab. 3.17: Programm der qRT-PCR

Temperatur	Zeit	
50°C	2 min	
95°C	10 min	
95°C	15 s	40x
60°C	60 s	

Der Ct-Wert von zu analysierenden mRNAs wurde gegen das ubiquitär-exprimierte Enzym beta actin der gleichen Spezies normalisiert (Housekeeping-Gen (HKG)). Anhand der $\Delta\Delta$ -Ct-Methode wurde die mRNA-Expression relativ zur Kontrolle kalkuliert, hier die IL-17-Expression kranker Tiere relativ zu gesunden Tieren. Es ergeben sich folgende Formeln zur Berechnung der relativen Expression:

Tab. 3.18: Formeln zu Berechnung der relativen Expression

allgemeine Formel	eingesetzte Parameter
$\Delta Ct = Ct \text{ Zielgen} - Ct \text{ HKG}$	$\Delta Ct = Ct \text{ IL-17} - Ct \text{ beta actin}$
$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ Behandlung} - \Delta Ct \text{ Kontrolle}$	$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ EAE-Tier} - \Delta Ct \text{ naives Tier}$
Relative Expression/Ratio = $2^{-\Delta\Delta Ct}$	

3.5 Immunologische Methoden

3.5.1 Enzyme-linked Spot-Assay

Puffer, Lösungen und Medien für den ELISpot

PBS, PBS/BSA

Entwicklungslösung (1x Entwicklungspuffer, 1% NBT, 1% BCIP (AP Conjugate Substrate Kit), H₂O)

Medium: HL-1, 1% Glutamin, 1% Penicillin/Streptomycin

Der *Enzyme-linked Spot* (ELISpot)-Assay ist eine immunologische Methode zum Nachweis von Immunzellen. 1983 von Czerkinsky *et al.* entwickelt, misst der hoch sensitive Assay die Frequenz zytokinsezernierender Zellen⁹⁵. Das Verfahren des ELISpots ähnelt stark dem eines *enzyme-linked immunosorbent* (ELISA), gilt aber als bis zu 200-fach sensitiver. Die Zellen werden in An- oder Abwesenheit eines Stimulus auf einer mit einem Antikörper beschichteten Oberfläche kultiviert. Nach einer Inkubationszeit, in der die aktivierten Zellen zahlreiche Zytokine sezernieren, wird das für den Antikörper spezifische Zytokin gebunden und kann in den nächsten Schritten als Spots sichtbar gemacht werden. Jeder Spot repräsentiert dabei eine zytokinsezernierende Zelle.

Dieser Assay wurde wie folgend beschrieben immer in Doppelbestimmungen durchgeführt. Platten mit PVDV-Membranen wurden über Nacht bei 4°C mit einem immobilisierten, monoklonalen Primärantikörper beschichtet (Tab. 3.19).

Tab. 3.19: Für den ELISpot verwendete monoklonale Primärantikörper

Primärantikörper	Klon	Bezugsquelle	c [µg/ml] in PBS
Purified Rat Anti-Mouse IFN-γ	R4-6A2	BD	4
Purified Rat Anti-Mouse IL-2	JES6-1A12	BD	4
Purified Rat Anti-Mouse IL-4	11B11	BD	4
Purified Rat Anti-Mouse IL-5	TRFK5	BD	2
Purified Rat Anti-Mouse IL-6	MP5-20F3	BD	2
Purified Rat Anti-Mouse IL-17A	TC11-18H10	BD	2

Durch Zugabe von PBS/BSA für 1-2 Stunden wurden unspezifische Proteinbindungen blockiert. Vor der Kultivierung und der Aktivierung der Immunzellen durch Antigene wurden die Platten dreimal mit PBS gewaschen. Hierzu wurde in jedes *well* 200 µl PBS pipettiert und die Platten auf dem Kopf stehend vorsichtig abgeklopft.

Die Kultivierung der Immunzellen variierte versuchsabhängig zwischen 16 und 48 Stunden. In diesem Zeitraum setzten die aktivierten Zellen unzählige Zytokine frei, wobei der Antikörper spezifisch Zytokine bindet. Durch dreimaliges Waschen mit PBS wurden die Zellen sowie die für diesen Antikörper unspezifischen Zytokine entfernt. Ein biotinylierter Sekundärantikörper (Tab. 3.20), der ein zweites Epitop des Zytokins erkennt, wurde hinzugegeben und entweder für zwei Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C inkubiert.

Tab. 3.20: Für den ELISpot verwendete, biotinylierter Sekundärantikörper

Sekundärantikörper	Klon	Bezugsquelle	c [µg/ml] in PBS
Biotin Rat Anti-Mouse IFN-γ	XMG1.2	BD	2
Biotin Rat Anti-Mouse IL-2	JES6-5H4	BD	2
Biotin Rat Anti-Mouse IL-4	BVD6-24G2	BD	2
Biotin Rat Anti-Mouse IL-5	TRFK4	BD	2
Biotin Rat Anti-Mouse IL-6	MP5-32C11	BD	2
Biotin Rat Anti-Mouse IL-17A	TC11-8H4	BD	0,5

Nach drei Waschschritten erfolgte die Visualisierung der Zytokine als Spots durch eine enzymatische Farbreaktion. Hierzu erfolgte zunächst eine Inkubation mit Alkaline-Phosphatase (AP)-gekoppeltem Streptavidin (APC Streptavidin, BD) in PBS/BSA für zwei Stunden bei Raumtemperatur. Nach viermaligem Waschen mit PBS wurden die gebundenen

Zytokine mittels AP Conjugate Substrate Kit visualisiert (BioRad.). Eine schematische Darstellung des ELISpot-Assay erfolgt in Abbildung 3.6. Die ELISpot-Platten wurden mittels eines ELISpot-Readers von der Firma C.T.L. digitalisiert und nach Einstellung verschiedener Parameter wie Intensität oder Größe mit der Software Immunospot 5.0 pro ausgezählt und qualitativ kontrolliert. Je nach Dicke der Spots war ab einer Anzahl von ca. 400-600 Spots eine gewissenhafte Auszählung nicht mehr möglich. Alle Werte darüber hinaus wurden diesen Werten gleichgesetzt (gleich 400 bzw. gleich 600).

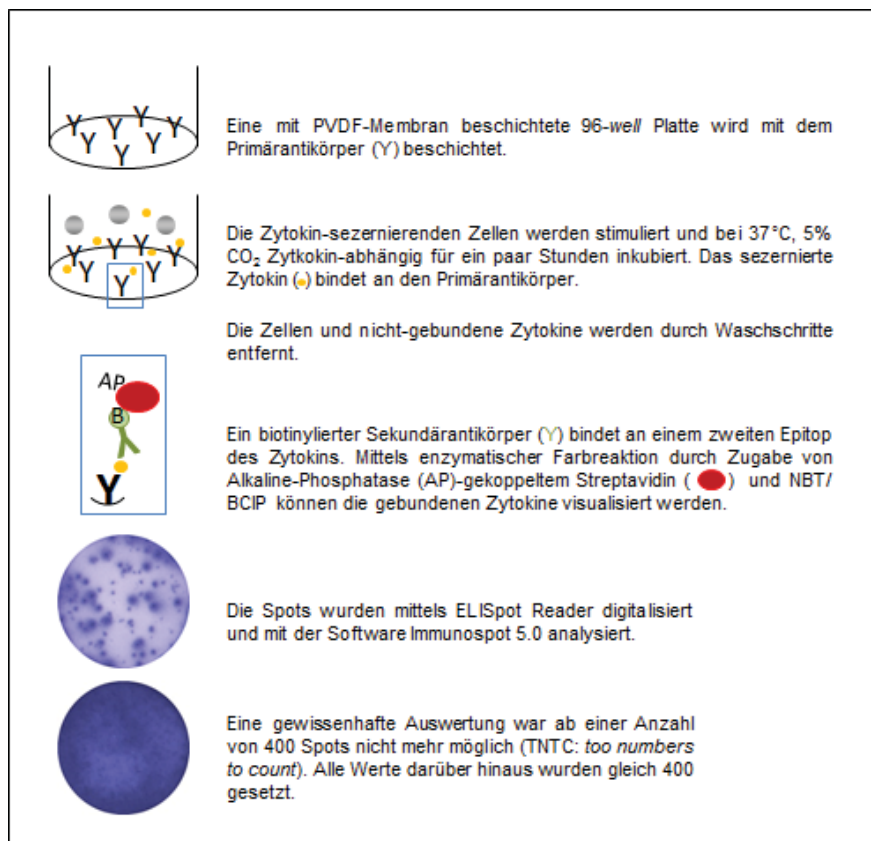


Abb. 3.6: Schematische Darstellung eines ELISpot-Assay

Für weitere Erläuterungen siehe Text.

3.5.2 Durchflusszytometrie/Fluorescence-activated cell sorting (FACS)

Prinzip nach Picot et al. und BD (Gerätebeschreibung)⁹⁶:

Grundlage des optischen Messverfahrens der Durchflusszytometrie zur Analyse von Zellpartikeln (0,2-50 µm) bildet ein fokussierter Laserstrahl, den Einzelsuspensionen passieren. In Abhängigkeit verschiedener Zelleigenschaften (Größe, Granularität, interne Komplexität) sowie der Probenvorbereitung (Antikörper-gekoppelte Fluorochrome) wird ein charakteristisches Streu- und Fluoreszenzlicht erzeugt und von Detektoren erfasst.

Die Probenzufuhr, die Messküvette, die Laser, die optischen Filter, die Detektoren und die elektrische Datenbank sind die wichtigsten Komponenten. Durch hydrodynamische Fokussierung wie in Abb. 3.6 dargestellt oder durch eine Mikrokapillare (Tab. 3.20) geschieht die Probenzufuhr geräteabhängig. Die Zellen werden einzeln durch die Laserstrahlen geführt (Abb. 3.6, 1), die Passiergeschwindigkeit ist dabei abhängig von dem Druck, der Probenmenge und dem Equipment des Gerätes (Tubes mit unterschiedlichen Volumina oder Platten). Ein von der Größe und Granularität abhängiges Streulicht sowie ein Fluoreszenzlicht (Abb. 3.6, 2) entsteht, sobald der Laserstrahl auf die Zellen trifft. Von einer Photodiode wird das je nach Zellgröße erzeugte Vorwärtstreulicht (FSC) aufgenommen. Zu den Detektoren, Photomultiplier Tubes, wird das im 90° Winkel gestreute gesammelte Seitwärts- und Fluoreszenzlicht geleitet. Die von den optischen Filtern aufgetrennten Zellsignale werden auf die Detektoren verteilt, die das Signal in ein elektrisches umwandeln bzw. dieses verstärken. Elektronisch digitalisiert und aufgenommen wird der Spannungsimpuls, der von einer entsprechenden Software ausgewertet werden kann (Abb. 3.7, 3-5).

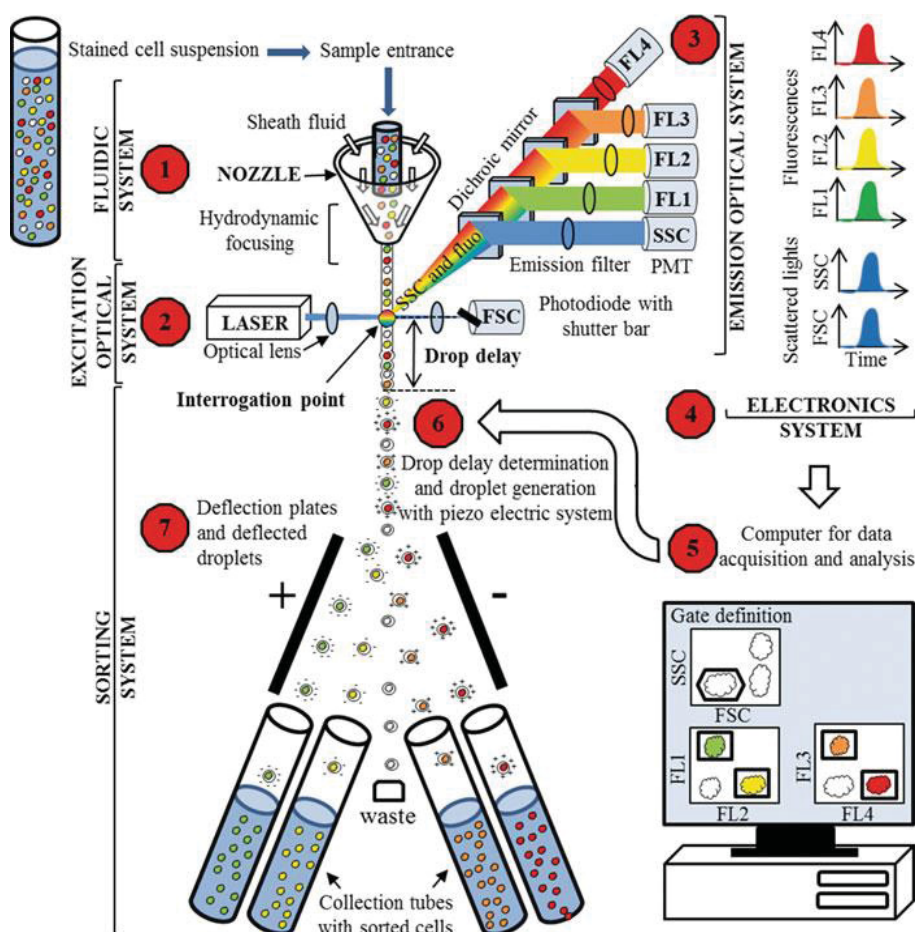


Abb. 3.7: Prinzip der Durchflusszytometrie (nach Picot *et al.*)⁹⁶
Erläuterungen siehe Text.

Um die Daten graphisch darzustellen, gibt es verschiedene Möglichkeiten wie Dot Plots (Punktwolken), Density Plots (Dichtedarstellungen), Contour Plots (Höhenliniendarstellungen) oder Histogramm Plots. In der folgenden Abbildung ist als Beispiel ein Dot Plot dargestellt (Abb. 3.8).

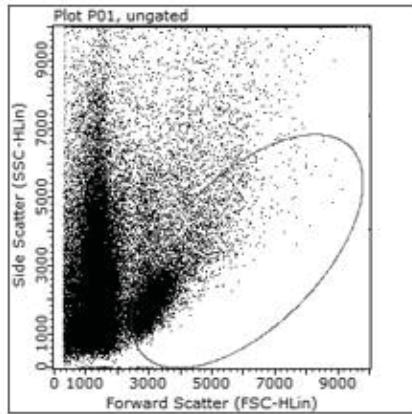


Abb. 3.8: Dot Plot

Die Splenozyten stammen aus einer C57BL/6-Maus. Die Splenozyten wurden aufgereinigt wie in der Versuchsdurchführung beschrieben und mit einem Guava easyCyte 8 und entsprechender Software ausgewertet. Die Zellen sind ungegated und die Lymphozyten umrandet. Jeder Punkt repräsentiert eine Zelle.

Versuchsdurchführung:

Puffer, Lösungen und Medien für die Durchflusszytometrie

PBS, FACS-Puffer

Medium: HL-1, 1% Glutamin, 1% Penicillin/Streptomycin

Jeweils $2,5 \times 10^6$ Zellen wurden in 500 µl HL-1-Medium mit und ohne stimulierendes Reagenz in einer 48-well Platte für 16 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Für die letzten vier Stunden wurden der Kultur 0,5 µl Brefeldin A (eBioscience) hinzugefügt. Brefeldin A inhibiert den intrazellulären Proteintransport zum Golgi-Komplex und führt zu einer Akkumulation des Proteins im endoplasmatischen Retikulum (ER). Hierdurch werden Zytokine nicht sezerniert und zytokinproduzierende Zellen können durch intrazelluläre Färbungen detektiert und durchflusszytometrisch analysiert werden.

Nach der Kultivierung wurden die Zellen in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und bei 2400 rpm für 4 min und 4°C zentrifugiert. Die Zellen wurden mit PBS (500 µl) gewaschen und erneut zentrifugiert. Mit 0,5 µl Fixable Viability Dye eFluor® 660 in 500 µl PBS wurden zunächst die toten Zellen gefärbt. Alle folgenden Schritte erfolgten unter Ausschluss von Licht, um ein Ausbleichen der Fluoreszenzfarbstoffe zu verhindern. Nach einer Inkubationszeit von 15-30 min bei 4°C wurden die Zellen mit 1x FACS-Puffer (500 µl) gewaschen und zentrifugiert. Die Zellen wurden in 250 µl IC Fixation Buffer (eBioscience) für 15 min bei 4°C fixiert, danach

zweimal mit 500 µl Permeabilization Buffer gewaschen (eBioscience) und jeweils bei 2400 rpm und für 4 min zentrifugiert. Im Anschluss wurden die Zellen intrazellulär und extrazellulär gefärbt. Hierfür wurden die Zellen mit Perm/Wash Buffer permeabilisiert, der zusätzlich eine Kombination aus den in Tabelle 3.20 aufgeführten Antikörpern (1:100) beinhaltete. Die Zellen wurden für 30 min inkubiert und erneut mit Perm/Wash Buffer gewaschen.

Für die FACS-Analyse wurden die Zellen in FACS-Puffer aufgenommen. Es erfolgte zu jeder Versuchsreihe stets die Anfertigung einer ungefärbten Probe sowie von Einzelfärbungen für die Farbkompensation und die Einstellung der jeweiligen Parameter.

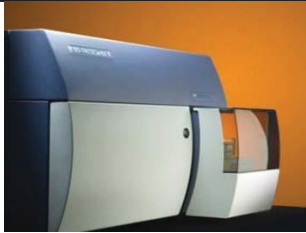
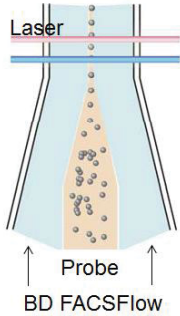
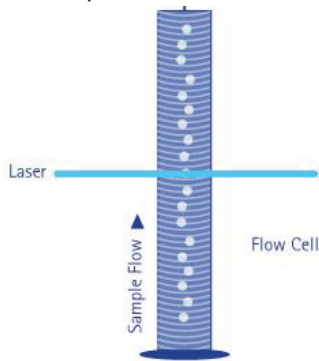
Tab. 3.21: Für das FACS verwendete Antikörper.

Antikörper	Fluorochrom	Bezugsquelle
CD3	FITC	BD
CD3	Brilliant Violet	Biolegend
CD4	FITC	BD
CD4	PE	Biolegend
CD4	PE-Cy7	BD
CD4	PerCP-Cy5.5	Biolegend
CD8a	APC-H7	BD
CD8a	PE	Biolegend
CD45	PE-Cy7	BD
IFN-γ	PE	BD
IFN-γ	PE-Cy7	eBioscience
IL-6	FITC	eBioscience
IL-17	PE	BD
IL-17	PerCP-Cy5.5	BD

Geräte:

Für die Analyse der FACS-Daten wurden für die Arbeit das Guava easyCyte 8 der Firma Merck und FACS Canto II der Firma BD mit entsprechender Software verwendet. In Tab. 3.22 ist eine Übersicht der beiden Geräte dargestellt.

Tab. 3.22: Gegenüberstellung der verwendeten FACS-Geräte (nach Herstellerangaben)

Gerät	FACSCanto II	Guava easyCyte 8
		
Firma	BD	Merck Millipore
Probenröhrchen [ml]	5	1.5
Fokussierung	hydrodynamisch durch laminaren Mantelstrom 	Mikrokapillare 
Laser	Diodenlaser	Diodenlaser
Wellenlängenbereiche [nm]	488 633 405	488 640
Farbenpanel	8	6
Farbstoffe: Wellenlänge 488 nm	FITC PE PE-Cy 7 PerCP, PerCP-Cy5.5	FITC PE PE-Cy 7 PerCP, PerCP-Cy5.5
Wellenlänge 633 nm	APC APC-Cy7	APC APC-Cy7
Wellenlänge 405 nm	Horizon, Pacific blue AmCyan	
Software	DIVA v6.1.3	Guava easyCyte version 2.2.2

3.6 Statistische Methoden

Sämtliche Graphen wurden mit der GraphPad Prism® Software 5.0 erstellt. Statistische Analysen wie der Student's t-Test, der Dunnett's posthoc Test oder One-Way-ANOVA erfolgten mittels GraphPad Prism® Software 5.0 oder Microsoft Excel. Die Signifikanz der Unterschiede zwischen zwei Experimentalgruppen wurde mit * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$) und *** ($p < 0,001$) gekennzeichnet.

3.7 Bildbearbeitungen

Die Qualität von Abbildungen und anderen Dateien wurden gegebenenfalls mit Adobe Photoshop CS6 (Adobe Systems) sinnnerhaltend aufgewertet.

4 Ergebnisse

4.1 Charakterisierung von IL-17-sezernierenden T-Zell-Populationen in der MOG₃₇₋₅₀- und MOG₃₅₋₅₅-induzierten EAE und der Einfluss von PAMPs⁸²

Ziel des folgenden Abschnitts war, die Funktion der IL-17-sezernierenden CD8⁺-T-Zellen (Tc17) in einem Tiermodell der MS, der EAE, zu untersuchen. Dazu wurde in C57BL/6-Mäusen mit MOG₃₇₋₅₀ eine chronische Verlaufsform der EAE induziert und die IL-17-produzierende T-Zell-Population in der Peripherie (in Form von Splenozyten) und im Zentralnervensystem (in Form von Rückenmarkszellen) im fortschreitenden Krankheitsverlauf charakterisiert. Das Zytokinprofil der MOG₃₇₋₅₀-induzierten EAE wurde mit dem der MOG₃₅₋₅₅-induzierten EAE verglichen. Ein weiteres Ziel war es, den Einfluss verschiedener PAMPs (*pathogen-associated molecular patterns*) auf antigengeprimte und ungeprimte, naive T-Zellen zu untersuchen.

4.1.1 Etablierung des MOG₃₇₋₅₀-induzierten EAE-Modells

Für valide Daten musste zunächst das MOG₃₇₋₅₀-Modell etabliert werden. Hierzu wurde bei der Emulsion das Autoantigen des bereits etablierten MOG₃₅₋₅₅-Modells ersetzt. Den C57BL/6-Mäusen wurde eine Emulsion injiziert, die sich pro Tier aus 200 µg MOG₃₇₋₅₀ und 2 mg/ml CFA zusammensetzte. Eine zusätzliche intraperitoneale Applikation von 200 ng PTX erfolgte an Tag 0 und 2. Der Allgemeinzustand der Versuchstiere wurde täglich untersucht und bewertet. Um den fortschreitenden Verlauf der EAE bzw. den Schweregrad der Lähmungserscheinungen zu quantifizieren, wurde den Mäusen ein in Tabelle 3.13 aufgeführter klinischer Score zugeordnet. Der klinische Verlauf der MOG-induzierten EAE-Modelle ist in Abb. 4.1 dargestellt. In beiden Modellen entspricht der klinische Krankheitsverlauf dem einer charakteristischen, chronisch progressiven MOG-induzierten EAE⁹⁷. An Tag 9 (MOG₃₇₋₅₀) bzw. Tag 10 (MOG₃₅₋₅₅) konnten bei vereinzelt Tieren die ersten Symptome beobachtet werden. Der durchschnittliche Score lag zu diesem Zeitpunkt bei der MOG₃₇₋₅₀-induzierten EAE bei 0,09, bei der MOG₃₅₋₅₅-induzierten EAE bei 0,18. Danach traten bei den Tieren vermehrt Symptome bzw. eine Verschlimmerung der Primärsymptome auf. Der mittlere Scorewert stieg bis zum Peak an Tag 14 bei der MOG₃₇₋₅₀-induzierten (2,04) bzw. an Tag 15 bei der MOG₃₅₋₅₅-induzierten EAE (2,25). Ab diesem Zeitpunkt verbesserten sich die Symptome der Mäuse und der Score sank bei MOG₃₇₋₅₀ an Tag 32 auf einen mittleren Wert von 1,1 und bei MOG₃₅₋₅₅ an Tag 26 auf 1,75.

Der mittlere Score der MOG₃₇₋₅₀-induzierten EAE blieb bis Tag 37 zwischen 1,08 und 1,38 und stieg an Tag 41 auf 1,8. An Tag 42 sank der Score auf 1,4, lag aber an Tag 43 bei 1,9. An Tag 44 wurde zunächst mit 0,92 der Tiefpunkt des mittleren Scores erreicht, der bis an Tag 49 wieder auf 2,2 anstieg. In diesem Zeitraum verschlimmerten sich die Symptome der Tiere und vereinzelt traten erste Symptome bei bisher gesunden Mäusen auf. Danach variierte der mittlere Score bei der MOG₃₇₋₅₀-induzierten EAE zwischen 2,2 und 1,83, bis er am Ende des Experiments auf 1,45 sank.

Der Score der MOG₃₅₋₅₅-induzierten EAE erreichte an Tag 28 einen Tiefpunkt von 1 und stieg an Tag 30 wieder auf 1,75. Danach pendelte er zwischen 1 und 2. An Tag 38 betrug der Wert durchschnittlich 1,5 und blieb im Verlauf bis auf eine isolierte Erhöhung an Tag 48 auf 2 bis zu Tag 53 konstant. Am Ende des Experiments, an Tag 56, betrug der mittlere Score 1.

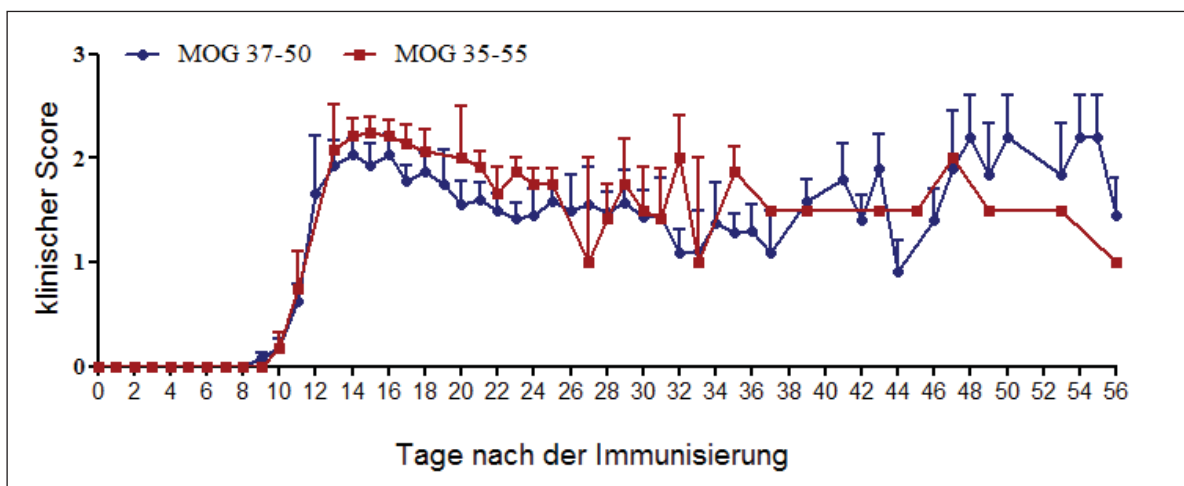


Abb. 4.1: Klinischer EAE-Score

Der klinische Krankheitsverlauf weiblicher C57BL/6-Wildtyp-Mäuse nach MOG₃₇₋₅₀- und MOG₃₅₋₅₅-induzierter EAE. Der Schweregrad der auftretenden Lähmungserscheinungen im EAE-Verlauf wurde täglich ermittelt und jedem Tier ein Score zugeordnet: keine Symptome = 0; partielle Schwanzparese = 0,5; vollständige Schwanzparese = 1; Herabsetzen des Hinterleibs = 1,5; Ataxie, watschelnder Gang = 2; unilaterale Hinterlaufparese = 2,5; bilaterale Hinterlaufparese = 3; bilaterale Hinterlaufparese und Vorderlaufschwäche = 3,5; Tetraparese (Abbruchkriterium) = 4; moribund = 5; Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte $\pm$ SEM (n = 25-40 in 4 unabhängigen Experimenten).

Zusammenfassend wurde mit beiden MOG-Peptiden ein ähnlicher, chronisch progressiver Krankheitsverlauf mit ersten Symptomen an Tag 9, Peak um Tag 14 und einem zweiten Peak um Tag 48 nach Injektion induziert.

4.1.2 Das IL-17-Zytokinprofil im Verlauf der MOG₃₇₋₅₀- und MOG₃₅₋₅₅-induzierten EAE

Um eine Übersicht der IL-17-Sekretion innerhalb der fortschreitenden MOG₃₇₋₅₀- sowie MOG₃₅₋₅₅-induzierten EAE zu erhalten, wurde diese in der Peripherie und im Zentralnervensystem an verschiedenen Zeitpunkten mittels ELISpot analysiert. Zu der IL-17-Sekretion wurde zusätzlich die Produktion der proinflammatorischen Zytokine IFN- γ und IL-6 sowie dem antiinflammatorischen Zytokin IL-5 gemessen. Als Zeitpunkt wurden ein Tag kurz vor dem Ausbrechen der ersten klinischen Symptome (Tag 8), der Peak in der Anfangsphase (Tag 14), ein Tag im späteren Verlauf der EAE (Tag 35) und das Ende des Experiments, Tag 56, gewählt. Zusätzlich wurden als Kontrolle die Organe von naiven (gesunden) Tieren verwendet (Tag 0).

4.1.2.1 T-Zell-Populationen in der Peripherie (Anzahl MOG₃₇₋₅₀/MOG₃₅₋₅₅Spots)

Einzelzellsuspensionen aus der Milz (je $2,5 \times 10^5$ Zellen) wurden mit dem Antigen oder mit α CD3 (aktiviert den T-Zell-Rezeptor-Komplex) für 36 Std. stimuliert oder für diesen Zeitraum ohne Stimulation in Medium kultiviert (Abb. 4.2).

Ohne Stimulation konnte bei beiden EAE-Modellen ausschließlich eine Sekretion von IL-6 und IL-17 detektiert werden. In der MOG₃₇₋₅₀-induzierten EAE stieg die IL-6-Sekretion an Tag 8 (36,62 Spots), sank an Tag 14 (8,04 Spots; signifikant), stieg erneut an Tag 35 (51,62 Spots; signifikant) und weiter an Tag 56 (136,64 Spots). Auch in der MOG₃₅₋₅₅-induzierten EAE konnte die höchste IL-6-Sekretion an Tag 56 (80,80 Spots) gemessen werden, danach absteigend an Tag 35 (38,88 Spots), 14 (18,50 Spots) und nahezu keine an Tag 8 und 0 bzw. bei naiven Tieren (jeweils unter 10 Spots). Es konnte nahezu keine Sekretion von IL-5 und IFN- γ erfasst werden (Spots < 3).

Nach Restimulation mit dem jeweiligen MOG-Peptid wurde neben der IL-6- und IL-17-Sekretion auch eine IFN- γ -Sekretion detektiert. Bei beiden Modellen stieg die MOG-spezifische IFN- γ -Sekretion signifikant an Tag 8 (MOG₃₇₋₅₀: 89,12 Spots/MOG₃₅₋₅₅: 171,50 Spots) und sank signifikant an Tag 14 (MOG₃₇₋₅₀: 28 Spots/MOG₃₅₋₅₅: 34,68 Spots). An Tag 35 konnte innerhalb der MOG₃₇₋₅₀-induzierten EAE erneut eine signifikante Erhöhung der IFN- γ -Sekretion detektiert werden (MOG₃₇₋₅₀: 73,04 Spots), die an Tag 56 wieder signifikant reduziert war und den Tiefstand erreichte (MOG₃₇₋₅₀: 17,71 Spots). Im Gegensatz dazu sank die IFN- γ -Sekretion innerhalb der MOG₃₅₋₅₅-induzierten EAE von Tag 14 auf Tag 35 weiter (MOG₃₅₋₅₅: 14,19 Spots) und erhöhte sich wieder leicht an Tag 56 (MOG₃₅₋₅₅: 20,60 Spots), aber statistisch nicht signifikant. Die IL-6-Sekretion blieb innerhalb beider Modelle und innerhalb des Krankheitsverlaufs im Vergleich zu den anderen Zytokinen - bis auf eine Reduktion 14 Tage nach der Immunisierung - weitgehend konstant. Die MOG₃₇₋₅₀- /

MOG₃₅₋₅₅-spezifische IL-6-Sekretion stieg signifikant an Tag 8 (125,58/134,56 Spots), sank signifikant an Tag 14 (40,04/69,27 Spots), stieg erneut (signifikant bei MOG₃₇₋₅₀) an Tag 35 (125,46/96,75 Spots) und weiter an Tag 56 (174,83/155,30 Spots). Auch ein nahezu identisches Muster für IL-17 im Verlauf beider EAE-Modelle wurde erfasst. Die höchste IL-17-Sekretion wurde bei beiden Modellen an Tag 8 (183,89/225,81 Spots) detektiert. Von Tag 8 auf Tag 14 wurde die IL-17-Sekretion stark reduziert (68,77/67,10 Spots) und auf Tag 35 wieder erhöht (80,14/119,13 Spots). 56 Tage nach der Immunisierung wurde innerhalb beider EAE-Modelle die niedrigste Frequenz von IL-17 detektiert (25,14/36,70 Spots).

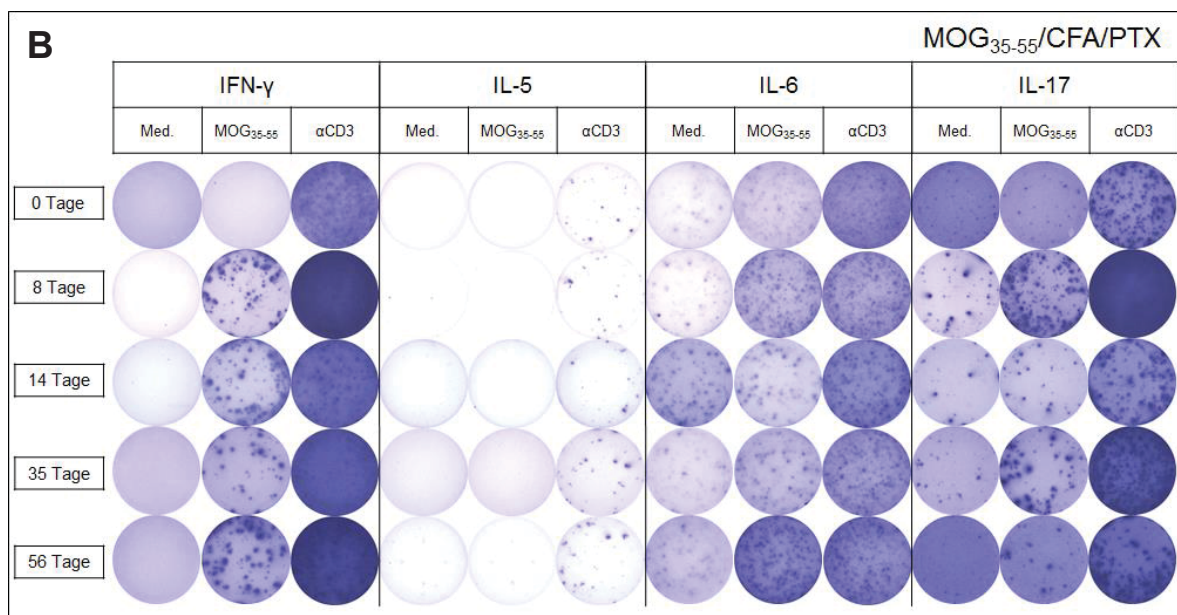
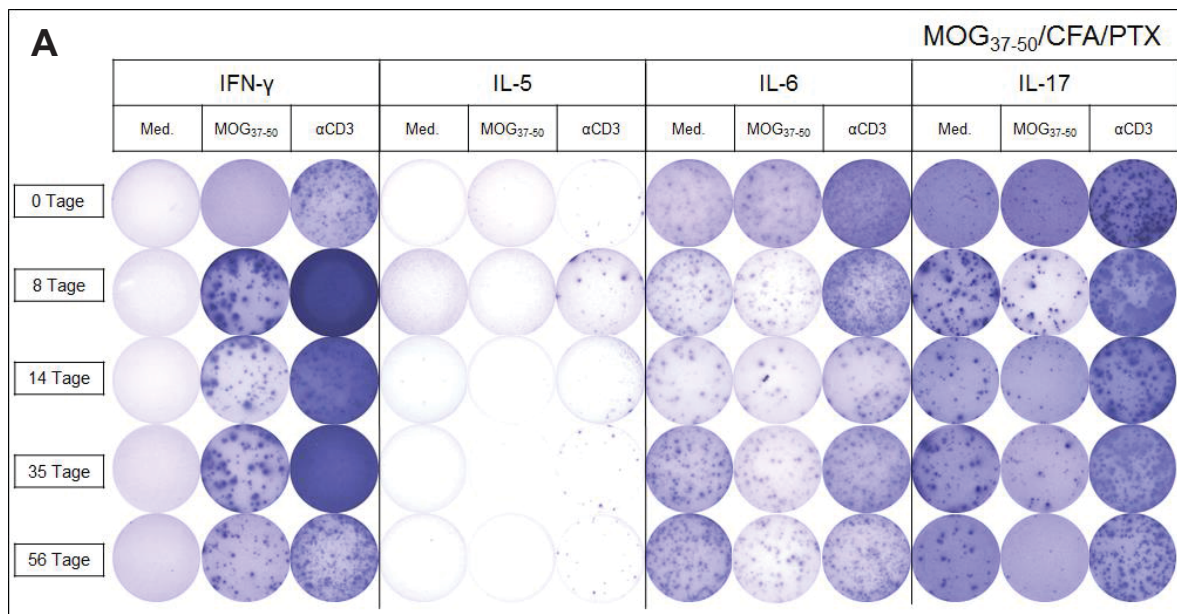
Auch nach Restimulation mit MOG ist liegt die Anzahl IL-5-sezernierender Zellen beider EAE-Modelle bei nahezu 0.

Die Stimulation mit α CD3 führte zu einer erhöhten Sekretion von IFN- γ , IL-6 und IL-17 sowie zu einer geringen Sekretion von IL-5 bei beiden EAE-Modellen. Die Sekretion von IFN- γ ist innerhalb beider Modelle an Tag 8 am höchsten (bei MOG₃₅₋₅₅ signifikant), die Menge an Spots war so hoch, dass die genaue Anzahl nicht mehr ermittelt werden konnte (TNTC: *too numbers to count*) und gleich 400 gesetzt wurde. 400 beträgt demnach die höchste Anzahl an Spots, die in diesem Experiment eine gewissenhafte Auswertung ermöglicht. Nach Tag 8 war die IFN- γ -Sekretion bei beiden Modellen an Tag 14 leicht reduziert (204,35/282,73 Spots), stieg erneut an Tag 35 (348,50/296,69 Spots) und erreichte die niedrigste Frequenz am Ende des Experiments an Tag 56 (110/140,30 Spots - innerhalb der MOG₃₇₋₅₀-induzierten EAE jeweils signifikant). Selbst bei den naiven Tieren wurde mit α CD3 die IFN- γ -Sekretion so stark angeregt, dass die Spots fast nicht mehr zählbar waren. Im Gegensatz dazu war die IL-5-Sekretion sehr gering und die Anzahl der Spots blieb bis auf 35 Tage (24 Spots) nach der Immunisierung mit MOG₃₇₋₅₀ unter 20.

Die Sekretion von IL-6 zeigt im fortschreitenden Krankheitsverlauf innerhalb beider Modelle bis auf eine höhere Produktion an Tag 56 einen identischen Trend. Nach einem Höchstwert an Tag 8 (303,39/188,19 Spots) sank die Anzahl IL-6-sezernierender Zellen signifikant an Tag 14 (73,60/105,68 Spots), stieg erneut an Tag 35 (nur signifikant bei MOG₃₇₋₅₀) (243,77/144,56 Spots) und an Tag 56 (248,36/165,80 Spots). Auch die IL-17-Sekretion war bei den naiven Tieren mit der α CD3-Stimulation stark erhöht und der gleiche Trend ersichtlich: Höchstwert an Tag 8 (343,31/TNTC bzw. 400 Spots), signifikante Reduktion an Tag 14 (151,85/212,96 Spots), erneuter Anstieg an Tag 35 (signifikant bei MOG₃₇₋₅₀) (252,81/284,80 Spots), jedoch eine Reduktion an Tag 56 (223,60/193,33 Spots).

Insgesamt wurde die höchste Sekretion aller Zytokine nach Stimulation mit α CD3 detektiert, danach mit Antigen-Restimulation. Ohne Stimulation wurde die geringste Frequenz gemessen. Die Anzahl der Spots bzw. der sezernierenden Zellen innerhalb der MOG₃₇₋₅₀- und der MOG₃₅₋₅₅-induzierten EAE war bis auf wenige Ausnahmen bei allen Zytokinen unter

gleichen Versuchsbedingungen nahezu identisch. Besonders quantitativ unterschieden sich die IL-17-sezernierenden Zellen kultiviert in Medium an Tag 35 und die IFN- γ -sezernierenden Zellen nach Restimulation an Tag 35.



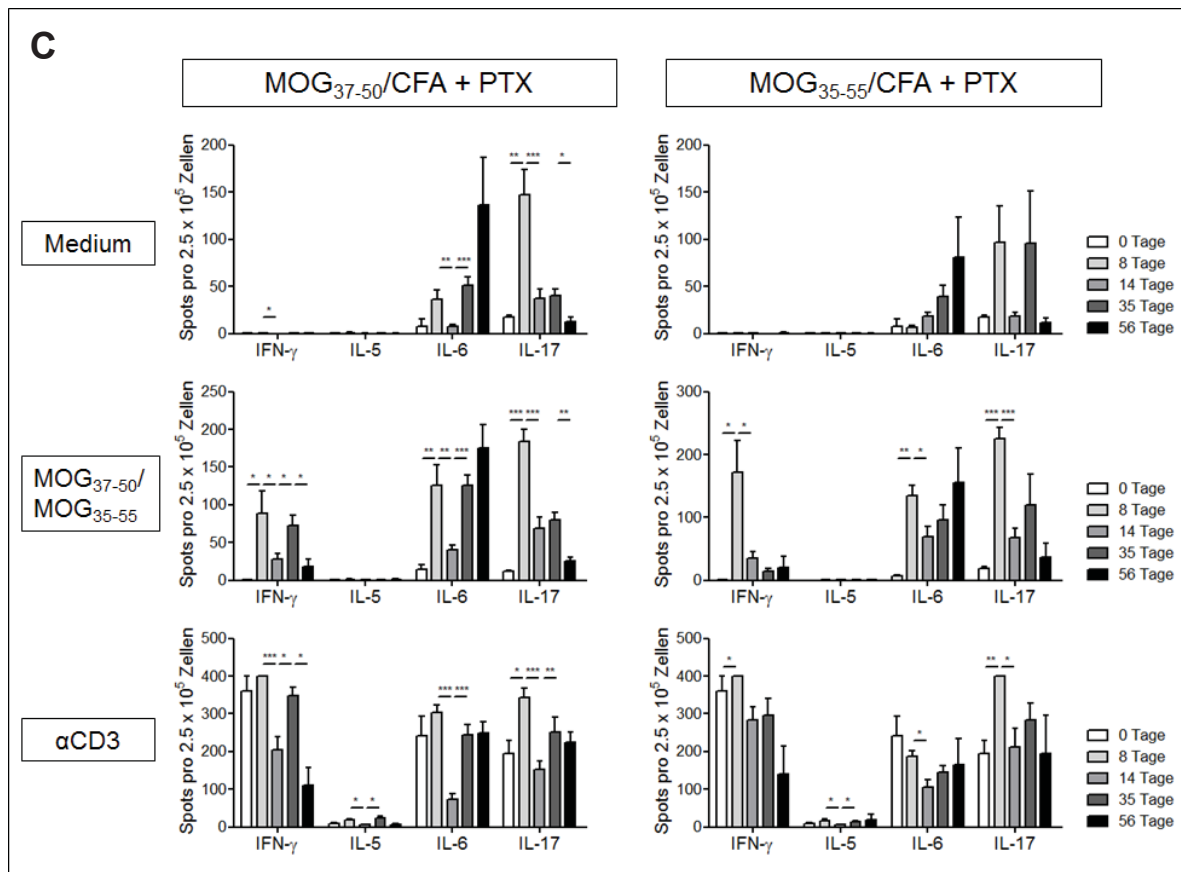


Abb. 4.2: Zytokinprofil innerhalb der MOG₃₇₋₅₀/CFA/PTX- und MOG₃₅₋₅₅/CFA/PTX-induzierten EAE, sezerniert von Splenozyten und gemessen mittels ELISpot-Assay

Die Splenozyten wurden an Tag 8, 14, 35 und 56 innerhalb der induzierten EAE sowie von naiven (Tag 0) C57BL/6-Mäusen entnommen. Für den ELISpot-Assay wurden jeweils $2,5 \times 10^5$ Zellen für 36 h mit MOG₃₇₋₅₀/MOG₃₅₋₅₅ oder α CD3 stimuliert bzw. nur in Medium kultiviert und die Zytokinsekretion mittels ELISpot-Assay analysiert. **A/B** Jeweils ein repräsentatives Beispiel für jede Kulturbedingung nach Immunisierung mit MOG₃₇₋₅₀/CFA/PTX (A) und MOG₃₅₋₅₅/CFA/PTX (B). **C** Für die Auswertung des ELISpot-Assay sind jeweils die Mittelwerte $\pm$ SEM dargestellt ($n = 3-4$ in jedem der 4 unabhängigen Experimente; statistische Auswertung: GraphPad Prism® Software 5.0, Student's t-Test: * = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$; *** = $p < 0.001$).

Um die ELISpot-Daten zu bestätigen und die IL-17- und IFN- γ -sezernierenden Splenozyten näher zu charakterisieren, wurden zusätzlich zu den ELISpot-Assays auch FACS-Analysen durchgeführt. Hierzu wurden jeweils $2,5 \times 10^6$ Splenozyten für 16 h mit MOG₃₇₋₅₀ / MOG₃₅₋₅₅ stimuliert und die Zytokinsekretion mittels eines FACS Guava EasyCyte™ 8 (Millipore) und der GuavaSoft™ Software Version 2.2.2 oder eines BD FACS Canto II und der BD FACS Diva Software analysiert. In Abbildung 4.3 ist jeweils ein repräsentatives Beispiel der FACS-Analyse 8, 14, 35 und 56 Tage nach der Immunisierung dargestellt. Die Populationen sind gated auf Lymphozyten > lebende Zellen > CD3⁺-Zellen. Der Wert entspricht dem jeweiligen prozentualen Anteil positiver Zellen.

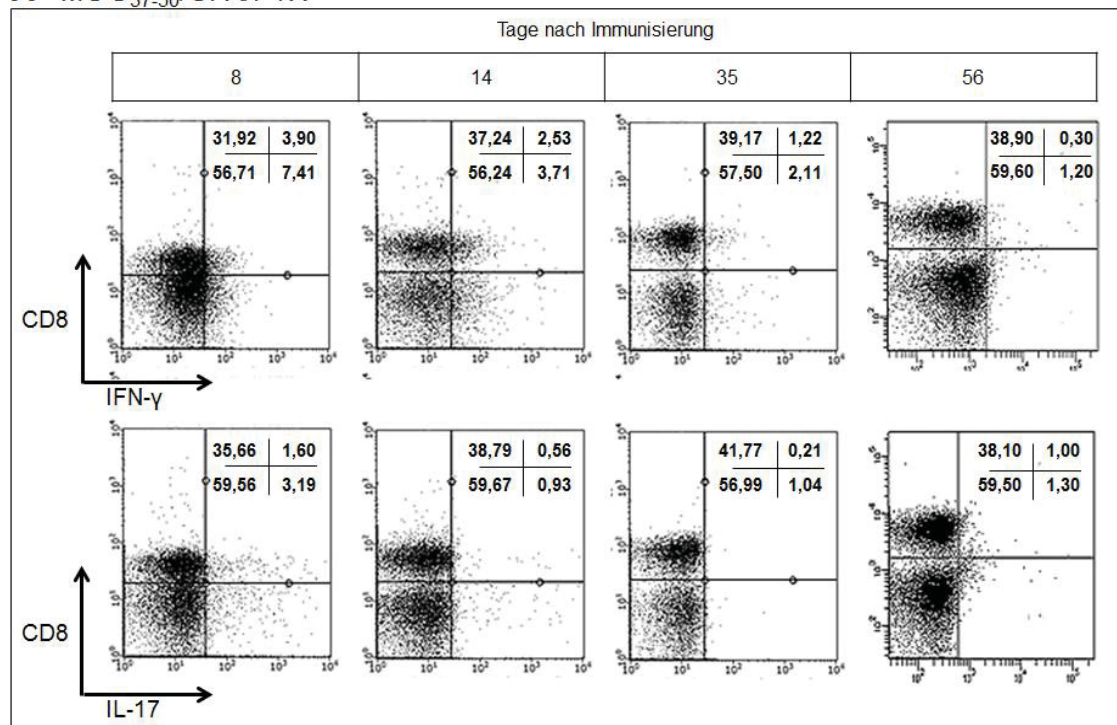
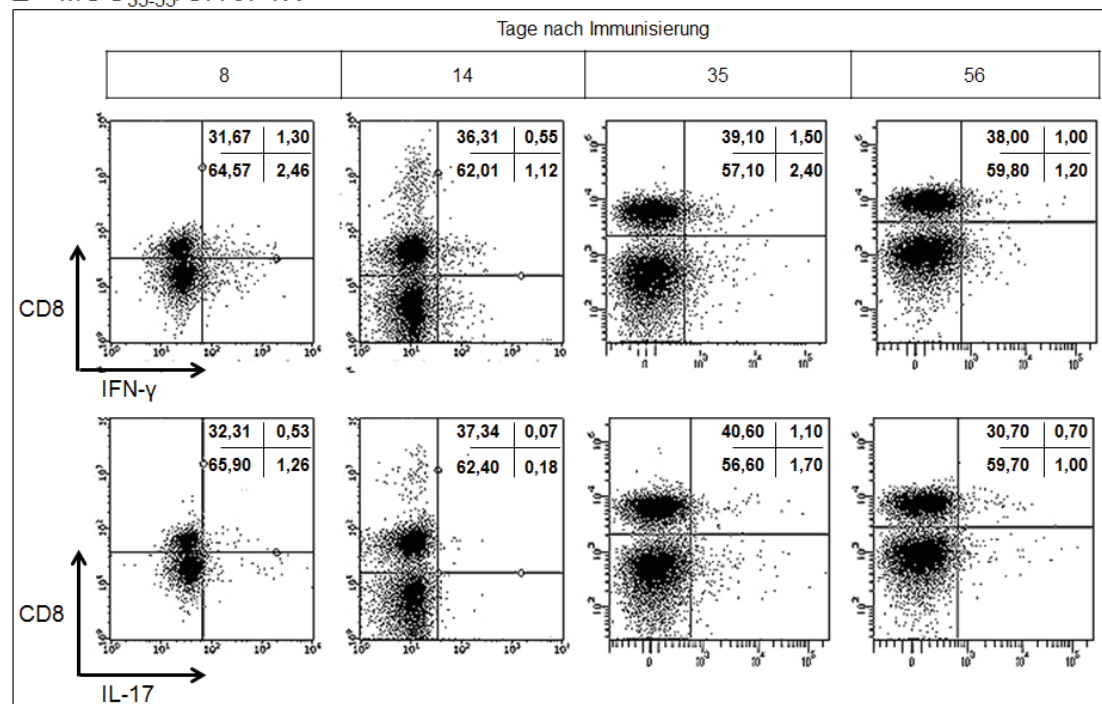
A MOG₃₇₋₅₀/CFA/PTX**B** MOG₃₅₋₅₅/CFA/PTX

Abb. 4.3: Intrazelluläre FACS-Analyse der MOG₃₇₋₅₀- (A) und MOG₃₅₋₅₅-spezifischen (B) IFN- γ - und IL-17-Antwort innerhalb des fortschreitenden EAE-Verlaufs

8, 14, 35 und 56 Tage nach der Immunisierung wurden die Splenozyten von C57BL/6-Mäusen entnommen und jeweils $2,5 \times 10^6$ Zellen für 16 h mit MOG₃₇₋₅₀ (A) oder mit MOG₃₅₋₅₅ (B) stimuliert. Die MOG-spezifische Zytokinsekretion wurde mit einem FACS Guava EasyCyte™ 8 oder mit einem BD FACS Canto II mit entsprechender Software analysiert. Die Daten veranschaulichen jeweils ein repräsentatives Beispiel von 3-4 unabhängigen Experimenten und sind in Prozent angegeben. Die Populationen sind wie folgt gated: Lymphozyten > lebende Zellen > CD3⁺-Zellen.

An jedem Zeitpunkt der Versuchsdurchführung nach MOG₃₇₋₅₀- und MOG₃₅₋₅₅-induzierter EAE lag die CD4⁺-Zellpopulation um ca. 20 % höher als die CD8⁺-Zellpopulation.

Innerhalb der MOG₃₇₋₅₀-induzierten EAE sank die IFN- γ -Sekretion MOG-spezifischer Zellen mit fortschreitendem Krankheitsverlauf von Tag 8 auf Tag 56, sowohl bei den CD3⁺-Zellen (T-Zellen) insgesamt als auch bei den CD4⁺- und CD8⁺-Zellpopulationen (Abb. 4.3 A). Der prozentuale Anteil der IFN- γ -sezernierenden Zellen der CD4⁺-Population entsprach dem doppelten Anteil der CD8⁺-Population. Die höchste IL-17-Sekretion der MOG₃₇₋₅₀-spezifischen Zellen konnte auch 8 Tage nach der Immunisierung erfasst werden. Die IL-17-Sekretion der CD3⁺-Zellen insgesamt sowie die Sekretion der CD4⁺- und CD8⁺-Zellen fiel von Tag 8 auf Tag 14 und erneut auf Tag 35. Im Gegensatz zur IFN- γ -Sekretion stieg die IL-17-Sekretion MOG₃₇₋₅₀-spezifischer Zellen am Ende des Experiments bei allen Zellpopulationen wieder an. Die niedrigste Produktion IL-17 sezernierender Zellen wurde an Tag 14 gemessen. Innerhalb der EAE wurde zu jedem Zeitpunkt mehr als doppelt so viel IFN- γ wie IL-17 sezerniert. Die FACS-Daten entsprechen weitestgehend den ELISpot-Daten bis auf die Reduktion der IFN- γ -Sekretion von Tag 14 auf Tag 35 innerhalb der FACS-Analyse (in dem ELISpot-Assay war hier eine Erhöhung detektiert worden).

Alle MOG₃₅₋₅₅-spezifischen Zellen sezernierten den höchsten prozentualen Anteil IFN- γ an Tag 8 sowie an Tag 35 nach EAE-Induktion (Abb. 4.3 B). Von Tag 8 auf Tag 14 war die IFN- γ -Sekretion aller Zellpopulationen auf ihrem Tiefstand. Nach dem erneuten Anstieg der IFN- γ -Produktion von Tag 14 auf Tag 35 sank diese wieder 56 Tage nach der Immunisierung. Die IL-17-Sekretion MOG₃₅₋₅₅-spezifischer Zellen verringerte sich innerhalb aller Zellpopulationen von Tag 8 auf Tag 14 (Tiefpunkt), erhöhte sich im Anschluss wieder an Tag 35 (Peak) und sank danach an Tag 56. Auch innerhalb der MOG₃₅₋₅₅-induzierten EAE sezernierten doppelt so viele CD4⁺-T-Zellen IFN- γ und IL-17 wie CD8⁺-T-Zellen und es wurde zu jedem Zeitpunkt doppelt so viel IFN- γ sezerniert wie IL-17. Im Gegensatz zu den ELISpot-Daten stieg die IFN- γ -Produktion von Tag 14 auf Tag 35 und sank dann auf Tag 56. Während die höchste IFN- γ -Sekretion 8 Tage nach Immunisierung detektiert wurde, unterschied sich der Tiefpunkt voneinander. Bei der IL-17-Sekretion wurden zwar an verschiedenen Tagen der Tiefpunkt und Peak detektiert, das Sekretionsmuster im Verlauf der EAE der FACS-Analyse entsprach aber dem des ELISpot-Assay.

4.1.2.2 Die IL-17-Sekretion im Zentralnervensystem - Rückenmark (Mittelwert Anzahl Spots)

Die Einzelzellsuspensionen bestanden in jeder Versuchsreihe aus zusammengeführten Rückenmarksproben dreier Mäuse, die auf die entsprechenden Kulturbedingungen bzw. *wells* aufgeteilt wurden. Die Zellen aus dem Rückenmark wurden unter den gleichen Versuchsbedingungen behandelt wie die Splenozyten: 36-stündige Kultivierung mit MOG₃₇₋₅₀, mit α CD3 oder ohne Stimulation, nur in Medium (Abb. 4.4).

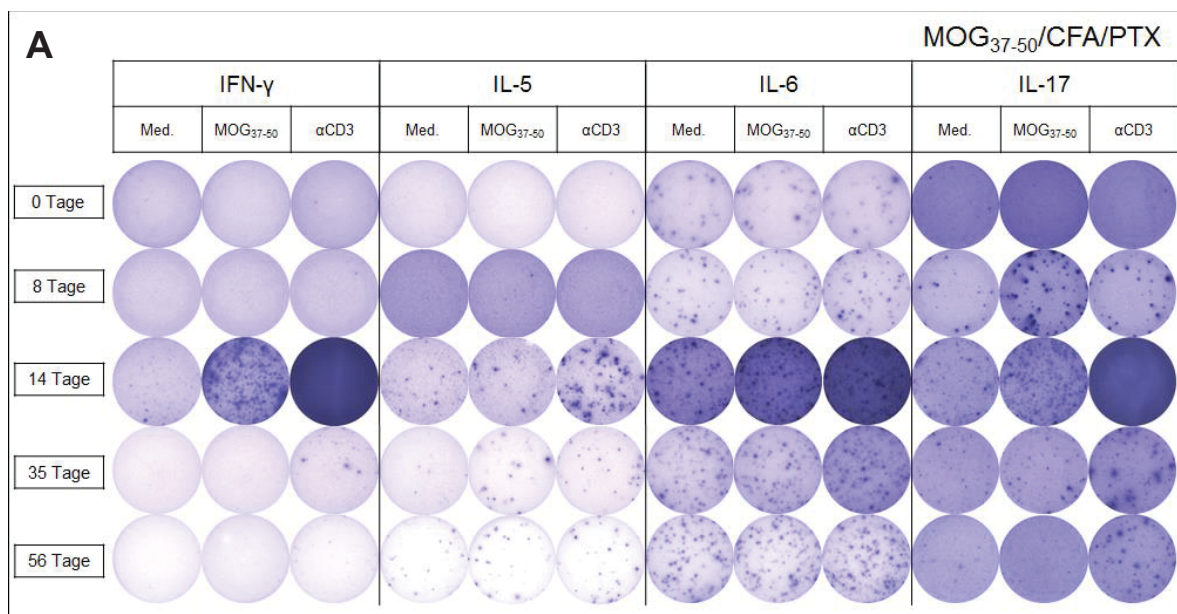
Ohne Stimulation sezernierten die ZNS-infiltrierenden Zellen nahezu kein IFN- γ und IL-5, nur eine sehr geringe Anzahl IFN- γ konnte an Tag 14, IL-5 zusätzlich an Tag 35 und 56 (Spots < 20) detektiert werden. Eine höhere Sekretion wurde von IL-6 und IL-17 erfasst. Die höchste IL-6-Sekretion konnte an Tag 56 (132,5 Spots) detektiert werden, danach absteigend an Tag 14 (77,5 Spots), 35 (41 Spots) und an Tag 8 (23,38 Spots). Bei den naiven Tieren wurde nur eine geringe Anzahl IFN- γ -sezernierender Zellen erfasst (Spots < 20).

Die IL-17-Sekretion war an Tag 14 (111,33 Spots) am höchsten, dann folgend an Tag 8 (54,88 Spots), Tag 35 (24 Spots) und mit nur noch sehr geringer Sekretion an Tag 56 (14 Spots). An Tag 0 bzw. bei den naiven Tieren wurde nur eine sehr geringe Frequenz IL-17 detektiert.

Die Anzahl sezernierender Zellen unterschieden sich ohne Stimulation innerhalb des fortschreitenden Krankheitsverlaufs nicht signifikant. Die Restimulation mit MOG₃₇₋₅₀ führte zu einer hohen Sekretion von IFN- γ an Tag 14 (signifikant, 268 Spots). Zu keinem anderen Zeitpunkt wurde IFN- γ von den Zellen aus dem Rückenmark sezerniert. Nur eine geringe Frequenz IL-5 wurde zu allen Zeitpunkten detektiert (Spots < 20). Die IL-6-Sekretion erreichte einen Peak an Tag 56 (143,17 Spots), dann absteigend an Tag 14 (92,83 Spots), 35 (54,90 Spots) und an Tag 8 (35,63 Spots) - jeweils nicht signifikant. Die meisten IL-17-sezernierenden MOG₃₇₋₅₀-spezifischen Zellen wurden an Tag 14 (204,50 Spots) detektiert, dann in absteigender Reihenfolge an Tag 8 (65,13 Spots), Tag 35 (39,50 Spots) und nur eine geringe Frequenz an Tag 56 (14,83 Spots) - auch jeweils nicht signifikant. Das Zytokinmuster nach der Stimulation mit α CD3 entsprach dem nach Restimulation mit MOG₃₇₋₅₀ mit einer größeren Ausbeute.

Bei allen Zytokinen wurde die höchste Sekretion 14 Tage nach Immunisierung der Tiere gemessen. Nur an Tag 14 wurde eine Sekretion von IFN- γ detektiert (signifikant, TNTC, 400 Spots). Auch nahezu keine IL-5-Sekretion konnte, bis auf an Tag 14 (nicht signifikant, 34,67 Spots), erfasst werden (Spots < 20). Die höchste Frequenz von IL-6 wurde nach Tag 14 (220,33 Spots) absteigend an Tag 56 (160,67 Spots), 35 (81,90 Spots) und 8 (37,13 Spots) gemessen (nicht signifikant). Bei den naiven Tieren konnte zudem im Gegensatz zu

den anderen Zytokinen auch eine geringe Sekretion IL-6 erfasst werden (14,5 Spots). Die höchste Anzahl IL-17-produzierender Zellen des ZNS wurden nach Tag 14 (signifikant, 346,17 Spots), in absteigender Reihenfolge an Tag 35 (84,63 Spots), 8 (62,25 Spots) und am Ende des Experiments an Tag 56 (37,17 Spots) detektiert.



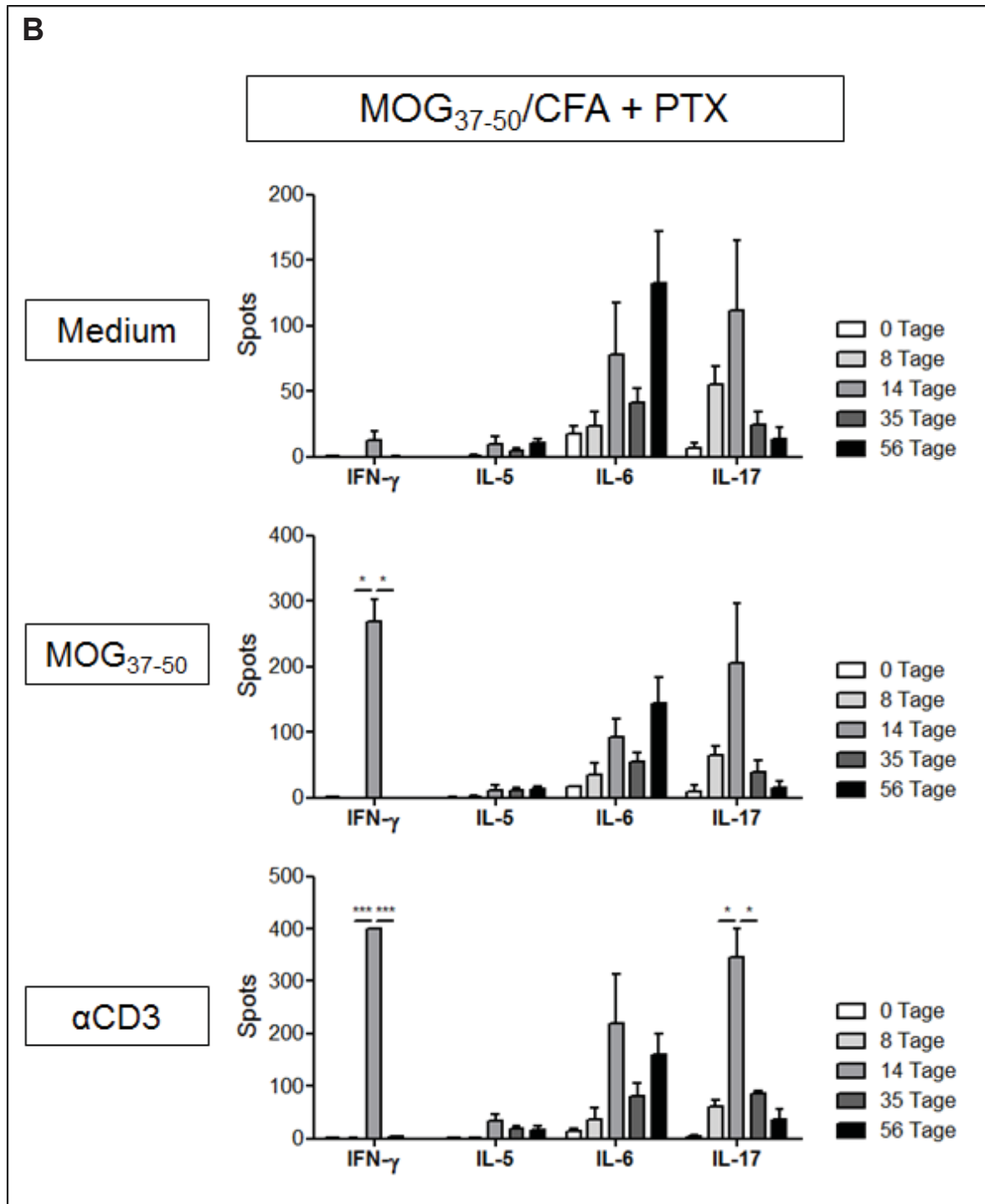


Abb. 4.4: Zytokinprofil innerhalb der MOG₃₇₋₅₀/CFA/PTX-induzierten EAE, sezerniert von Zellen aus dem Rückenmark und gemessen mittels ELISpot-Assay

Je drei murine Rückenmarksproben wurden an Tag 8, 14, 35 und 56 innerhalb der induzierten EAE sowie von naiven (Tag 0) C57BL/6-Mäusen entnommen und zusammengefügt. Die Zellen wurden für 36 h mit MOG₃₇₋₅₀, αCD3 stimuliert oder ohne Stimulation nur in Medium kultiviert. Die Zytokinsekretion wurde mittels ELISpot-Assay analysiert. **A** Jeweils ein repräsentatives Beispiel für jede Kulturbedingung nach Immunisierung mit dem Autoantigen MOG₃₇₋₅₀. **B** Für die Auswertung des ELISpot-Assay sind jeweils die Mittelwerte $\pm$ SEM dargestellt von insgesamt 3-4 unabhängigen Experimenten (statistische Auswertung: GraphPad Prism® Software 5.0, Student's t-Test: * = $p < 0.05$; *** = $p < 0.001$).

Um die ELISpot-Daten der ZNS-infiltrierenden Zellen bzw. um die Zunahme der IL-17-Sekretion ZNS-infiltrierender T-Zellen zum Peak der EAE zu bestätigen, wurde die Expression auf mRNA-Ebene mittels qRT-PCR analysiert. Hierfür wurde das Rückenmark aus mindestens drei EAE-Tieren an den Tagen 8 und 15 sowie von naiven Tieren verwendet. Anhand der $\Delta\Delta$ -CT-Methode wurde die mRNA-Expression relativ zur Kontrolle kalkuliert, hier die IL-17-Expression der EAE-Tiere in Relation zu naiven Tieren (Abb. 4.5).

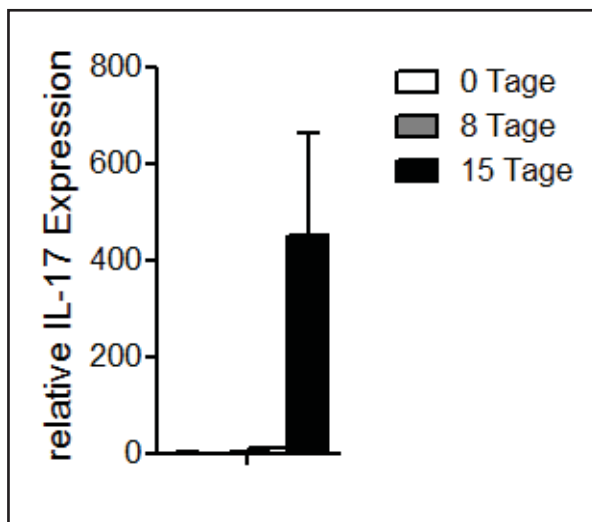


Abb. 4.5: Relative IL-17-Expression ZNS-infiltrierender T-Zellen

Relative mRNA IL-17-Expression von isolierten Rückenmarkszellen, 8 und 15 Tage nach der Immunisierung von C57BL/6-Mäusen mit MOG₃₇₋₅₀/CFA/PTX, analysiert mittels qRT-PCR. Mit der $\Delta\Delta$ -Ct-Methode wurde die mRNA-Expression relativ zur Kontrolle kalkuliert, die IL-17-Expression von EAE-Tieren relativ zu gesunden Tieren (n = 3 pro Gruppe; statistische Auswertung: GraphPad Prism® Software 5.0, Student's t-Test; nicht signifikant).

Innerhalb der EAE wiesen die ZNS-infiltrierenden T-Zellen immunisierter Tiere verglichen mit naiven Tieren an Tag 8 eine 1,3-fach erhöhte Expression von IL-17 und an Tag 15 eine 343-fach erhöhte Expression auf (nicht signifikant).

Zusammenfassend ist in der Peripherie nach Stimulation (nur IL-6 und IL-17 wurden detektiert), nach Restimulation und nach Stimulation mit α CD3 ein nahezu identischer Zytokinphänotyp mit unterschiedlicher Ausbeute erkennbar. Die höchste Sekretion von IL-17 sowie von IFN- γ wurde 8 Tage nach der Immunisierung erfasst. Bei beiden Zytokinen sank die Sekretion nach 14 Tagen stark. Die IL-17-Sekretion stieg an Tag 35 erneut und erreichte an Tag 56 den Tiefpunkt, der gleiche Trend ist auch bei der Sekretion von IFN- γ der MOG₃₇₋₅₀-induzierten EAE erkennbar. In der MOG₃₅₋₅₅-induzierten EAE erreichte die IFN- γ -Sekretion an Tag 35 den Tiefpunkt und blieb an Tag 56 nahezu unverändert. Die

höchste IL-6-Sekretion wurde an Tag 56 detektiert, danach absteigend an Tag 35, Tag 8 und Tag 14. Nach Stimulation mit α CD3 konnte ebenfalls bei naiven Tieren eine hohe IL-6-Sekretion detektiert werden (höher als an Tag 14 bzw. 8). In beiden EAE-Modellen und unter allen Kulturbedingungen wurde nahezu keine IL-5-Sekretion erfasst.

Die FACS-Daten zeigten innerhalb der MOG₃₇₋₅₀-induzierten EAE, dass die Sekretion beider proinflammatorischer Zytokine der CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen im fortschreitenden Krankheitsverlauf kontinuierlich von Tag 8 nach Tag 56 sank. Bei MOG₃₅₋₅₅-induzierten EAE fiel die Sekretion der proinflammatorischen Zytokine beider Zellpopulationen von Tag 8 (Peak) auf Tag 14 ab, stieg an Tag 35 erneut und sank wieder an Tag 56. In beiden Modellen sezernierten doppelt so viele CD4⁺-T-Zellen IFN- γ und IL-17 wie CD8⁺-T-Zellen und es wurde zu jedem Zeitpunkt des EAE-Verlaufes doppelt soviel IFN- γ sezerniert wie IL-17.

Auch bei den ZNS-infiltrierenden Zellen der MOG₃₇₋₅₀-EAE war unter allen drei Kulturbedingungen ein identisches Zytokinmuster aller Zytokine mit lediglich quantitativen Unterschieden erkennbar. IFN- γ konnte nur an Tag 14 detektiert werden. Bereits an Tag 8 konnte eine IL-17-Sekretion detektiert werden, die an Tag 14 stark erhöht war, an Tag 35 erneut sank und an Tag 56 ihren Tiefstand erreichte. Die qPCR unterstützte die ELISpot-Daten einer erhöhten Präsenz von IL-17 im Rückenmark nach 14 bzw. 15 Tagen und eine leichte Erhöhung nach 8 Tagen. Eine geringe Produktion von IL-6 konnte auch bereits an Tag 8 ermittelt werden. Auch IL-6 wurde an Tag 14 vermehrt sezerniert, an Tag 35 vermindert und an Tag 56 stieg die Sekretion erneut. Während des Krankheitsverlaufes wurde nahezu kein IL-5 sezerniert.

4.1.3 Die funktionelle Avidität der MOG₃₇₋₅₀-spezifischen IL-17-sezernierenden Zellen im Verlauf der EAE

Die Bindungsstärke zwischen einem Antigen und einem Antikörper wird als Avidität bezeichnet. Die funktionelle Avidität einer T-Zell-Population wird definiert als Peptiddosis, bei der 50% der maximal induzierten, peptidspezifischen T-Zellen aktiviert werden (Keff value). Bei einer hohen Avidität werden demnach T-Zellen schon durch eine geringe Peptidkonzentration (Konzentration des Antigens) stimuliert, bei einer niedrigen Avidität reziprok durch eine hohe Dosis.

Hier wurde untersucht, ob sich die Avidität der MOG₃₇₋₅₀-spezifischen IL-17-sezernierenden Zellen im chronischen Autoimmunprozess der EAE verändert. In mindestens drei unabhängigen Experimenten wurden dafür die Splenozyten einzelner Versuchstiere

(entstammten der ELISpot-Analyse 4.1.2.1) zusammengefügt und mit einer sinkenden MOG₃₇₋₅₀-Konzentration kultiviert sowie eine sogenannte Dosis-Wirkungskurve erstellt. Die Zytokinsekretion der Zellen im Konzentrationsgefälle des Antigens gibt Aufschluss über die Stärke der T-Zell-Aktivierung und reflektiert die funktionelle Avidität (Abb.4.6). Gemessen wurde die Zytokinsekretion mittels ELISpot-Analyse.

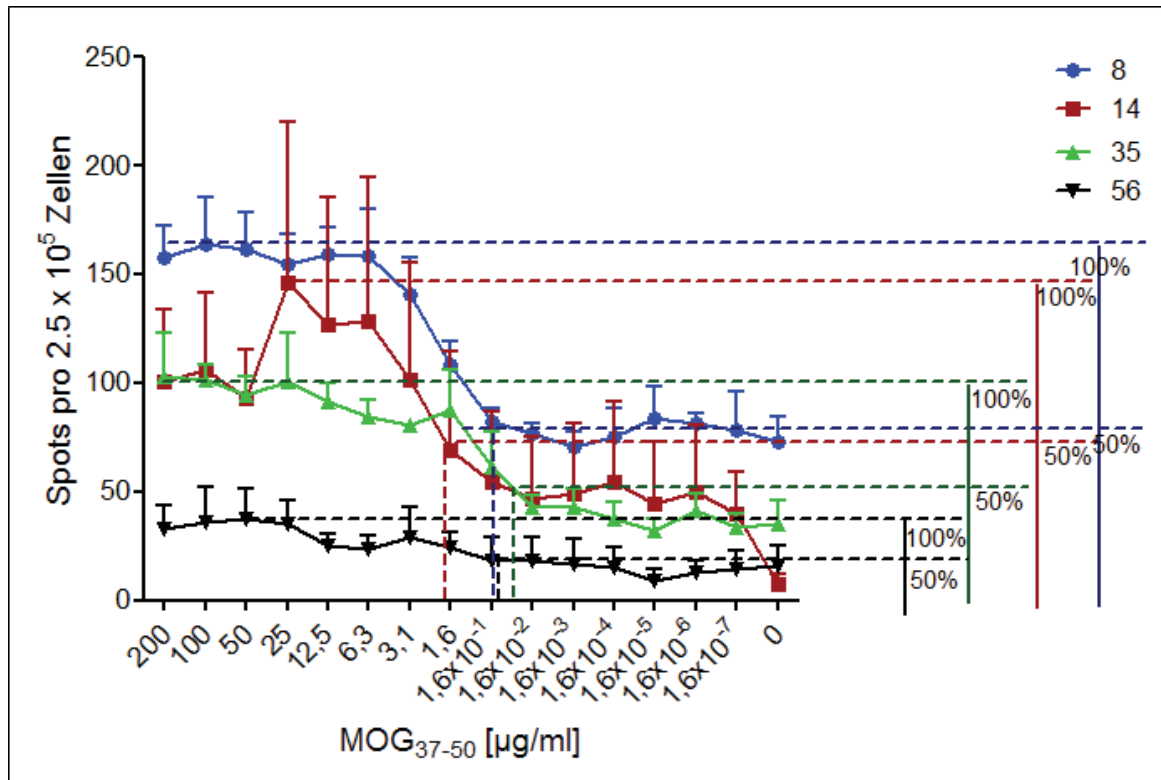


Abb. 4.6: Die funktionelle Avidität der MOG₃₇₋₅₀-spezifischen IL-17-sezernierenden Splenozyten im chronischen Autoimmunprozess

Splenozyten von C57BL/6-Mäusen 8, 14, 35 und 56 Tage nach Immunisierung mit MOG₃₇₋₅₀/CFA/PTX wurden jeweils zusammengefügt und die Avidität mittels einer Dosis-Wirkungskurve analysiert. Die IL-17-Sekretion wurde mittels ELISpot analysiert. (n = insgesamt 3 in 3 unabhängigen Versuchen; statistische Auswertung: GraphPad Prism® Software 5.0, Student's t-Test).

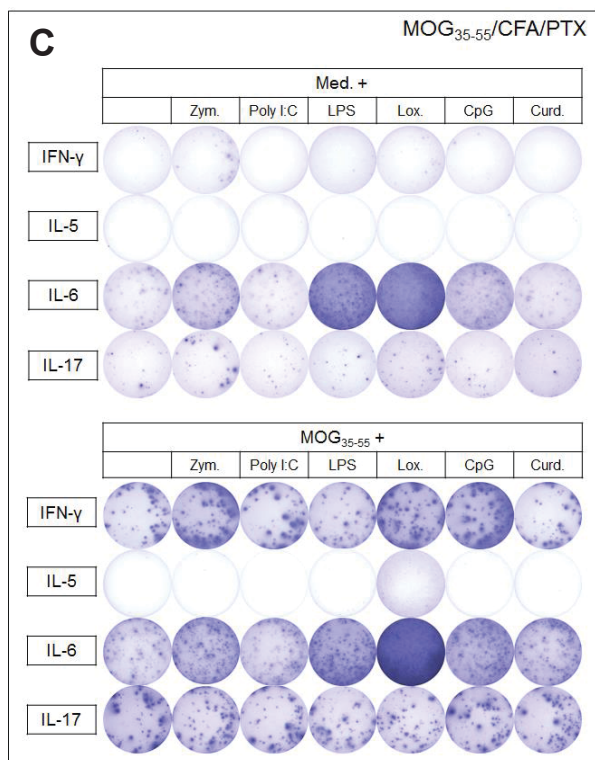
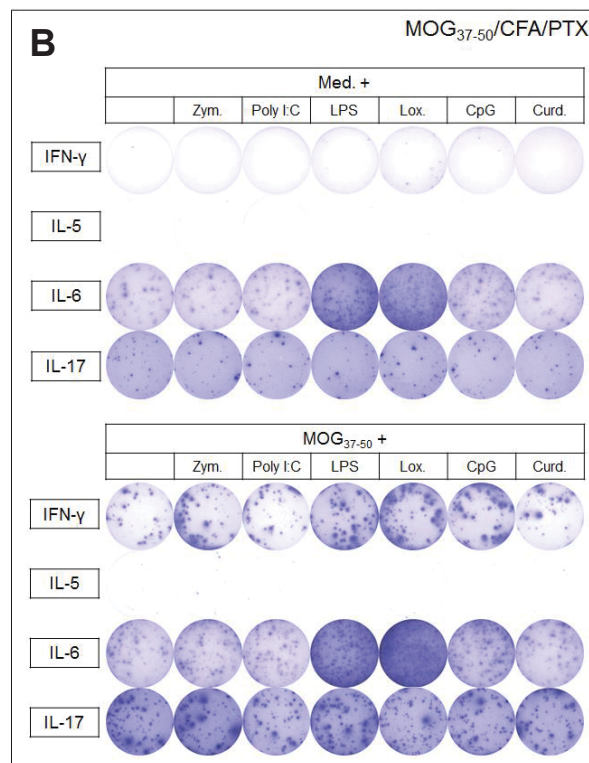
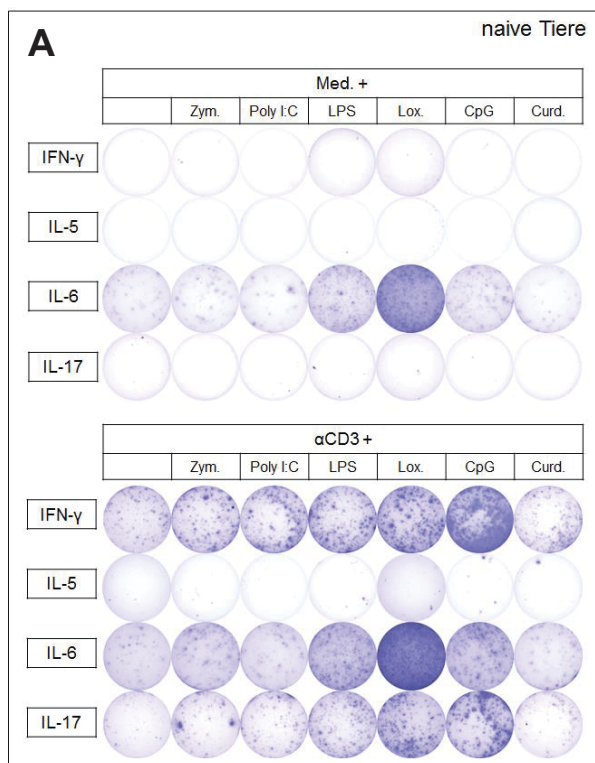
Die Frequenz maximaler induzierter IL-17-Sekretion lag an Tag 8 mit 163,67 Spots von 250.000 am höchsten, danach sank die Frequenz mit fortschreitendem Krankheitsverlauf der EAE - 146,33 an Tag 14, 103,33 an Tag 35 und 37,39 an Tag 56. 50% der Aktivität wurde an Tag 35 bei 0,09 erreicht, an Tag 8 sowie an Tag 56 waren 0,16 µg/ml und an Tag 14 1,6 µg/ml feststellbar. Nur ein minimaler Unterschied konnte demnach innerhalb des EAE-Verlaufs detektiert werden.

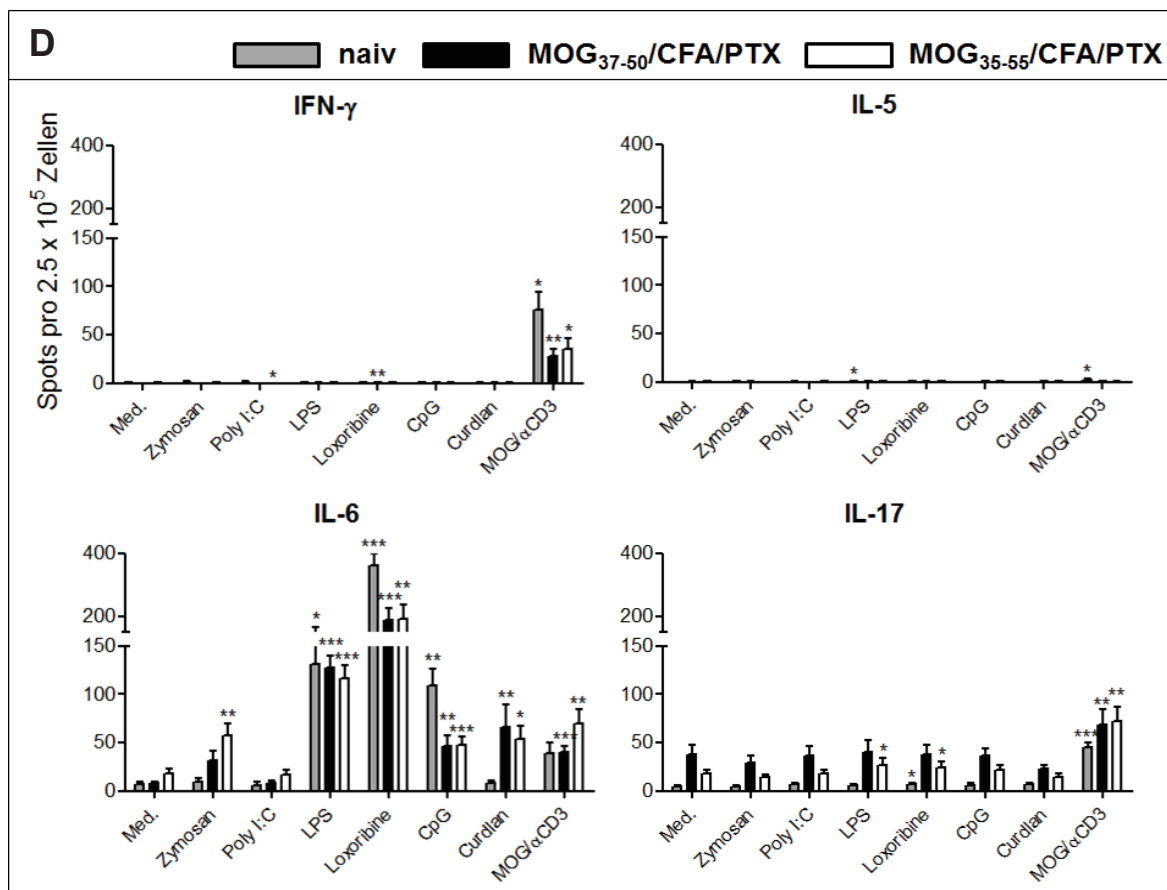
4.1.4 Der Einfluss verschiedener PAMPs auf die IL-17-Sekretion von MOG₃₇₋₅₀- und MOG₃₅₋₅₅-spezifischen T-Zell-Populationen

Verschiedene mikrobielle Pathogene bzw. PAMPs können auf den Verlauf von Autoimmunkrankheiten eine supprimierende oder verstärkende Wirkung haben oder auch wirkungslos sein. Hier wurde der Einfluss verschiedener PAMPs auf das spezifische Zytokinmuster, insbesondere IL-17, in geprimten und ungeprimten T-Zellen untersucht. Für den Versuch wurden die Splenozyten und ZNS-infiltrierenden Zellen (aus dem Rückenmark) von Mäusen 14 Tage nach Immunisierung mit MOG₃₇₋₅₀/CFA/PTX oder mit MOG₃₅₋₅₅/CFA/PTX sowie aus naiven C57BL/6-Mäusen entnommen. Die Zellen wurden mit unterschiedlichen PAMPs (Zymosan, Poly I:C, LPS, Loxoribine, CpG, Curdlan) entweder alleine oder in Kombination mit dem jeweiligen MOG bzw. CD3 bei naiven Tieren (Kostimulation) für 16 h kultiviert. Die Messung der Zytokine erfolgte mittels ELISpot- und FACS-Analyse.

4.1.4.1 Der Einfluss verschiedener PAMPs auf T-Zellen in der Peripherie (Mittelwert Anzahl Spots)

Um den stimulierenden sowie kostimulierenden Effekt der PAMPs auf die Splenozyten zu untersuchen, wurden die Kulturbedingungen identisch zu den ELISpot-Analysen in 4.1.2.1 und mit 2.5×10^5 Splenozyten pro well verwendet (Abb. 4.7).





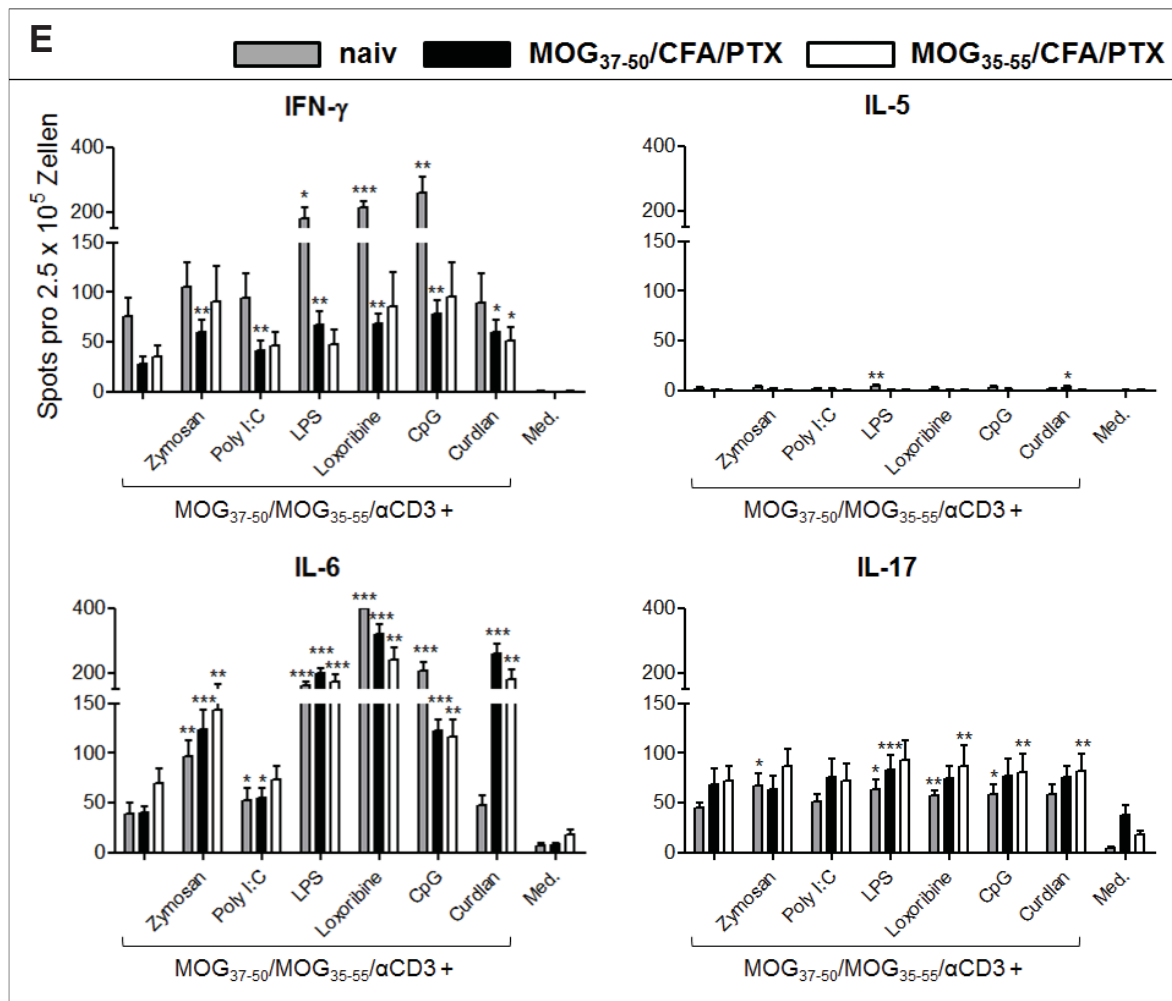


Abb. 4.7: Das Zytokinprofil antigengeprimter und ungeprimter T-Zellen aus der Peripherie nach Stimulation mit verschiedenen PAMPs, analysiert mittels ELISpot-Assay

Je 2.5×10^5 Splenozyten wurden mit unterschiedlichen PAMPs stimuliert und die Zytokinsekretion nach 36 h mittels ELISpot-Assay analysiert. Die T-Zellen wurden von naiven Mäusen oder 14 Tage nach MOG₃₇₋₅₀/CFA/PTX, MOG₃₅₋₅₅/CFA/PTX-Immunisierung von C57BL/6-Mäusen isoliert. **A-C:** Je ein repräsentatives Beispiel des ELISpot-Assays eines Tieres. **D/E:** Auswertung aller ELISpot-Assays nach Stimulation (D) und Kostimulation (E) mit PAMPs. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte $\pm$ SEM von je 3 in 3-4 unabhängigen Experimenten (statistische Auswertung: GraphPad Prism® Software 5.0, Student's t-Test: * = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$; *** = $p < 0.001$).

naive Tiere, ungeprimte T-Zellen (Abb. 4.7 C-E):

Ohne zusätzliche Stimulation mit α CD3 ist nahezu keine Sekretion von IFN- γ und IL-17 zu detektieren, außer mit α CD3 (75,58 und 44,58 Spots). Auch wurde nur eine sehr niedrige Frequenz von IL-5 gemessen, die signifikant durch Stimulation mit LPS (0,3 Spots) und α CD3 (2,5 Spots) erhöht war. Die IL-6-Sekretion wurde ebenfalls signifikant erhöht durch Stimulation mit LPS (131,17 Spots), Loxoribine (359,75) und CpG (109 Spots). In Kombination mit α CD3 hatten LPS (180,83 Spots), Loxoribine (214,33 Spots) und CpG (260,17 Spots) einen starken kostimulierenden Effekt auf die IFN- γ -Sekretion (nach α CD3-

Stimulation 75,58 Spots). Nahezu keine Sekretion von IL-5 (nach α CD3-Stimulation (2,5 Spots) wurde detektiert, die niedrige Frequenz war nach Kostimulation mit LPS (4,83 Spots) leicht erhöht. Bis auf Curdlan haben alle PAMPs einen kostimulierenden Effekt. Die höchste Sekretion von IL-6 (nach α CD3-Stimulation 38,58 Spots) wurde nach Kostimulation mit Loxoribine (400 Spots) detektiert, danach absteigend CpG (207,75 Spots), LPS (162,92 Spots), Zymosan (96,92 Spots) und Poly I:C (52,08 Spots). Die IL-17-Sekretion (nach α CD3-Stimulation 44,58 Spots) wurde durch alle PAMPs kostimuliert, signifikant durch Zymosan (67,58 Spots), LPS (63,92 Spots), Loxoribine (57 Spots) und CpG (59 Spots).

MOG₃₇₋₅₀-induzierte EAE (Abb. 4.7 A, D, E):

Vereinzelt führte nur die MOG-Restimulation zu einer signifikanten Erhöhung der IL-17- (68,77 Spots) und IFN- γ -Sekretion (28 Spots) sowie bei IFN- γ zusätzlich Loxoribine (0,62 Spots). Auf die IL-6-Sekretion stimulierend wirkten Loxoribine (321,19 Spots), LPS (201 Spots), CpG (122,96 Spots) und Curdlan (258,731 Spots). Die IL-5-Sekretion wurde von keinem der PAMPs stimuliert.

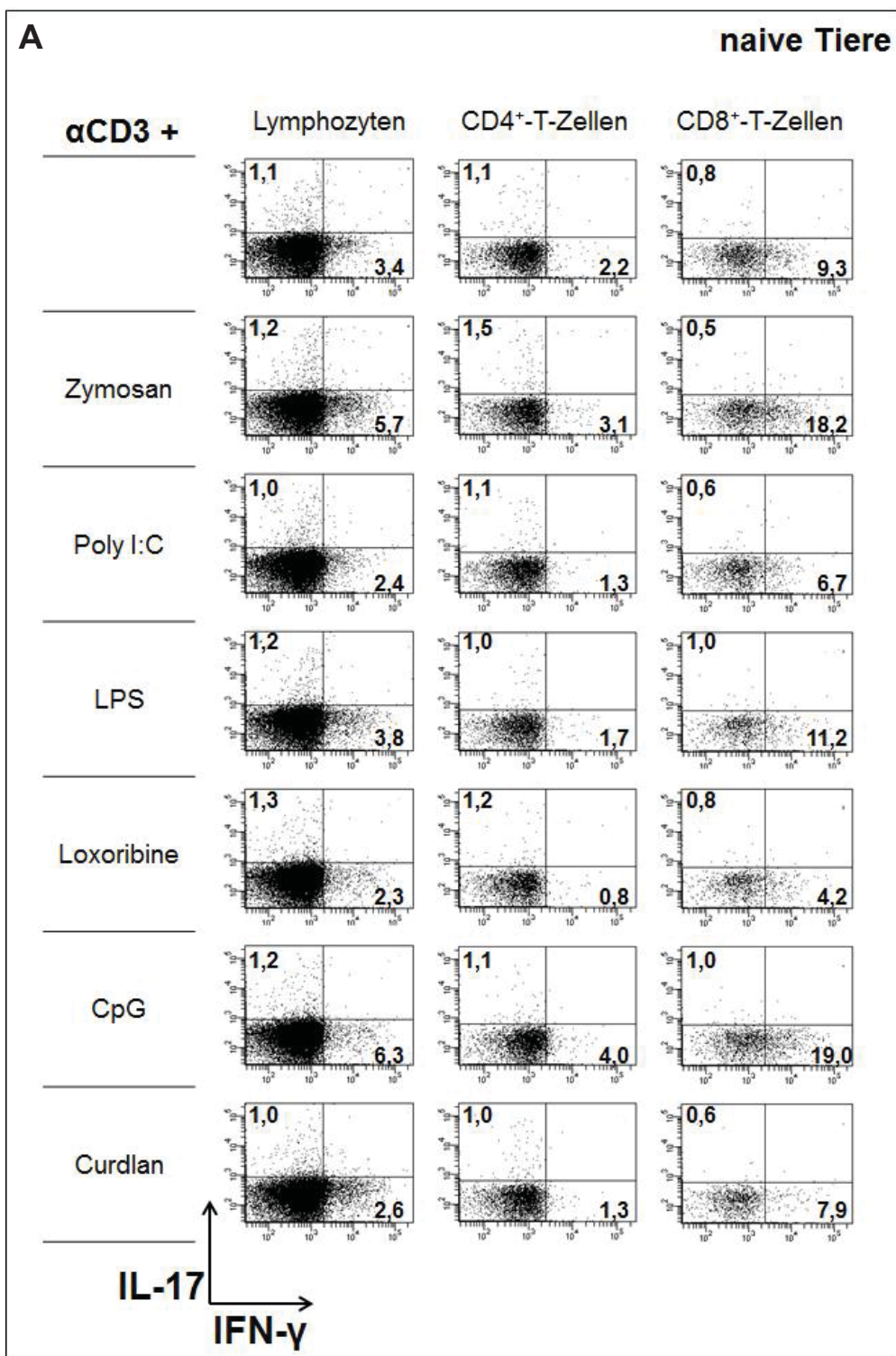
Kostimulierend auf die MOG₃₇₋₅₀-induzierte Sekretion von IFN- γ (nach Restimulation 28 Spots) wirkten alle PAMPs, in absteigender Reihenfolge CpG (78,88 Spots), Loxoribine (68,38 Spots), LPS (67,35 Spots), Zymosan (60,04 Spots), Curdlan (59,23 Spots) und Poly I:C (40,88 Spots). Ebenfalls wurde die IL-6-Sekretion (nach Restimulation 40,04 Spots) von allen PAMPs kostimuliert, hier in absteigender Reihenfolge Loxoribine (321,19 Spots), Curdlan (258,73 Spots), LPS (201 Spots), Zymosan (124,27 Spots), CpG (122,96 Spots) und Poly I:C (54,69 Spots). IL-17 (nach Restimulation 68,77 Spots) wird im Gegensatz dazu nur signifikant von LPS (83,04 Spots) kostimuliert und IL-5 (nach Restimulation 0,65 Spots) von Curdlan (2,81 Spots).

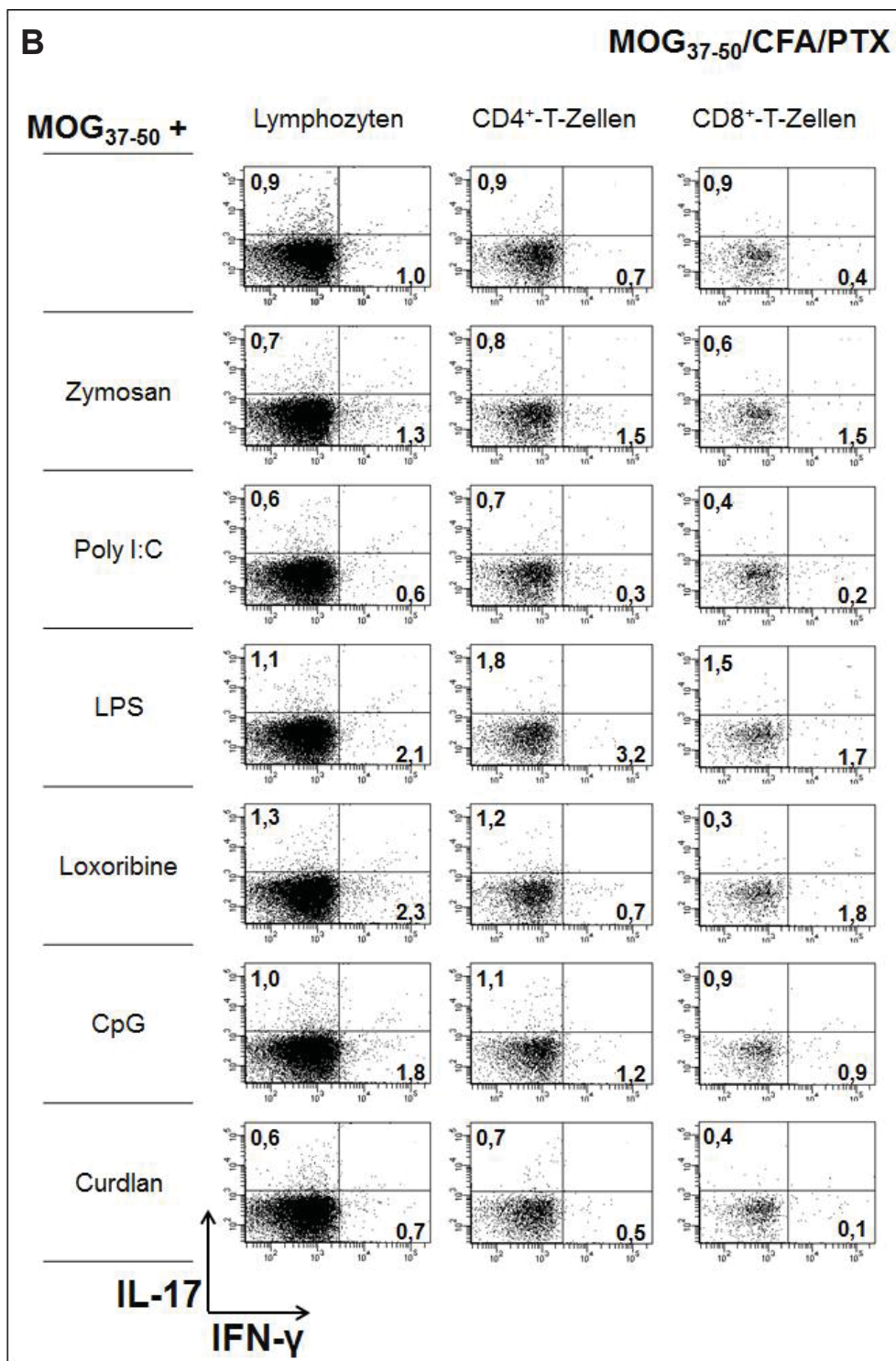
MOG₃₅₋₅₅-induzierte EAE (Abb. 4.7 B, D, E):

Neben der Restimulation mit MOG (34,68 Spots) wurde die IFN- γ -Sekretion nur von Poly I:C (0 Spots) supprimiert. Die IL-5-Sekretion wurde ohne Restimulation mit MOG von keinem der PAMPs stimuliert. Auf die IL-17-Sekretion (nach Restimulation 71,64 Spots) hatten LPS (26,86 Spots) und Loxoribine (24,36 Spots). Bis auf Poly I:C hatten neben der Restimulation mit MOG (69,27 Spots) alle PAMPs eine stimulierende Wirkung auf die IL-6-Sekretion, in absteigender Reihenfolge Loxoribine (191,82 Spots), LPS (116,36 Spots), Zymosan (57,14 Spots), Curdlan (53,18 Spots) und CpG (48 Spots). Kostimulierend auf die MOG₃₅₋₅₅-spezifische IFN- γ -Sekretion (nach Restimulation 34,68 Spots) wirkten Zymosan (91,05 Spots), Loxoribine (85,73 Spots) und CpG (95,23 Spots), aber signifikant nur Curdlan (51,22 Spots). Die IL-5-Sekretion wurde von keinem der PAMPs kostimuliert.

Bis auf Poly I:C hatten alle PAMPs einen kostimulierenden Effekt auf die IL-6-Sekretion (nach Restimulation 69,27 Spots), in absteigender Reihenfolge Loxoribine (239,27 Spots), Curdlan (182,27 Spots), LPS (174,5 Spots), Zymosan (142,86 Spots) und CpG (116,68 Spots). Loxoribine (87,14 Spots), CpG (81,18 Spots) und Curdlan (81,91 Spots) wirkten kostimulierend auf die MOG₃₅₋₅₅-spezifische IL-17-Sekretion (nach Restimulation 71,64 Spots). LPS erhöhte ebenfalls die IL-17-Sekretion (93,32 Spots), aber nicht signifikant.

Auch hier wurden die IL-17- und IFN- γ -sezernierenden Zellpopulationen mit der FACS-Analyse näher charakterisiert. Für die FACS-Analyse wurden jeweils $2,5 \times 10^6$ Splenozyten naiver Mäuse oder EAE-Mäuse 14 Tage nach Induktion für 16 h mit den stimulierenden Reagenzien nur in Kombination mit MOG₃₇₋₅₀, MOG₃₅₋₅₅ oder α CD3 stimuliert, da in dem ELISpot-Assay hauptsächlich ein kostimulierender Effekt detektiert wurde. In Abbildung 4.8 ist jeweils ein repräsentatives Beispiel der FACS-Analyse jeder Kulturbedingung dargestellt.





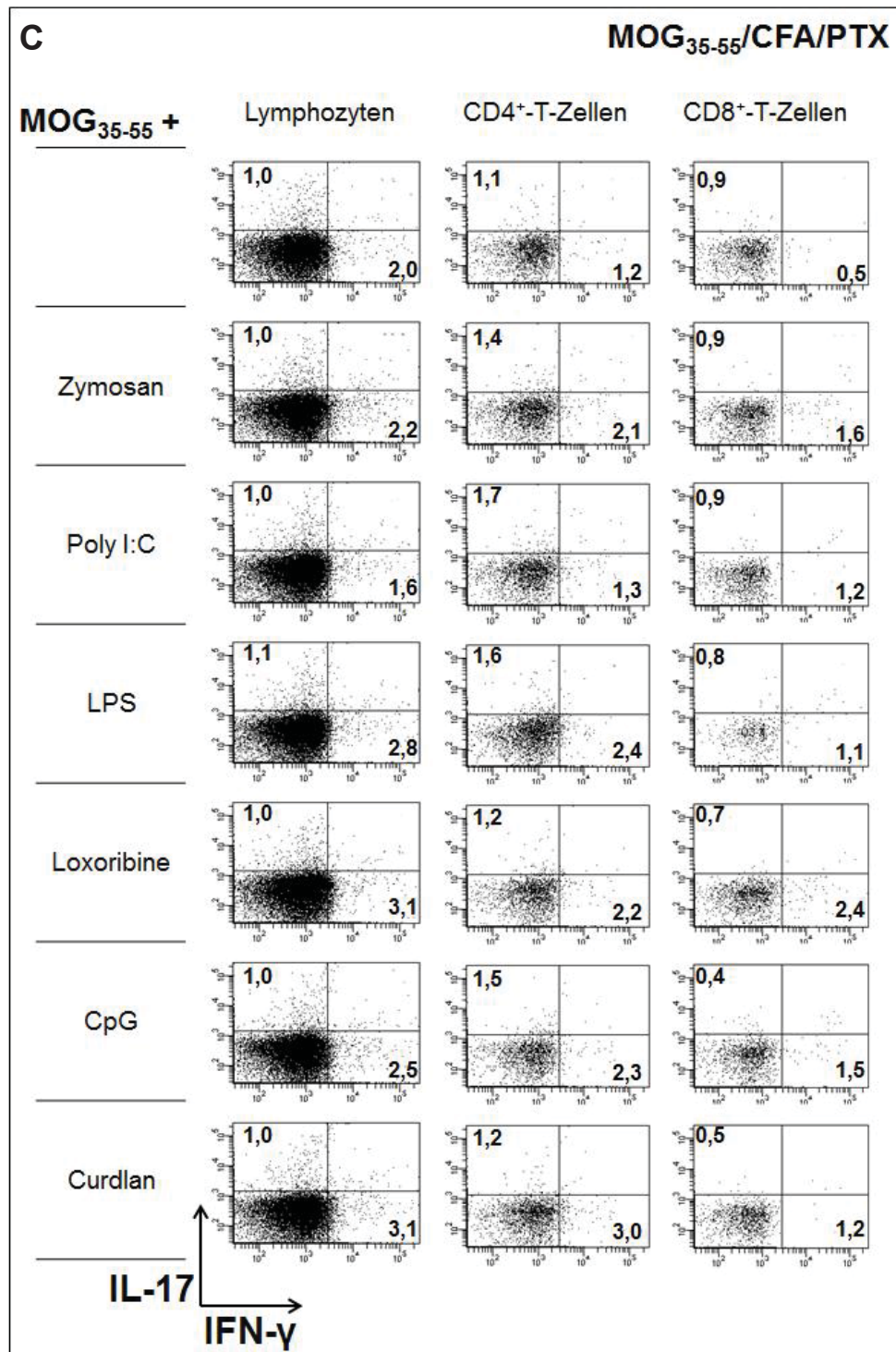


Abb. 4.8: Intrazelluläre FACS-Analyse antigengeprimter und ungeprimter T-Zellen aus der Peripherie nach Stimulation mit verschiedenen PAMPs

2,5x10⁶ Splenozyten wurden 14 Tage nach MOG₃₇₋₅₀/CFA/PTX- und MOG₃₅₋₅₅/CFA/PTX-Immunisierung sowie aus naiven C57BL/6-Mäusen isoliert und mit unterschiedlichen PAMPs in Kombination mit αCD3 (A), MOG₃₇₋₅₀ (B) oder MOG₃₅₋₅₅ (C) für 16 h stimuliert. Die MOG-spezifische Zytokinsekretion wurde mit einem FACS Guava EasyCyte™ 8 oder mit einem BD FACS Canto II mit entsprechender Software analysiert. Die Daten sind in Prozent angegeben und veranschaulichen jeweils ein repräsentatives Beispiel von 3-4 unabhängigen Experimenten. Die Populationen sind wie folgt gated: Lymphozyten > lebende Zellen; Lymphozyten > lebende Zellen > CD4⁺-T-Zellen; Lymphozyten > lebende Zellen > CD8⁺-T-Zellen.

naive Tiere, ungeprimte T-Zellen (Abb. 4.8 A):

Insgesamt lag der prozentuale Anteil IL-17 sezernierender Zellen um 1 % und wurde durch Kostimulation mit verschiedenen PAMPs nur geringfügig beeinflusst wie auch die CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen. Nach Kostimulation mit Zymosan (+0,1 %), LPS (+0,1 %), Loxoribine (+0,2 %) und CpG (+0,1 %) erhöhte sich die Sekretion IL-17-sezernierender Zellen insgesamt leicht und durch Poly I:C (-0,1 %) sowie Curdlan (-0,1 %) wurde diese leicht herabgesetzt. Kostimulierend auf die IL-17-Sekretion der naiven CD4⁺-T-Zellen (nach Stimulation mit α CD3 1,1 %) wirkten Zymosan (+0,4 %) sowie Loxoribine (+0,1 %) und leicht supprimierend wirkten LPS (-0,1 %) und Curdlan (-0,1 %). Poly I:C und CpG hatten keinen Einfluss. Die IL-17-Sekretion der CD8⁺-T-Zellen (nach Stimulation mit α CD3 0,8 %) wurde erhöht durch Kostimulation mit LPS (+0,2 %) und CpG (+0,2 %) und reduziert mit Zymosan (-0,3 %), Poly I:C (-0,2 %) sowie Curdlan (-0,2 %). Nach Kostimulation mit Loxoribine blieb die Zellpopulation IL-17-sezernierender CD8⁺-T-Zellen bei 0,8 %.

Auf die IFN- γ -Sekretion (3,4% mit α CD3-Stimulation) insgesamt kostimulierend wirkten Zymosan (+2,3 %), LPS (+0,4 %) und CpG (+2,9 %). Supprimierend wirkten Poly I:C (-1 %), Loxoribine (-1,1 %) und Curdlan (-0,8 %) auf die gesamte IFN- γ -sezernierende Population. Einen kostimulierenden Effekt auf die CD4⁺-T-Zellen und CD8⁺-T-Zellen (2,2 %/9,3 % mit α CD3-Stimulation) hatte Zymosan (+0,9 % /+9,5 %), CpG (1,8 %/+9,7 %) und auf die CD8⁺-T-Zellen außerdem LPS (+1,9 %). Reduziert wurde die IFN- γ -Sekretion der CD4⁺- und CD8⁺-T-Zell-Populationen nach Kostimulation mit Poly I:C (-0,9 %/-2,6 %, mit Loxoribine (-14,4 %/-5,1 %), Curdlan (-0,9 %/-1,4%) und die CD4⁺-T-Zellen zusätzlich mit LPS (-0,5 %). Ein vielfach prozentual höherer Anteil CD8⁺-T-Zellen als CD4⁺-T-Zellen sezernierte IFN- γ nach Kostimulation mit den verschiedenen mikrobiellen Pathogenen. Im Gegensatz dazu unterscheidet sich der prozentuale Anteil IL-17-sezernierender Zellen beider Zellpopulationen kaum, um höchstens 1% nach Kostimulation mit Zymosan.

MOG₃₇₋₅₀-induzierte EAE (Abb. 4.8 B):

Die IL-17-Sekretion lag insgesamt nach Restimulation mit MOG₃₇₋₅₀ bei 0,9%. Eine Reduktion der IL-17-Sekretion folgte nach Kostimulation mit Zymosan (-0,2 %), Poly I:C (0,3 %) und Curdlan (-0,3 %). Durch die Kostimulation mit LPS (+0,2 %), Loxoribine (+0,4 %) und CpG (+0,1 %) wurde die Sekretion jeweils erhöht. Auf die CD4⁺-T-Zellen (0,9 % nach Restimulation) einen kostimulierenden Effekt hatte LPS (+0,9 %), Loxoribine (+ 0,3 %) und CpG (+0,2 %). Zymosan (-0,1 %), Poly I:C (-0,1 %) und Curdlan (-0,2 %) reduzierte die IL-17-Sekretion CD4⁺-T-Zellen. Eine Kostimulation mit LPS führte zu einer Erhöhung der IL-17-Sekretion (+0,6 %). Reduziert wurde die Sekretion IL-17-sezernierender CD8⁺-T-Zellen (0,9 % nach Restimulation) durch Kostimulation mit Zymosan (-0,3 %), Poly I:C (-0,5

%), Loxoribine (-0,6 %) sowie mit Curdlan (-0,5 %) und CpG hatte keinen Einfluss (Zellpopulation blieb bei 0,9 %).

Erhöht wurde die IFN- γ -Produktion (1,0 % nach Restimulation) insgesamt nach Kostimulation mit Zymosan (+0,3 %), mit LPS (+1,1 %), Loxoribine (+1,3 %) und CpG (+0,8 %). Eine Reduktion der IFN- γ -Sekretion erfolgte durch Kostimulation mit Poly I:C (-0,4 %) und Curdlan (-0,3%). Auf die IFN- γ -CD4⁺-T-Zell-Population (0,7% nach Restimulation) wirkten Zymosan (+0,8 %), LPS (+1,5 %) und CpG (+0,5 %). Die Kostimulation mit Poly I:C (-0,4 %) und Curdlan (-0,2 %) führte zu einer Reduktion der IFN- γ -Sekretion innerhalb der CD4⁺-T-Zell-Populationen, während Loxoribine keinen Einfluss hatte. Reduzierend auf die CD8⁺-T-Zell-Population wirkte die Kostimulation durch Poly I:C (-0,2 %) und Curdlan (-0,3 %). Den größten kostimulierenden Effekt, ausgehend von 0,4 % bei MOG₃₇₋₅₀-Restimulation, hatte Loxoribine (+1,4 %), danach absteigend LPS (+1,3 %), Zymosan (+1,1 %) und CpG (+0,5 %). Wird der prozentuale Anteil der IFN- γ - und IL-17-sezernierender CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen nach der Kostimulation mit den verschiedenen Pathogenen miteinander verglichen, so unterscheiden sich beide Zellpopulationen nur geringfügig.

MOG₃₅₋₅₅-induzierte EAE (Abb. 4.8 C):

Die MOG-spezifische IL-17-Sekretion blieb insgesamt nach der Kostimulation mit allen PAMPs konstant bei 1%. Die Kostimulation mit LPS führte lediglich zu einem Anstieg der Sekretion um 0,1 %. Alle PAMPs erhöhten die Sekretion IL-17-sezernierender CD4⁺-T-Zellen. Ausgehend von einer Zellpopulation von 1,1% nach Restimulation wurden die IL-17-sezernierenden CD4⁺-T-Zellen kostimuliert mit Zymosan (+0,3 %), Poly I:C (+0,6 %), LPS (+0,5 %), Loxoribine (+0,1 %), CpG (+ 0,4 %) und Curdlan (+0,1 %). Die IL-17-Sekretion von CD8⁺-T-Zellen wurde reduziert durch Kostimulation mit LPS (-0,1 %), Loxoribine (-0,2 %), CpG (-0,5 %) und Curdlan (-0,4 %). Zymosan und Poly I:C führte zu keiner Veränderung der Sekretion, die IL-17-Sekretion der CD8⁺-T-Zellen betrug wie nach Restimulation mit MOG₃₅₋₅₅ 0,9 %.

Auf die IFN- γ -Sekretion insgesamt (2 % nach Restimulation) wirkten Zymosan (+0,2 %), LPS (+0,8 %), Loxoribine (+1,1 %), CpG (+0,5 %) und Curdlan (+1,1 %) kostimulierend. Poly I:C supprimierte die IFN- γ -Sekretion (-0,4 %). Alle PAMPs hatten einen kostimulierenden Effekt auf die CD4⁺- und CD8⁺-T-Zell-Populationen (1,2%/0,5% nach Restimulation). Zymosan erhöhte die IFN- γ -Sekretion um 0,9%/1,1%, Poly I:C um 0,1 %/0,7 % LPS um 1,2 %/0,6 %, Loxoribine um 1 %/1,9 %, CpG um 1,1 %/1 % sowie Curdlan um 1,8 %/0,7 %. Auch hier unterscheidet sich der prozentuale Anteil der IFN- γ - sowie IL-17-sezernierenden CD4⁺-T-Zellen von den CD8⁺-T-Zellen kaum.

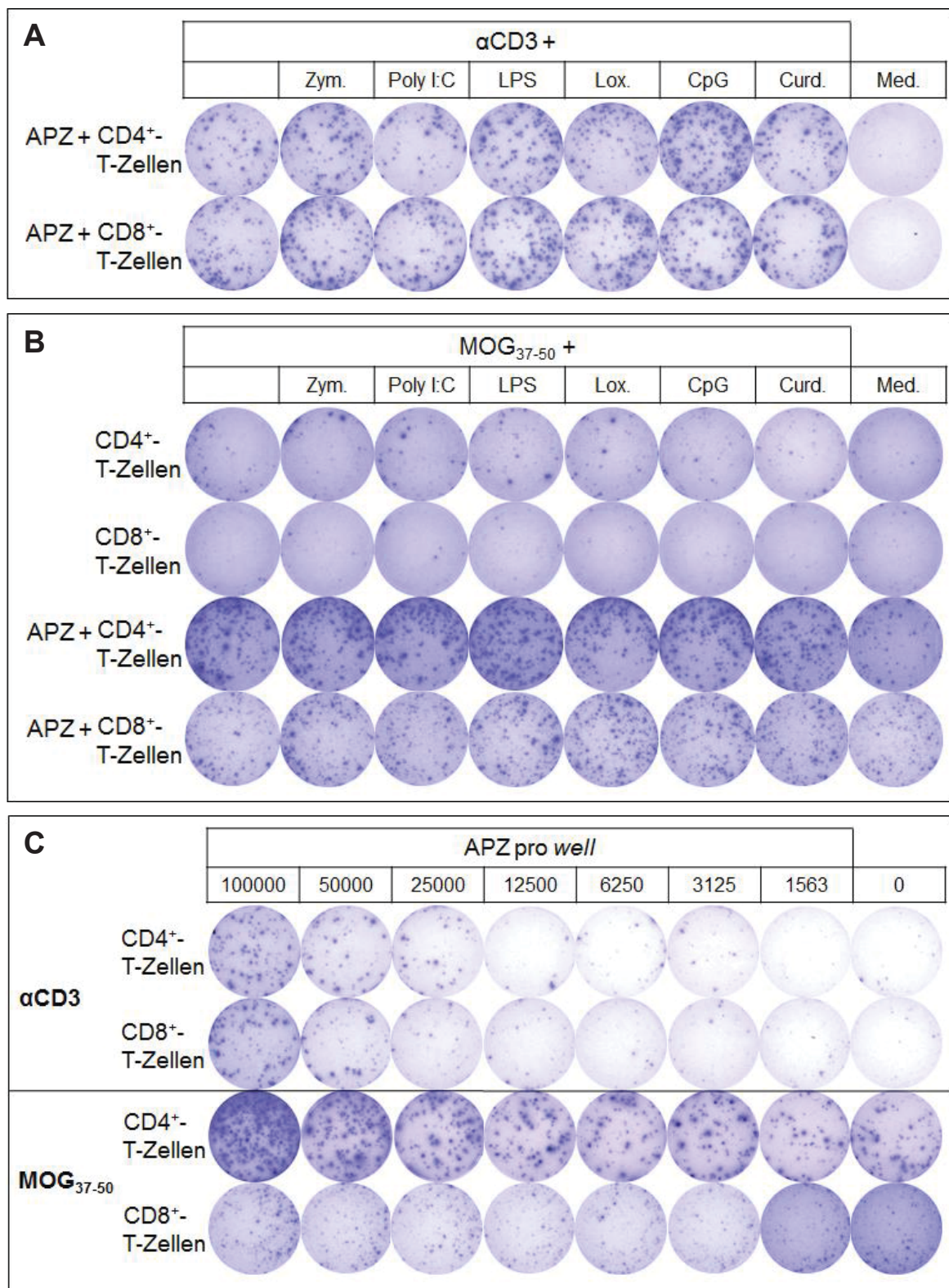
4.1.4.2 Der Einfluss verschiedener PAMPs auf die IL-17-Sekretion CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen in der Peripherie (Mittelwert Anzahl Spots)

In dem nächsten Schritt sollte untersucht werden, ob die IL-17-Sekretion, induziert durch den kostimulierenden Effekt der PAMPs, in erster Linie von den CD4⁺- oder CD8⁺-Zellen stammt und ob die Sekretion direkt oder indirekt durch APZ eingeleitet wird.

Hierfür wurden aus Milzen – pro Versuch wurden zwei zusammengefügt - naiver C57BL/6-Mäuse sowie 14 Tage nach EAE-Induktion mit MOG₃₇₋₅₀/CFA/PTX die CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen mittels Negativselektion separiert und die APZ durch Isolation von CD4⁺- und CD8⁺-Zellen gewonnen. Die Reinheit wurde mittels FACS-Analyse überprüft. Jeweils 10⁵ der isolierten CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen wurden in Anwesenheit und bei den MOG₃₇₋₅₀-spezifischen Zellen auch in Abwesenheit isolierter APZ (10⁵) mit den verschiedenen PAMPs für 16 h kostimuliert. Die Zytokinsekretion wurde mittels ELISpot-Assay analysiert (Abb. 4.9).

Naive Tiere, ungeprimte T-Zellen (Abb. 4.9 A, C, D):

Bis auf Poly I:C bei den naiven CD4⁺-T-Zellen hatten alle eingesetzten PAMPs einen kostimulierenden Effekt auf die IL-17-Sekretion naiver CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen. Bei den CD4⁺-T-Zellen (82,88 Spots nach α CD3-Stimulation) hatte LPS (125,5 Spots) den höchsten kostimulierenden Effekt, danach absteigend Curdlan (109,88 Spots), Zymosan (106,63 Spots), Loxoribine (93,38 Spots) und CpG (88,88 Spots). Allerdings war nur die Kostimulation mit Zymosan statistisch signifikant. Poly I:C reduzierte die IL-17-Sekretion der CD4⁺-T-Zellen (67 Spots). Die höchste Sekretion von IL-17 bei den CD8⁺-T-Zellen (55,63 Spots) nach α CD3-Stimulation) wurde nach Kostimulation mit CpG (110,88 Spots) gemessen, danach in absteigender Reihenfolge Curdlan (109,86 Spots), LPS (94,38 Spots), Zymosan (90,13 Spots), Poly I:C (79 Spots) und Loxoribine (73,63 Spots). Signifikant erhöht wurde die Sekretion hier nur durch Zymosan, LPS und Curdlan.



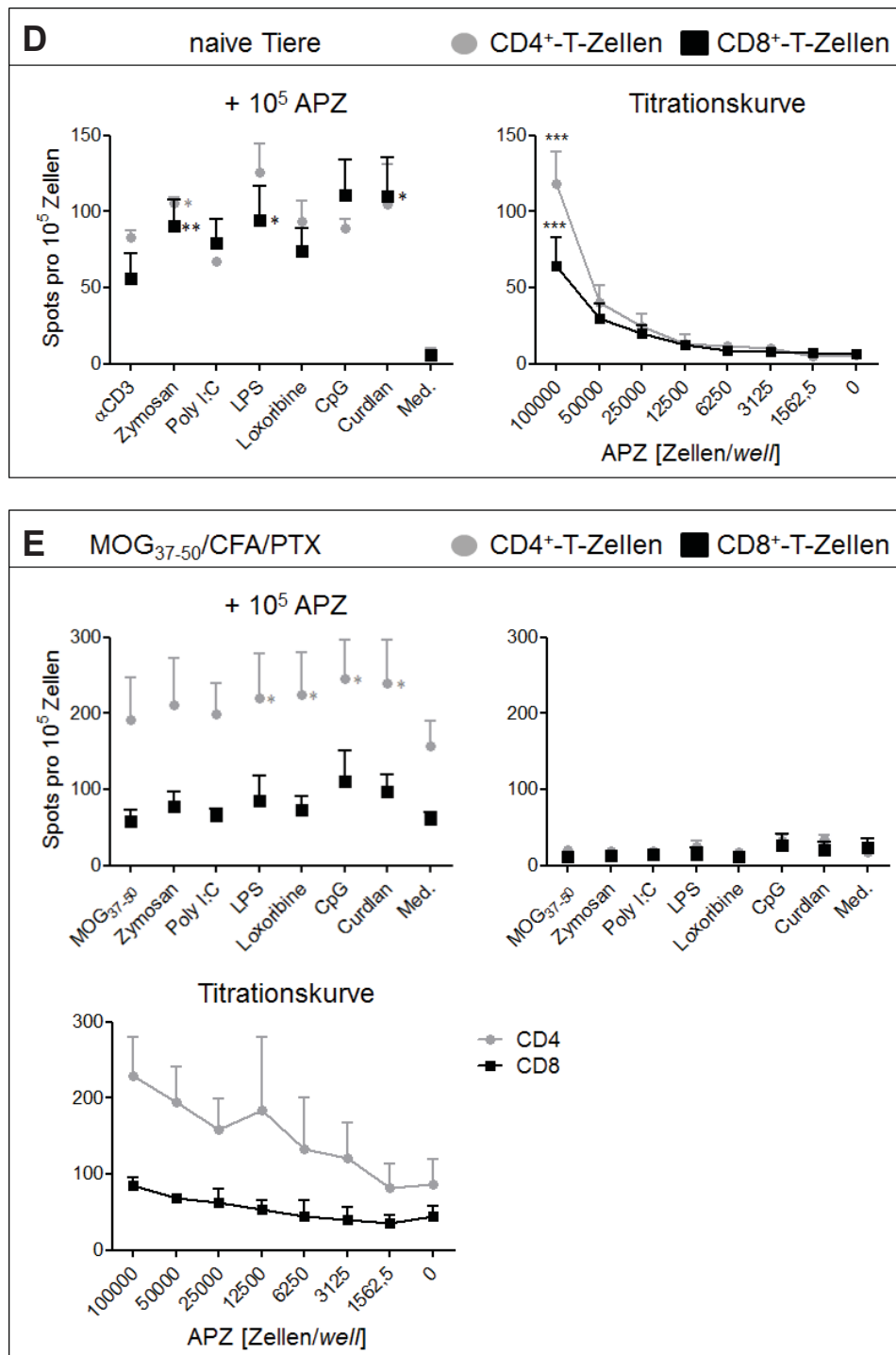


Abb. 4.9: IL-17-Sekretion naiver und MOG₃₇₋₅₀-spezifischer CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen nach Kostimulation mit verschiedenen PAMPs und Zugabe von APZ

Aus Milzen naiver C57BL/6-Mäuse sowie 14 Tage nach MOG₃₇₋₅₀/CFA/PTX-Immunisierung wurden CD4⁺-T-Zellen, CD8⁺-T-Zellen sowie APZ separiert und in Kombination miteinander unter Kostimulation mit den verschiedenen PAMPs kultiviert. Die IL-17-Sekretion αCD3-spezifischer sowie MOG₃₇₋₅₀-spezifischer Zellen wurde mittels ELISpot-Assay analysiert. **A-C:** Je ein repräsentatives Beispiel des ELISpot-Assay nach der Kostimulation (A, B) und der Titrationskurve (C), bestehend aus einer sinkenden Anzahl an APZ, die mit einer konstanten Anzahl αCD3- sowie MOG₃₇₋₅₀-stimulierter CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen kultiviert wurden. **D/E:** Auswertung der ELISpot-Daten. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte ± SEM von insgesamt 4 unabhängigen Experimenten; statistische Auswertung: GraphPad Prism® Software 5.0, Student's t-Test: * = p < 0.05; ** = p < 0.01; *** = p < 0.001).

Eine Titrationskurve bestehend aus einer sinkenden Anzahl an APZ (100.000 bis 0 Zellen), die mit einer konstanten Anzahl an α CD3-stimulierten CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen (100.000 Zellen) kultiviert wurde, wurde ebenfalls angelegt und die IL-17-Sekretion mittels ELISpot-Assay analysiert. Die IL-17-Sekretion beider Zellpopulationen nahm mit sinkender Anzahl APZ ab. Bei einer Zugabe von 100.000 APZ zu den CD4⁺-/CD8⁺-T-Zellen wurden 118,17/64 Spots detektiert, bei 50.000 40,5/29,67 Spots, bei 25.000 24,33/19,67 Spots, bei 12.500 13,33/12,82 Spots, bei 6.250 11,83/8,67 Spots, bei 3.125 10,33/8,33 Spots, bei 1.562,5 4,83/7,33 Spots und bei 0 5,67/6,5 Spots.

MOG₃₇₋₅₀-induzierte EAE (Abb. 4.9 B, C, E):

Die MOG₃₇₋₅₀-induzierte IL-17-Sekretion CD4⁺-T-Zellen wurde durch alle mikrobiellen Pathogene erhöht. Die höchste IL-17-Sekretion CD4⁺-T-Zellen (191,5 Spots nach Restimulation) wurde durch Kostimulation mit CpG (246 Spots) erreicht, danach mit Curdlan (239,75 Spots), Loxoribine (225,13 Spots), LPS (220,5 Spots), Zymosan (210,88 Spots) und Poly I:C (198,5 Spots). Signifikant erhöht wurde die IL-17-Produktion aber nur durch die Kostimulation mit LPS, Loxoribine, CpG und Curdlan. CD8⁺-T-Zellen sezernierten nach Stimulation mit allen Pathogenen verstärkt IL-17, aber nicht signifikant. Der höchste kostimulierende Effekt der IL-17-sezernierenden CD8⁺-T-Zellen (58,13 Spots nach Restimulation) wurde mit CpG (110,25 Spots) detektiert, dann folgten in absteigender Reihenfolge Curdlan (96,38 Spots), LPS (85,5 Spots), Zymosan (76,88 Spots), Loxoribine (72,38 Spots) und Poly I:C (64,75 Spots). Hier wurde allerdings auch ohne Stimulation (Medium) eine höhere IL-17-Sekretion (61,38 Spots) gemessen.

Auch hier sank die IL-17-Sekretion mit abnehmender Anzahl APZ. Bei einer Präsenz von 100.000 APZ wurde eine IL-17-Sekretion der 100.000 CD4⁺-/CD8⁺-T-Zellen von 229,67/84,33 Spots gemessen, bei 50.000 194,67/69 Spots, bei 25.000 158,33/63 Spots, bei 12.500 183,33/53 Spots, bei 6.250 132,33/45 Spots, bei 3.125 120,33/39,67 Spots, bei 1.562,5 81,33/35,67 Spots und bei 0 86,33/45 Spots.

Im Gegensatz zu den naiven T-Zellen konnte aber auch ohne die Zugabe von APZ IL-17 detektiert werden. Der Einfluss der Pathogene wurde aus diesem Grund zusätzlich auf die MOG₃₇₋₅₀-geprimten T-Zellen ohne Zugabe von APZ untersucht. Ohne die Zugabe von APZ konnte insgesamt nur eine geringe Sekretion von IL-17 nach Restimulation mit (20,17/11,75 Spots) detektiert werden, die durch Kostimulation mit CpG (33,17/26,13 Spots) und Curdlan (33,67/20,13 Spots) leicht, aber nicht signifikant erhöht war. Bei den CD4⁺-T-Zellen pendelte die IL-17-Sekretion bei ca. 20 Spots (nach Restimulation) $\pm$ 4 Spots und bei den CD8⁺-T-Zellen bei ca. 12 Spots (nach Restimulation) $\pm$ 3 Spots.

3.1.4.3 Der Einfluss verschiedener PAMPs auf die IL-17-Sekretion MOG₃₇₋₅₀-spezifischer T-Zellen im Zentralnervensystem - Rückenmark

Um den Einfluss der PAMPs auf die IL-17-Sekretion ZNS-infiltrierender T-Zellen innerhalb der MOG₃₇₋₅₀/CFA/PTX-induzierten EAE zu untersuchen, wurden die T-Zellen 14 Tage nach der Immunisierung aus dem Rückenmark isoliert. Pro Versuchsreihe wurden die Rückenmarkszellen dreier Mäuse zusammengefügt und in Kombination mit MOG₃₇₋₅₀ und den verschiedenen PAMPs für 16 h kultiviert. Die IL-17-Sekretion wurde mittels ELISpot-Assays analysiert (Abb. 4.10).

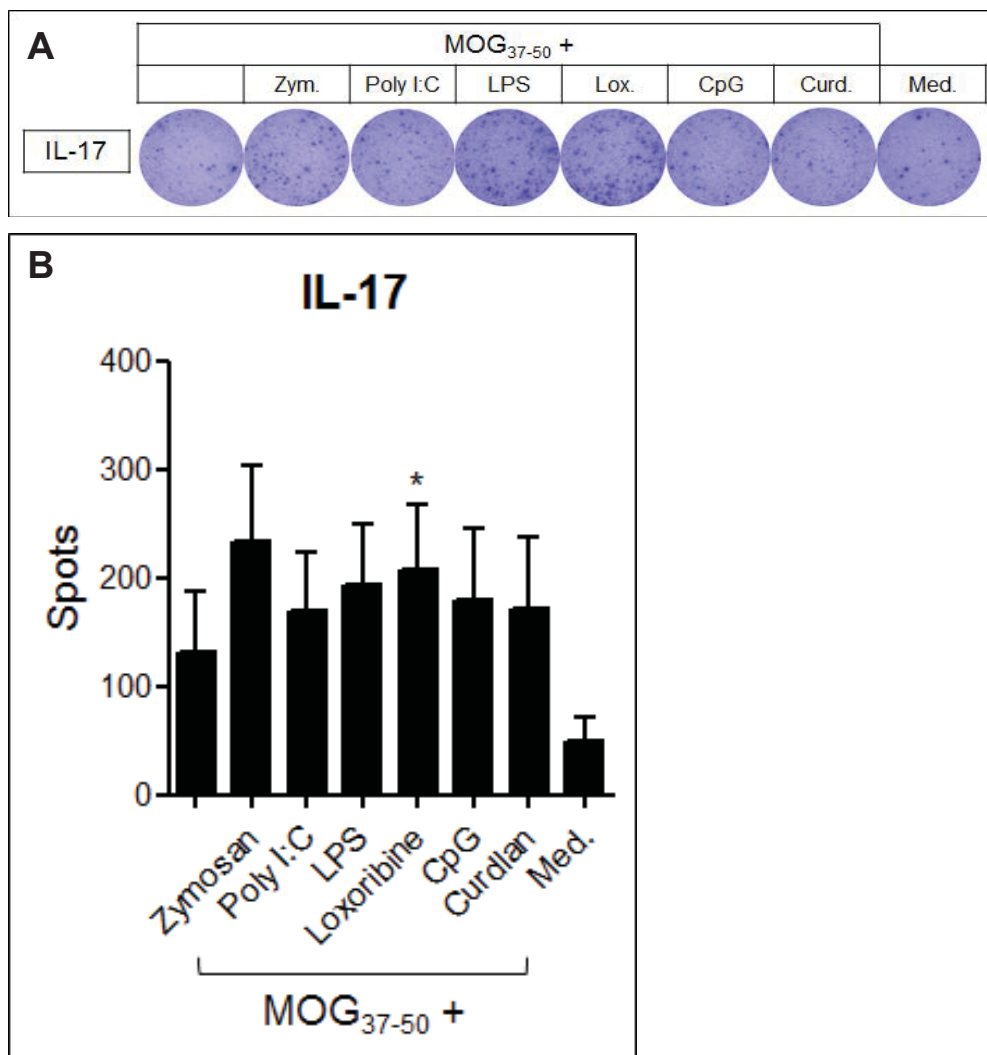


Abb. 4.10: IL-17-Sekretion MOG₃₇₋₅₀-induzierter T-Zellen im Rückenmark nach Stimulation mit verschiedenen PAMPs und analysiert mittels ELISpot-Assay

A: Eine repräsentative Versuchsreihe als Beispiel des ELISpot-Assay. **B:** Die Auswertung der ELISpot-Daten. Dargestellt sind die Mittelwerte $\pm$ SEM von insgesamt 4 unabhängigen Experimenten. Die Zellen jeder Versuchsreihe stammten aus drei zusammengeführten Rückenmarksproben von C57BL/6-Mäusen, 14 Tage nach der EAE-Induktion mit MOG₃₇₋₅₀/CFA/PTX. Diese wurden für 16 h mit MOG₃₇₋₅₀ in Kombination mit verschiedenen PAMPs stimuliert (statistische Auswertung: GraphPad Prism® Software 5.0, Student's t-Test: * = $p < 0.05$).

Alle eingesetzten Stimulanzen wirken kostimulierend auf die IL-17-Sekretion der ZNS-infiltrierenden T-Zellen. Den größten kostimulierenden Effekt auf die MOG-spezifische IL-17-Sekretion (131,63 nach Restimulation) hat Zymosan (234,25 Spots), danach absteigend Loxoribine (207,63 Spots), LPS (192,75 Spots), CpG (178,75 Spots), Curdlan (170,75 Spots) und Poly I:C (168,75 Spots). Signifikant wurde die IL-17-Sekretion jedoch nur durch Kostimulation mit Loxoribine.

Zusammenfassend wurde ohne Restimulation bzw. zusätzlicher Stimulation mit α CD3 zum größten Teil nur die IL-6-Sekretion durch PAMPs beeinflusst. Ein signifikant kostimulierender Effekt aller PAMPs auf die MOG₃₇₋₅₀-induzierte, Curdlan auf die MOG₃₅₋₅₅-induzierte und von Zymosan, Loxoribine sowie LPS auf die ungeprimte IFN- γ Sekretion konnte detektiert werden. Auf die IL-17-sezernierenden Zellen wirken signifikant kostimulierend LPS bei MOG₃₇₋₅₀ und α CD3, Loxoribine und CpG bei MOG₃₅₋₅₅ sowie α CD3 und Curdlan bei MOG₃₅₋₅₅, Zymosan bei α CD3.

Zu den Splenozyten wurde auch der Einfluss der Stimulanzen auf die MOG₃₇₋₅₀-induzierte IL-17-Sekretion der ZNS-infiltrierenden T-Zellen mittels ELISpot-Analyse untersucht. Alle PAMPs induzierten eine Tendenz zur erhöhten IL-17-Sekretion, aber nur mit Loxoribine konnte eine signifikante Steigerung detektiert werden.

Die FACS-Analyse bestätigte den kostimulierenden Effekt von Zymosan, LPS, Loxoribine und CpG auf die MOG₃₇₋₅₀-induzierte IFN- γ -Sekretion der Lymphozyten in der Peripherie. Im Gegensatz zu den ELISpots suppressierte Curdlan die IFN- γ -Sekretion und nur Loxoribine zeigte auf die IL-17-produzierenden Zellen einen leichten stimulierenden Effekt. Die CD4⁺- sowie die CD8⁺-T-Zellen sezernierten nach zusätzlicher Stimulation mit Zymosan, LPS und CpG mehr IFN- γ sowie die CD8⁺-T-Zellen ebenfalls Loxoribine. Auf beiden Zelltypen wirkte Poly I:C suppressierend und auf die CD8⁺-T-Zellen ebenfalls Curdlan. Die IL-17-Sekretion der CD4⁺-T-Zellen wurde erhöht nach Kostimulation mit LPS, Loxoribine und CpG sowie reduziert mit Curdlan und Poly I:C. Im Gegensatz dazu sezernierten die CD8⁺-T-Zellen IL-17 nur erhöht nach LPS, bei allen anderen PAMPs wurde, bis auf CpG, ein negativer Effekt detektiert.

Die MOG₃₅₋₅₅-induzierte IFN- γ -Sekretion wurde nach Kostimulation mit LPS, Loxoribine und Curdlan erhöht. Poly I:C reduzierte auch hier die IFN- γ -Sekretion, ein kostimulierender Effekt auf die IL-17-Sekretion der Lymphozyten konnte nicht detektiert werden. Auf die IFN- γ -Sekretion CD8⁺-T-Zellen wirkten alle PAMPs kostimulierend und auf die CD4⁺-T-Zellen Zymosan, LPS, Loxoribine, CpG und Curdlan. Nach Zugabe von Poly I:C blieb die IFN- γ -Sekretion unverändert. Zymosan, Poly I:C, LPS sowie CpG erhöhten die IL-17-

Sekretion der CD4⁺-T-Zellen und CpG sowie Curdlan reduzierten die Sekretion der CD8⁺-T-Zellen.

Bei den naiven Tieren wurde wie in der ELISpot-Analyse die IFN- γ -Sekretion durch LPS und CpG erhöht. Anstelle von Loxoribine konnte ein kostimulierender Effekt von Zymosan detektiert werden. Poly I:C, Loxoribine und Curdlan wirkten suppressiv auf die IFN- γ -Produktion. Die IL-17-Sekretion blieb nach allen PAMPs nahezu unverändert. Kostimulierend auf die IFN- γ -Sekretion CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen wirkten Zymosan und CpG sowie zusätzlich LPS auf die CD8⁺-T-Zellen. Poly I:C, Loxoribine und Curdlan hatten einen supprimierenden Effekt auf beide Zellpopulationen und LPS noch auf die CD4⁺-T-Zellen. Auf die IL-17-Sekretion der CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen hatten die Pathogene keinen Einfluss auf - bis auf einen stimulierenden Effekt von Zymosan auf die CD4⁺-T-Zellen und einen supprimierenden auf die CD8⁺-T-Zellen.

Nach der Isolierung der Zellen und Zugabe von APZ wurde die α CD3-induzierte IL-17-Sekretion der CD4⁺-T-Zellen durch alle PAMPs bis auf Poly I:C erhöht, aber nur durch Zymosan signifikant. CD8⁺-T-Zellen sezernierten nach Stimulation mit allen PAMPs verstärkt IL-17. Signifikant erhöht wurde die IL-17-Produktion aber nur nach Stimulation mit Zymosan, LPS und Curdlan. Eine Titrationskurve mit variierender Anzahl an APZ und konstanter Anzahl an CD4⁺- bzw. CD8⁺-T-Zellen zeigte, dass die IL-17-Sekretion beider Zellpopulationen mit sinkender APZ-Zahl reduziert wurde.

Die MOG₃₇₋₅₀-induzierte IL-17-Sekretion der CD4⁺-T-Zellen wurde durch alle PAMPs erhöht, signifikant aber nur nach Stimulation mit LPS, Loxoribine, CpG und Curdlan. CD8⁺-T-Zellen zeigten nach Stimulation mit allen Pathogenen eine Tendenz zur erhöhten Sezernierung von IL-17. Auch hier zeigte die APZ-Titrationskurve eine Reduktion der IL-17-Sekretion mit sinkender Anzahl an APZ. Im Gegensatz zu den naiven T-Zellen konnte aber auch ohne die Zugabe von APZ IL-17 detektiert werden. Der Einfluss der Pathogene wurde demnach zusätzlich auf die MOG₃₇₋₅₀-geprimten T-Zellen ohne Zugabe der TLR- bzw. Dectin-1-Agonisten untersucht. Ohne die Zugabe von APZ konnte insgesamt nur eine geringe Sekretion von IL-17 detektiert werden. Diese wurde tendenziell nur durch Stimulation mit CpG leicht erhöht.

4.2 Der Einfluss von Zymosan und CpG auf das Zytokinprofil naiver

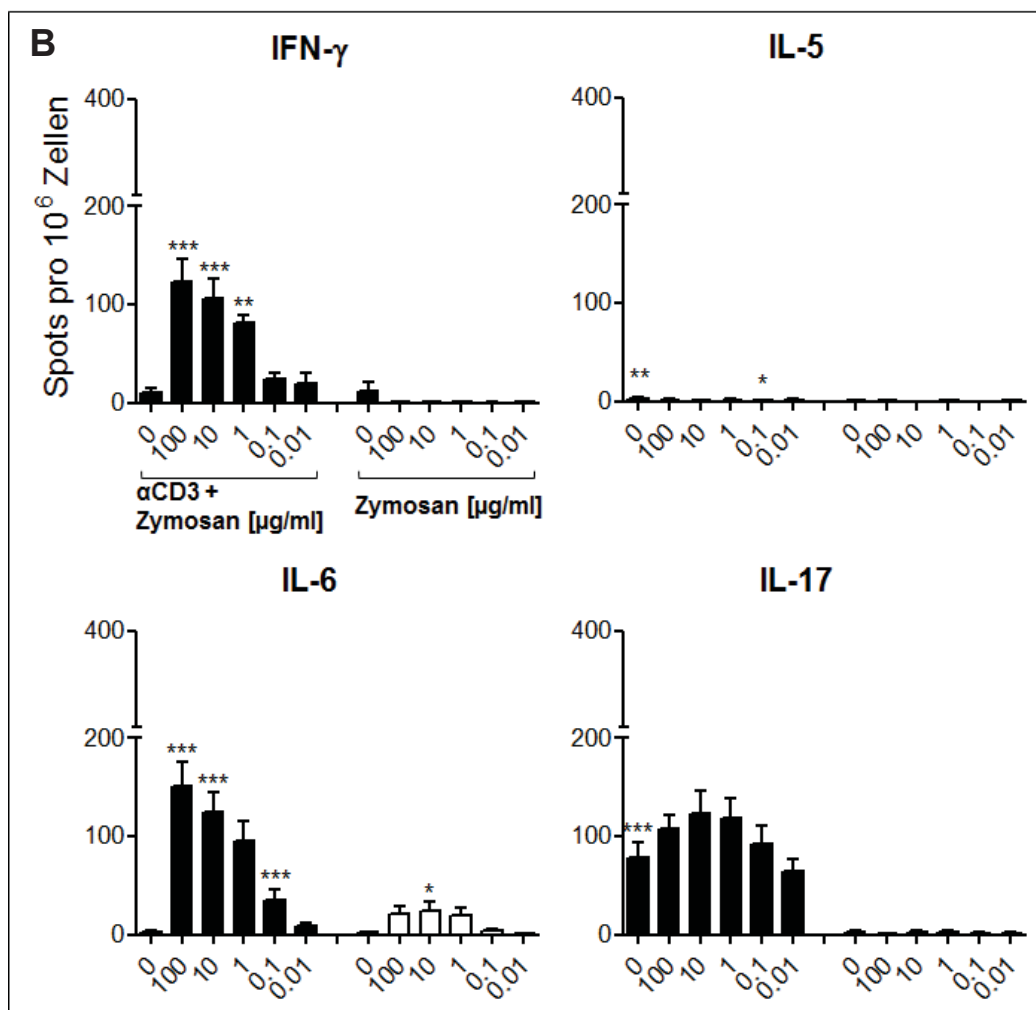
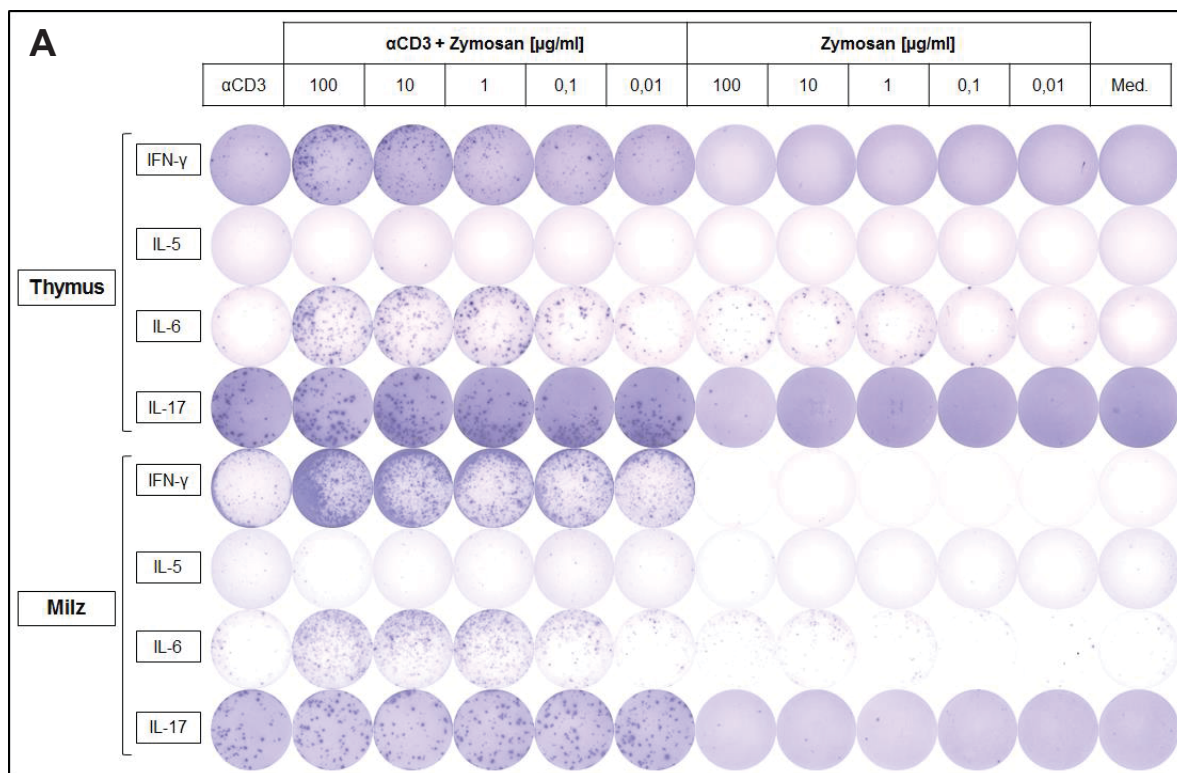
Thymozyten und Splenozyten⁹⁸

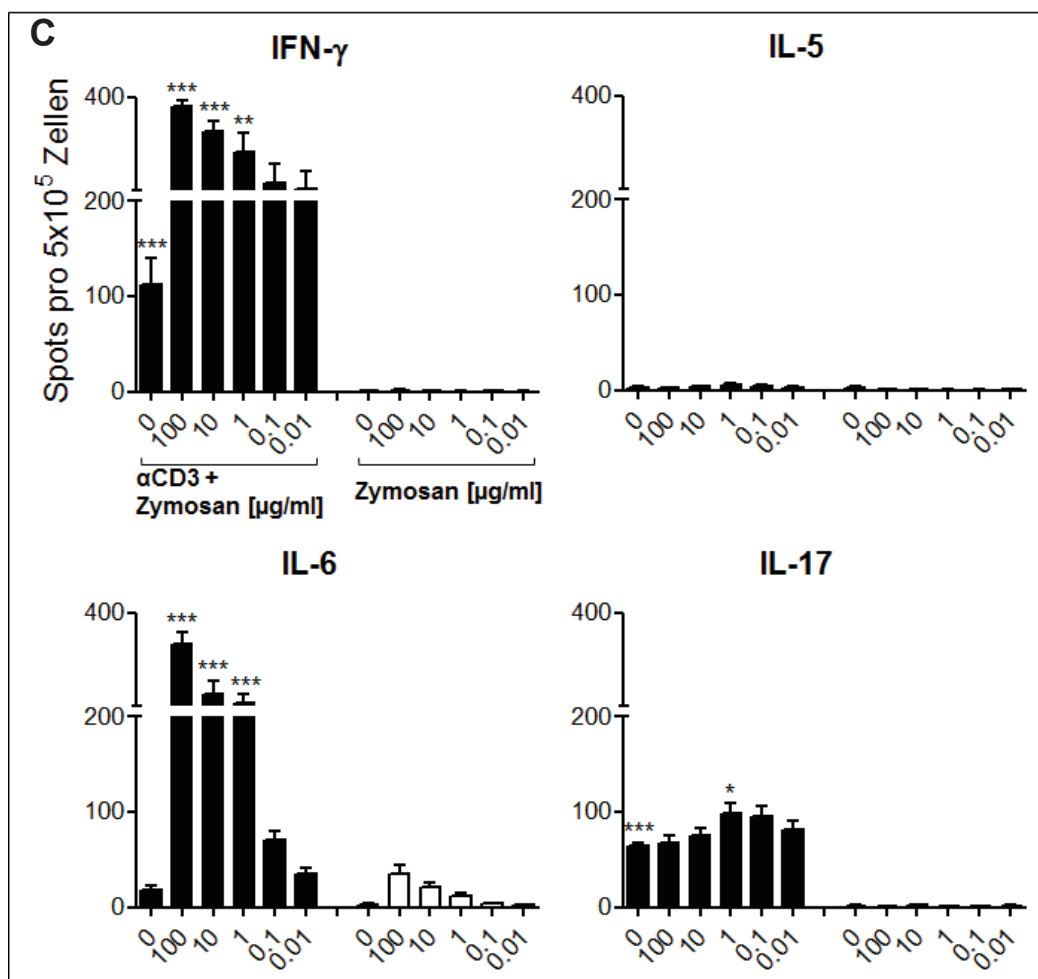
Mit dem Zellwandextrakt der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*, Zymosan, sowie dem unmethylierten CpG-Dinukleotid der bakteriellen DNA können eine fungale bzw. bakterielle Infektion simuliert und komplexe inflammatorische Prozesse ausgelöst werden. In diesem Teil sollte der Einfluss beider TLR-Liganden auf die Zytokinsekretion reifer und unreifer Immunzellen untersucht werden. Thymozyten sowie Splenozyten wurden mit Zymosan (4.3.1) oder CpG (4.3.2) mit und ohne simultane Aktivierung des T-Zell-Rezeptor-Komplex mit α CD3 stimuliert. Um den Einfluss beider PAMPs auf die Zytokinsekretion reifer und unreifer Immunzellen zu untersuchen, wurden Splenozyten sowie Thymozyten mit Zymosan und CpG in unterschiedlichen Konzentrationen stimuliert. Die Zytokinsekretion wurde mittels ELISpot-Assay nach 20 (IFN- γ , IL-6 und IL-17) oder 48 Std. (IL-5) bzw. nach 24 Std. mittels FACS analysiert.

4.2.1 Der Einfluss von Zymosan auf das Zytokinprofil naiver Thymozyten und Splenozyten

Für den ELISpot-Assay wurden jeweils 10^6 Zellen naiver C57BL/6-Mäuse mit je 100, 10, 1, 0,1 und 0,01 μ g/ml Zymosan stimuliert, je mit und ohne α CD3-Stimulation (Abb. 4.11 A-C). Ohne simultane α CD3-Stimulation wurde nur die IL-6-Sekretion (1,94 Spots ohne Stimulation) der Thymozyten mit 10 μ g/ml Zymosan (24,94 Spots) signifikant stimuliert.

Die Stimulation mit α CD3 allein wirkte signifikant auf die IL-17-Sekretion der Thymozyten sowie Splenozyten und zusätzlich auf die IL-5-Sekretion der Thymozyten und IFN- γ der Splenozyten. Alle eingesetzten Konzentrationen von Zymosan haben einen kostimulierenden Effekt auf die IFN- γ -sezernierenden Thymo- und Splenozyten. Die höchste IFN- γ -Frequenz wurde bei beiden Zellpopulationen mit der höchsten Konzentration von Zymosan detektiert. Mit abnehmender Konzentration sank auch zunehmend die IFN- γ -Sekretion der Thymozyten/Splenozyten: 100 μ g/ml: 123,38/379,31 Spots; 10 μ g/ml: 105,88/325,31 Spots; 1 μ g/ml: 81,69/282,31 Spots; 0,1 μ g/ml: 23,69/217,25 Spots; 0,01 μ g/ml: 19,63/204,56 Spots; 0 μ g/ml: 10,75/111,63 Spots. Signifikant kostimulierend auf die α CD3-induzierte IFN- γ Sekretion der Thymozyten sowie Splenozyten waren nur die Konzentrationen 100, 10 und 1 μ g/ml Zymosan. Mit Stimulation sowie mit Kostimulation konnte in allen eingesetzten Konzentrationen nur eine sehr geringe Sekretion von IL-5 beider Zelltypen (Spots < 10) gemessen werden.





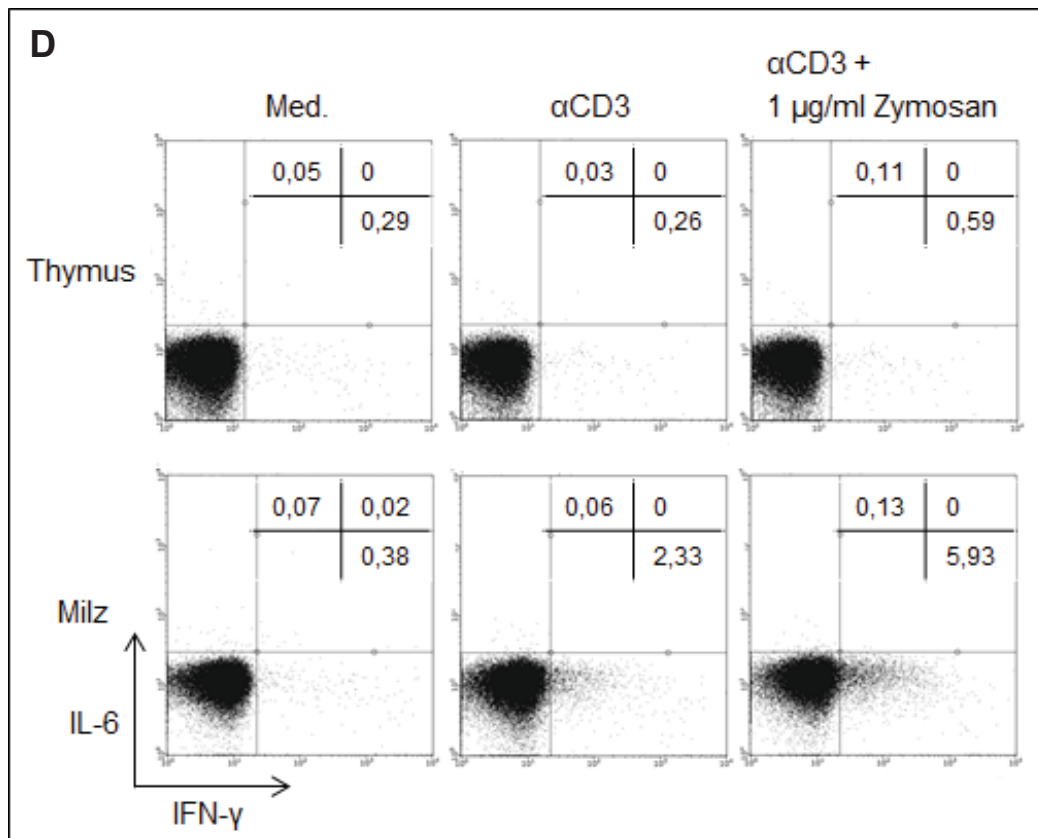


Abb. 4.11: Der Einfluss von Zymosan auf das Zytokinprofil naiver Thymozyten und Splenozyten mit und ohne Aktivierung des T-Zell-Rezeptors mit αCD3

A-C: Je $10^6/5 \times 10^5$ Zellen von C57BL/6-Mäusen wurden für 20 h (IFN- γ , IL-6, IL-17) oder für 48 h (IL-5) 100, 10, 1 0,1 oder 0,01 $\mu\text{g/ml}$ Zymosan mit und ohne Kombination von αCD3 stimuliert und mittels ELISpot-Assay ausgewertet. In **A** ist ein repräsentatives Beispiel des ELISpot-Assay eines Tieres dargestellt, in **B** die Auswertung des ELISpot-Assay der Thymozyten und in **C** der Splenozyten. Gezeigt sind jeweils die Mittelwerte $\pm$ SEM von 8 Tieren in 2 unabhängigen Experimenten (statistische Auswertung: GraphPad Prism® Software 5.0, Student's t-Test: * = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$; *** = $p < 0.001$). **D:** Intrazelluläre FACS-Analyse (IFN- γ und IL-6) der Thymozyten und Splenozyten. Je $2,5 \times 10^6$ Zellen wurden für 24 h mit αCD3 und 1 $\mu\text{g/ml}$ Zymosan stimuliert. Dargestellt ist ein repräsentatives Beispiel der FACS-Analyse. Die Daten sind in Prozent angegeben und die Populationen sind gated auf Lymphozyten > lebende Zellen.

Die IL-6-Sekretion der Thymozyten wurde kostimuliert mit 100, 10 und 0,1 $\mu\text{g/ml}$ Zymosan sowie die Sekretion der Splenozyten mit 100, 10 und 1 $\mu\text{g/ml}$. 0,1 $\mu\text{g/ml}$ Zymosan erhöhten außerdem die IL-5-Sekretion der Thymozyten und 1 $\mu\text{g/ml}$ die IL-17-Sekretion der Splenozyten. Auf die IL-6-Sekretion der Thymo- sowie der Splenozyten haben alle Konzentrationen von Zymosan einen kostimulierenden Effekt. Dabei sinkt die IL-6-Sekretion der Thymo- und Splenozyten mit sinkender Konzentration (Thymozyten / Splenozyten): 100 $\mu\text{g/ml}$: 151,06/333,13 Spots; 10 $\mu\text{g/ml}$: 124,19/225,81 Spots; 1 $\mu\text{g/ml}$: 95,38/205,38 Spots; 0,1 $\mu\text{g/ml}$: 35,5/71,19 Spots; 0,01 $\mu\text{g/ml}$: 8,19/35 Spots; 0 $\mu\text{g/ml}$ (αCD3): 2,5/18,38 Spots. Während eine identische Frequenz für IL-17 und IL-5 detektiert wurde, lag die Frequenz bei

IFN- γ und IL-6 bei den Splenozyten meist mindestens doppelt so hoch wie bei den Thymozyten. Signifikant auf die IL-6-Sekretion der Thymozyten wirkten allerdings nur 100, 10 sowie 0,1 $\mu\text{g/ml}$ Zymosan und auf die der Splenozyten 100, 10, sowie 1 $\mu\text{g/ml}$.

Bis auf 0,01 $\mu\text{g/ml}$ wurde die IL-17-Sekretion der Thymozyten erhöht, aber nicht signifikant. Die IL-17-Sekretion (78,88 Spots nach αCD3 -Stimulation) der Thymozyten stieg zunächst mit sinkender Konzentration Zymosan von 100 (107,5 Spots) auf 10 $\mu\text{g/ml}$ (122,75 Spots, Maximum) Zymosan, danach nahm die Sekretion wieder ab (1 $\mu\text{g/ml}$: 118,81 Spots; 0,1 $\mu\text{g/ml}$ 92,75 Spots) und war bei 0,01 geringer als bei Stimulation mit αCD3 allein (64,63 Spots). Alle Konzentrationen von Zymosan kostimulierten die IL-17-Sekretion der Splenozyten. Auch die IL-17-Sekretion (63,94 Spots nach αCD3 -Stimulation) der Splenozyten stieg zunächst mit sinkender Konzentration von Zymosan (100 $\mu\text{g/ml}$: 66,94 Spots; 10 $\mu\text{g/ml}$: 75,18 Spots), erreichte die höchste Sekretion bei 1 $\mu\text{g/ml}$ (98,88 Spots, signifikant) und sank wieder mit abnehmender Zymosankonzentration (0,1 $\mu\text{g/ml}$: 95,19 Spots; 0,01 $\mu\text{g/ml}$: 81,94 Spots). Der kostimulierende Effekt von Zymosan auf die IFN- γ -Sekretion wurde durch die FACS-Analyse (20 h nach Kostimulation) unterstützt (Abb. 4.11 D). Die IFN- γ -Sekretion der Thymozyten wurde nur leicht nach Kostimulation mit αCD3 und 1 $\mu\text{g/ml}$ Zymosan erhöht. Im Gegensatz dazu stieg der prozentuale Anteil IFN- γ -sezernierender Zellen nach αCD3 -Stimulation um fast 2 % und verdoppelte sich nach Kostimulation mit Zymosan. Die Erhöhung der IL-6-Sekretion nach der Kostimulation konnte mittels FACS-Analyse nicht nachgewiesen werden.

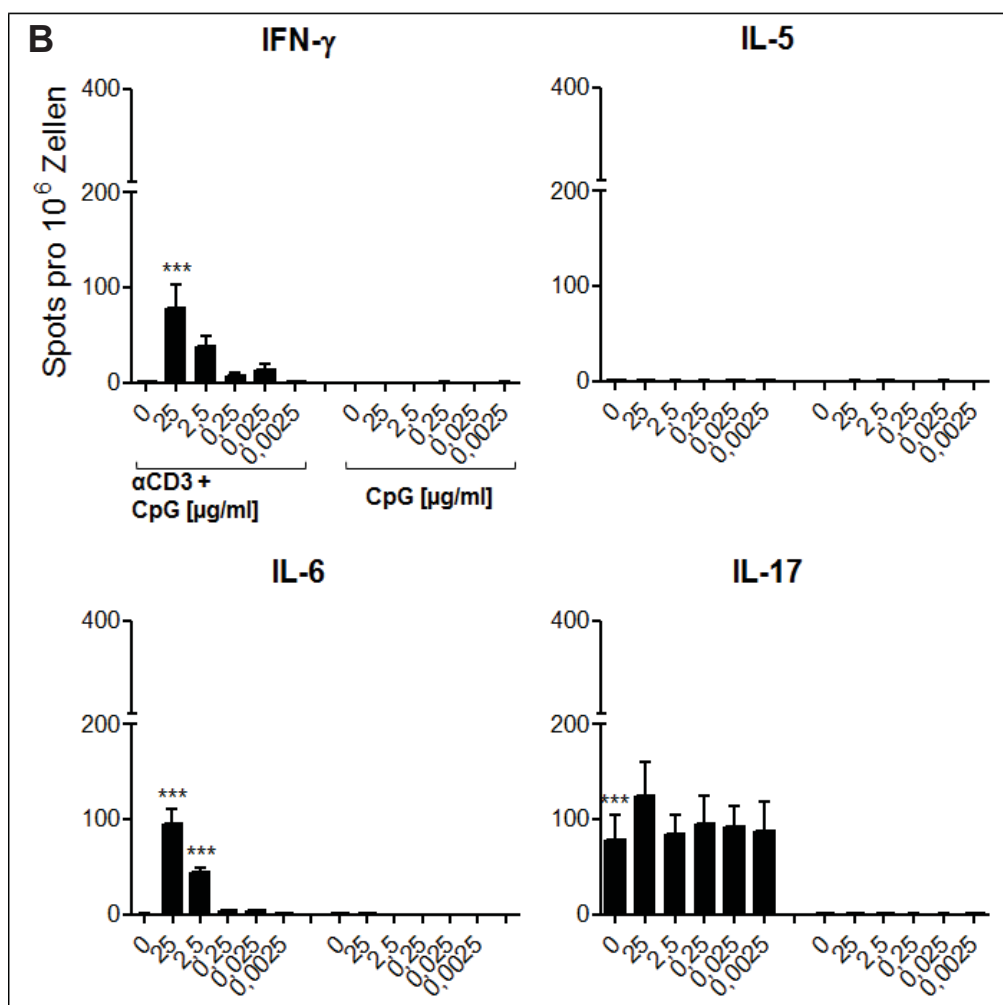
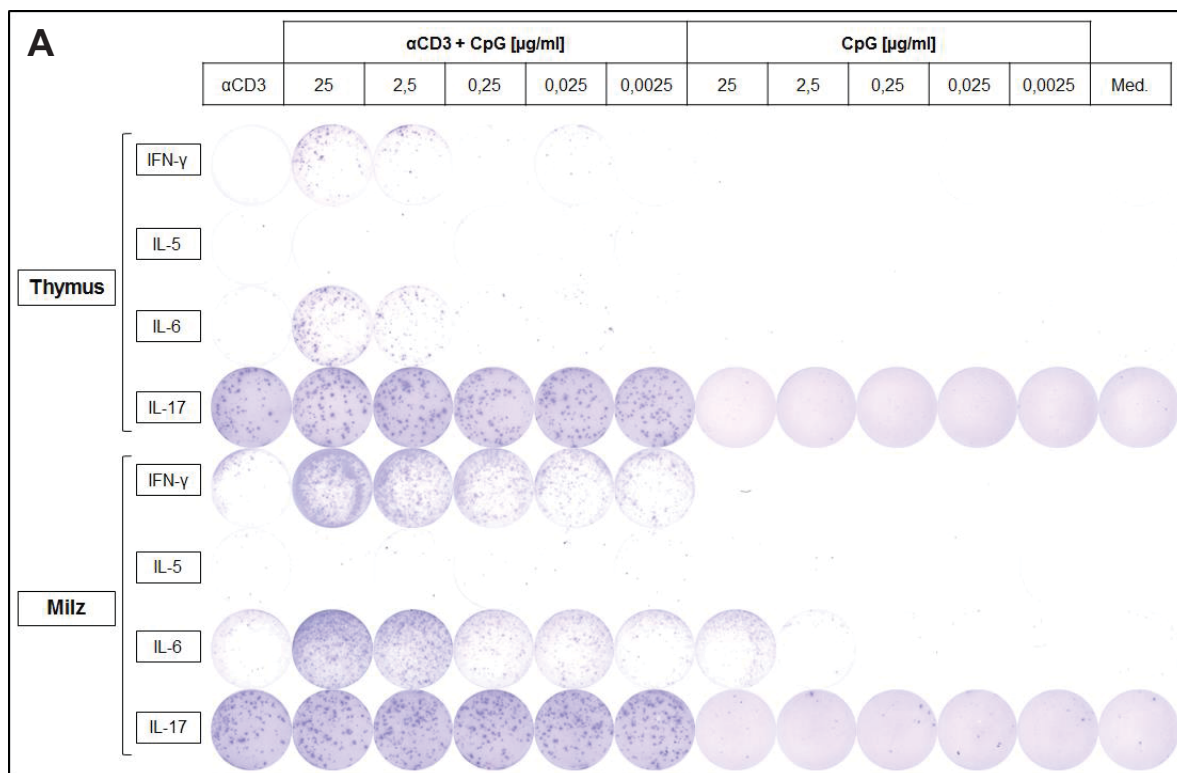
4.2.2 Der Einfluss von CpG auf das Zytokinprofil naiver Thymozyten und Splenozyten

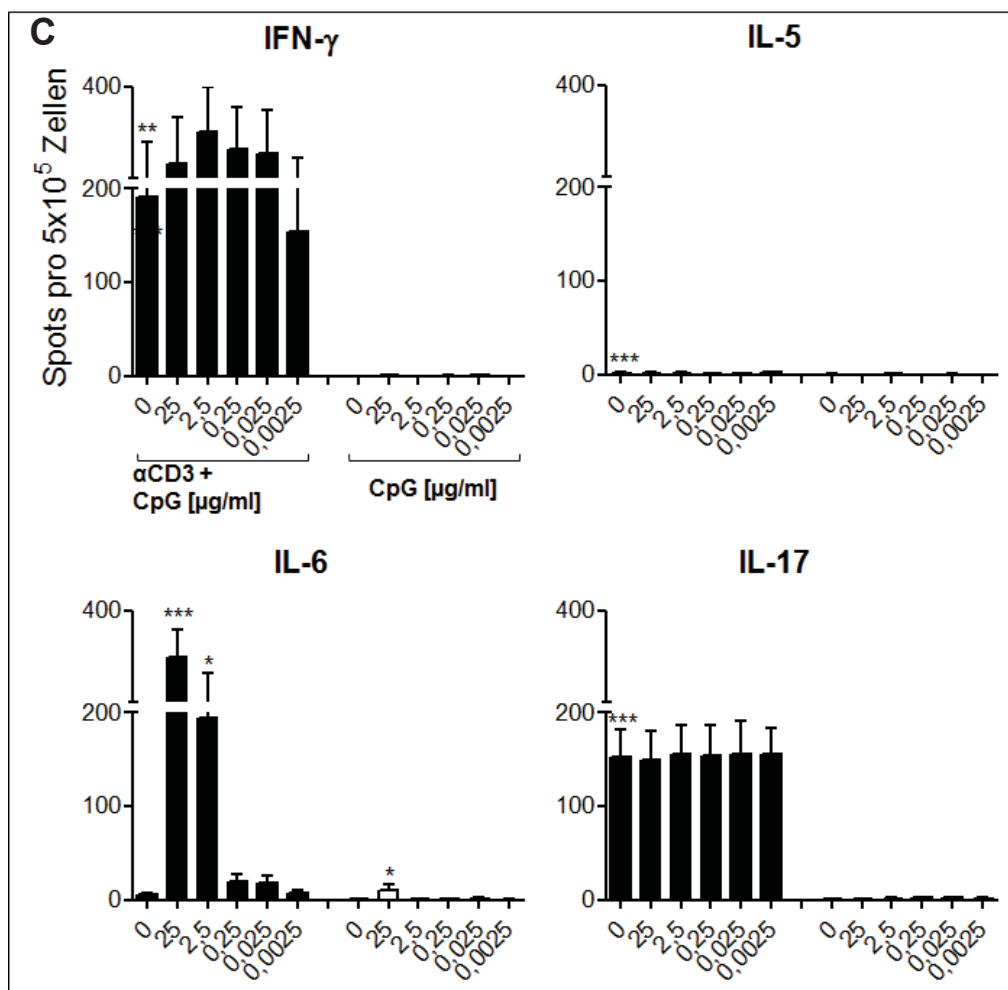
Um den Einfluss von CpG auf die Thymozyten und Splenozyten naiver C57BL/6-Mäuse zu untersuchen, wurden bei dem ELISpot-Assay jeweils 10^6 Zellen mit je 25, 2,5, 0,25, 0,025 und 0,0025 $\mu\text{g/ml}$ CpG stimuliert (Abb. 4.12).

Signifikant wurde nur die IL-6-Sekretion der Splenozyten mit 25 $\mu\text{g/ml}$ stimuliert.

Auf die αCD3 -induzierte IFN- γ -Sekretion der Thymozyten und Splenozyten wirkten alle Konzentrationen von CpG bis auf 0,0025 $\mu\text{g/ml}$ CpG. Die höchste IFN- γ -Sekretion der Thymozyten (1,25 Spots nach αCD3 -Stimulation) wurde bei 25 $\mu\text{g/ml}$ detektiert (78,5 Spots, signifikant), danach absteigend mit der Konzentration von CpG: 2,5 $\mu\text{g/ml}$: 38,5 Spots; 0,25 $\mu\text{g/ml}$: 7,13 Spots; 0,025 $\mu\text{g/ml}$ 12,63 Spots (0,0025 $\mu\text{g/ml}$: 1 Spot). Die IFN- γ -Sekretion der Splenozyten stieg zunächst bei 25 $\mu\text{g/ml}$ (230,63 Spots) auf 2,5 $\mu\text{g/ml}$ CpG (300,13 Spots), danach sank die Sekretion mit abnehmender CpG-Konzentration (0,25 $\mu\text{g/ml}$: 262,63 Spots; 0,025 $\mu\text{g/ml}$: 254,13 Spots) und war bei Kostimulation mit 0,0025 $\mu\text{g/ml}$ CpG geringer

als bei α CD3-Stimulation. Nahezu bei 0 lag die α CD3-induzierte IL-5-Sekretion nach Stimulation und Kostimulation sowie bei beiden Zelltypen (Spots < 5). Alle Konzentrationen hatten einen kostimulierenden Effekt auf die IL-6-Sekretion. Die höchste Kostimulation von IL-6 der Thymozyten / Splenozyten (0,25/5,38 Spots nach α CD3-Stimulation) erreichten 25 μ g/ml (95,63/297,25 Spots), danach 2,5 μ g/ml (44,75/193,88 Spots), beide signifikant. Bei niedrigeren Konzentrationen war nur noch eine geringe Steigerung der IL-6-Sekretion ersichtlich (0,25 μ g/ml: 3,63/19,13 Spots; 0,025 μ g/ml: 3,75/17,75 Spots; 0,0025 μ g/ml: 0,38/6,88 Spots). Alle Konzentration von CpG kostimulierten die IL-17-Sekretion der Thymozyten. Die höchste Frequenz der IL-17-sezernierenden Thymozyten (78,38 Spots nach α CD3-Stimulation) wurde nach Kostimulation mit 25 μ g/ml CpG (125,25 Spots) gemessen, danach mit 0,25 μ g/ml (95,88 Spots), 0,025 μ g/ml (92,5 Spots) 0,0025 μ g/ml (87,25 Spots) und 2,5 μ g/ml CpG (84 Spots). Nahezu keinen Einfluss hatte CpG auf die IL-17-Sekretion der Splenozyten, die Frequenz blieb unverändert (um 150 Spots). Die Stimulation mit α CD3 allein resultierte in einer signifikanten Erhöhung der IL-17-Sekretion bei den Thymozyten sowie Splenozyten und IFN- γ sowie IL-5 bei den Splenozyten. Auch hier lag die Frequenz von IFN- γ und IL-6 bei den Splenozyten meist doppelt so hoch wie bei den Thymozyten, während bei IL-17 und IL-5 eine identische Frequenz detektiert wurde. Die intrazelluläre FACS-Analyse unterstützt den kostimulierenden Effekt von CpG auf die IFN- γ -Sekretion (Abb. 3.17 D). Die IFN- γ -Sekretion der Splenozyten wurde um 3,1 % erhöht und bei den Thymozyten konnte eine leichte Erhöhung von 0,6 % detektiert werden. Die Erhöhung der IL-6-Sekretion nach der Kostimulation konnte mittels FACS-Analyse nicht nachgewiesen werden.





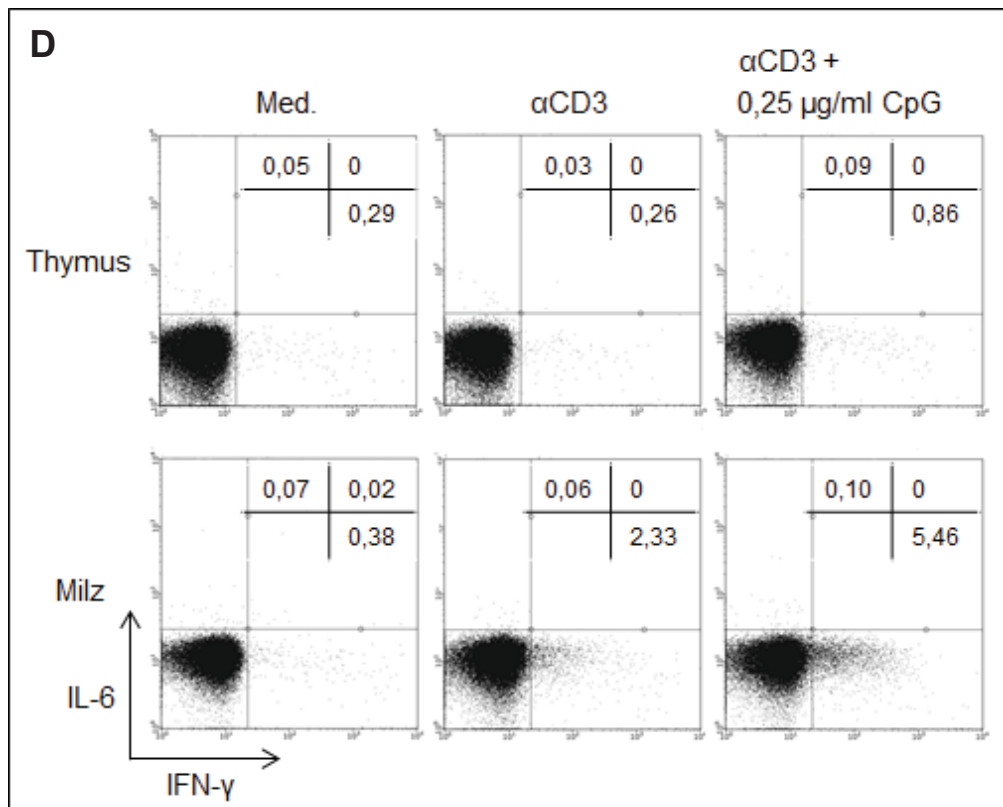


Abb. 4.12: Der Einfluss von CpG auf das Zytokinprofil naiver Thymozyten und Splenozyten mit und ohne Aktivierung des T-Zell-Rezeptors mit α CD3

A-C: Je 10^6 Zellen von C57BL/6-Mäusen wurden für 20 h (IFN- γ , IL-6, IL-17) oder für 48 h (IL-5) 25, 2,5, 0,25 0,025 oder 0,0025 μ g/ml CpG mit und ohne Kombination von α CD3 stimuliert und mittels ELISpot-Assay ausgewertet. In **A** ist ein repräsentatives Beispiel des ELISpot-Assay eines Tieres dargestellt, in **B** die Auswertung des ELISpot-Assay der Thymozyten und in **C** der Splenozyten. Gezeigt sind jeweils die Mittelwerte $\pm$ SEM von 8 Tieren in 2 unabhängigen Experimenten (statistische Auswertung: GraphPad Prism® Software 5.0, Student's t-Test: * = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$; *** = $p < 0.001$). **D:** Intrazelluläre FACS-Analyse (IFN- γ und IL-6) der Thymozyten und Splenozyten. Je $2,5 \times 10^6$ Zellen wurden für 24 h mit α CD3 und 0,25 μ g/ml CpG stimuliert. Dargestellt ist ein repräsentatives Beispiel der FACS-Analyse. Die Daten sind in Prozent angegeben und die Populationen sind gated auf Lymphozyten > lebende Zellen.

4.2.3 Der Einfluss von Zymosan auf das Zytokinprofil der antigenspezifischen T-Zell-vermittelten Immunantwort

Um den Einfluss von Zymosan auf das Zytokinprofil antigenspezifischer T-Zell-vermittelter Immunantwort zu untersuchen, wurde in weiblichen SJL/J-Mäusen eine akute EAE induziert. 14 Tage nach der Injektion von PLPp₁₃₉₋₁₅₁/CFA/PTX wurden die Splenozyten isoliert und die Zytokinsekretion mittels ELISpot-Assay analysiert (Abb. 4.13).

Bis einschließlich Tag 8 nach der Immunisierung konnten keine klinischen Symptome bei den Tieren beobachtet werden (Abb. 4.13 A). Danach traten bei vereinzelt Tieren erste Symptome auf, der mittlere Score der PLPp-induzierten EAE betrug an Tag 10 2,1. Im weiteren Krankheitsverlauf entwickelten weitere Tiere Symptome, die sich noch dazu im weiteren Krankheitsverlauf verschlimmerten. Der mittlere Score stieg an Tag 12 auf 3 und am Ende des Experiments an Tag 14 auf 3,1.

Für den ELISpot-Assay wurden jeweils 5×10^5 Zellen mit 20 µg/ml PLPp und/oder mit 0,1 µg/ml Zymosan für 20/48 h stimuliert (Abb. 4.13 B, C).

Zymosan hatte einen stimulierenden (Medium: 0,79 Spots; Zymosan: 11,04 Spots) und kostimulierenden Effekt auf die PLPp-induzierte IFN-γ-Sekretion (PLPp: 51,04 Spots; PLPp+Zymosan: 104,08 Spots), jeweils aber nicht signifikant. Auch die IL-6-Sekretion wurde durch Zymosan stimuliert (Medium: 72,13 Spots; Zymosan: 98,75 Spots) und (signifikant) kostimuliert (PLPp: 98,25 Spots; PLPp+Zymosan: 124,25 Spots) sowie die IL-17-Produktion (Medium: 4,79 Spots; Zymosan: 7,46 Spots/PLPp: 30,5; 47,88 Spots).

Die Frequenz von IL-5 ist sehr gering (ca. 5 Spots), durch Zymosan wird die PLPp-induzierte IL-5-Sekretion (5,21 Spots) signifikant reduziert (2,5 Spots).

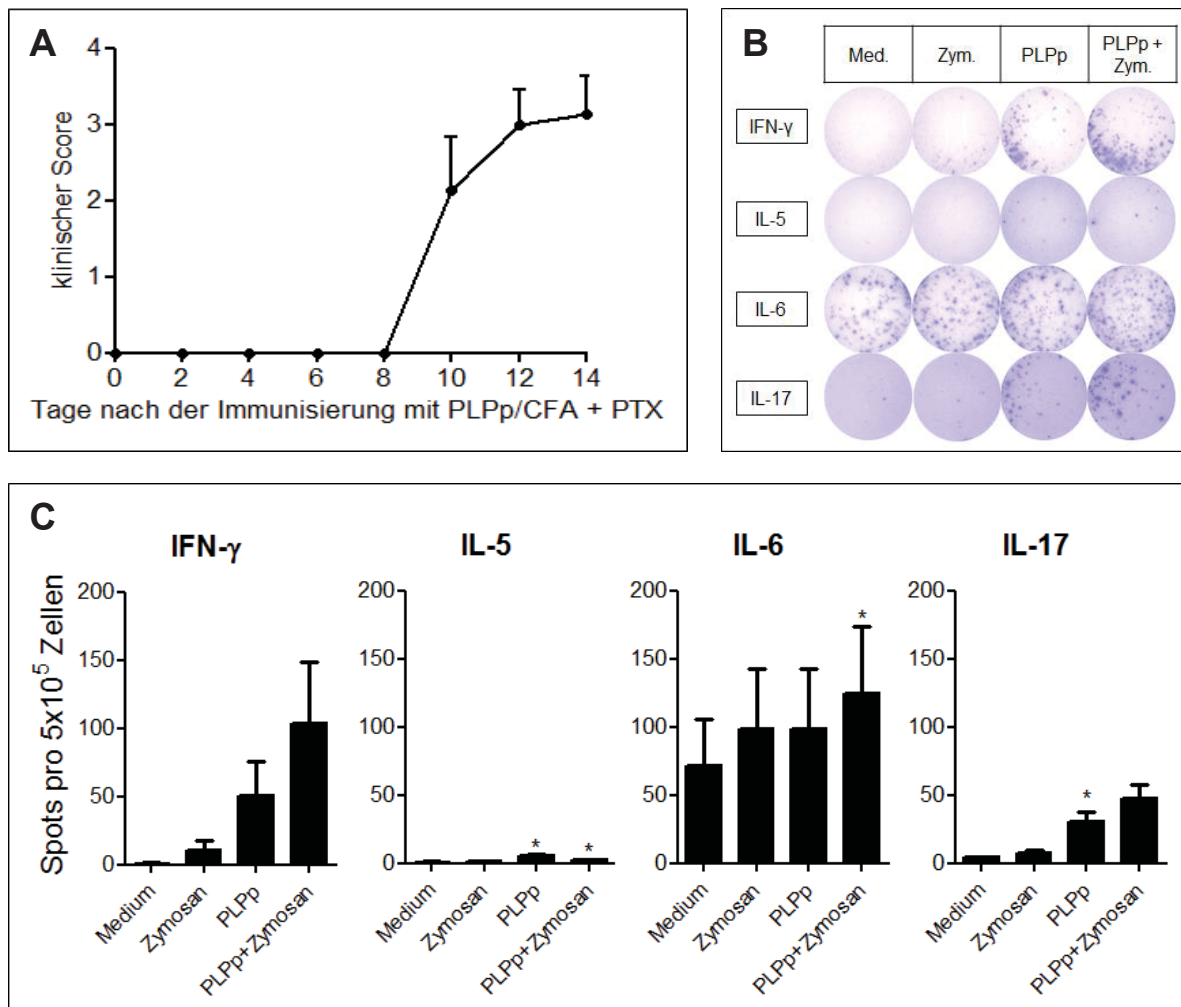


Abb. 4.13: Der Einfluss von Zymosan auf das Zytokinprofil antigenspezifischer T-Zell-vermittelter Immunantwort

A: klinischer EAE Score. Der klinische Krankheitsverlauf weiblicher SJL/J-Wildtyp-Mäuse mit PLPp₁₃₉₋₁₅₁-induzierter EAE. Der Schweregrad der auftretenden Lähmungserscheinungen im EAE-Verlauf wurde täglich ermittelt und jedem Tier ein Score zugeordnet: keine Symptome = 0; partielle Schwanzparese = 0,5; vollständige Schwanzparese = 1; Herabsetzen des Hinterleibs = 1,5; Ataxie, watschelnder Gang = 2; unilaterale Hinterlaufparese = 2,5; bilaterale Hinterlaufparese = 3; bilaterale Hinterlaufparese und Vorderlaufschwäche 3,5; Tetraparese (Abbruchkriterium) = 4; moribund = 5; (n = 4). **B/C** Ein repräsentatives Beispiel des ELISpot-Assay eines Tieres (B) und die Auswertung des ELISpot-Assay. Die Splenozyten wurden 14 Tage nach der Immunisierung isoliert und je 5×10^5 Zellen für 20/48 h mit PLPp und/oder Zymosan stimuliert. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte $\pm$ SEM von 4 Tieren.

5 Diskussion

Die vorliegende Arbeit umfasst die Charakterisierung von IL-17-sezernierenden T-Zell-Populationen in verschiedenen Typen des murinen Tiermodells (EAE) der Autoimmunerkrankung MS. In den EAE-Modellen wurde ein Zytokinprofil ausgewählter Zytokine von CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen in der Peripherie sowie im ZNS zu verschiedenen Zeitpunkten innerhalb des fortschreitenden Krankheitsverlaufs erstellt. Um den Einfluss einer Infektion auf den Krankheitsverlauf zu untersuchen, wurde eine systematische Infektion durch Zugabe verschiedener mikrobieller Pathogene imitiert und ebenfalls das Zytokinprofil von geprimten sowie ungeprimten T-Zellen charakterisiert.

5.1 Die Charakterisierung von IL-17-sezernierenden T-Zell-Populationen in der MOG₃₇₋₅₀- und MOG₃₅₋₅₅-induzierten EAE und der Einfluss von PAMPs⁸²

5.1.1 Etablierung der MOG₃₇₋₅₀-induzierten EAE und das IL-17-Zytokinprofil im Verlauf der MOG₃₇₋₅₀- und MOG₃₅₋₅₅-induzierten EAE

MS ist eine chronisch neuroinflammatorische Erkrankung des ZNS, die durch eine Infiltration von Lymphozyten hervorgerufene Schädigung des Myelins und Axonen verursacht wird⁹⁹. Im Laufe der Zeit konnten abhängig von verschiedenen Faktoren wie Tierspezies und injiziertem Antigen pathophysiologisch unterschiedliche Tiermodelle der MS entwickelt werden. Besonders das murine Tiermodell der EAE - induziert durch Immunisierung mit einem Myelinautoantigen in CFA - ist ein fester Bestandteil innerhalb der MS-Forschung geworden. MOG, lokalisiert an der äußeren Myelinscheide, ist ein Ziel der autoreaktiven T-Zellantwort und eine Immunisierung mit diesem Peptid induziert eine chronische Verlaufsform der EAE⁸¹. Neben einer aktiven Induktion kann eine EAE auch passiv durch adoptiven Transfer von myelinspezifischen CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen induziert werden, was bei beiden Zellpopulationen eine Schlüsselrolle in der Krankheitsentstehung impliziert¹⁰⁰. Dabei sind CD8⁺-T-Zellen, obwohl diese auch in Läsionen von MS-Patienten nachgewiesen werden konnten, nicht so gut erforscht wie CD4⁺-T-Zellen⁵². IL-17, produziert von CD4⁺- sowie CD8⁺-T-Zellen, ist ein potentes proinflammatorisches Zytokin, das ebenfalls mit der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen wie MS oder dem Tieräquivalent EAE in Zusammenhang gebracht wurde¹⁰¹. Um die Rolle der T_C17 in der EAE zu untersuchen, wurden T-Zell-Populationen und ihr Zytokinmuster aus Peripherie und

ZNS einer MOG₃₇₋₅₀- mit einer MOG₃₅₋₅₅-induzierten EAE in verschiedenen Krankheitsstadien miteinander verglichen. In der C57BL/6-Maus handelt es sich bei MOG₃₅₋₅₅ um das immundominante Epitop für CD4⁺-T-Zellen, bei dem MOG₃₇₋₅₀-Modell um eine EAE, bei der peptidspezifische CD8⁺-T-Zellen an der EAE-Induktion beteiligt sind^{81,102}. In diversen Studien konnte demonstriert werden, dass eine EAE auch durch Immunisierung mit MOG₃₇₋₅₀ oder MOG₃₇₋₄₆ (verkürzten Formen des 21 Aminosäuren langen MOG₃₅₋₅₅-Peptids sowie ohne vorhandenes CD4⁺-T-Zell-Epitop) induziert werden kann^{81,103}.

Innerhalb beider EAE-Modelle wurde ein chronisch progressiver Krankheitsverlauf mit einem Krankheitsausbruch um Tag 9, einem Peak zwischen Tag 14 und 16, einer darauffolgenden Erholungsphase sowie einer zweiten Krankheitsperiode um Tag 50 induziert. In der zweiten Krankheitsperiode der EAE verschlimmerten sich die Symptome erneut und vereinzelt wurden Tiere mit Symptomen beobachtet, die zuvor keine aufwiesen. Innerhalb beider EAE-Modelle kam es wahrscheinlich zu einer neuen Welle an autoaggressiven T-Zellen, die zu einem Krankheitsrückfall bzw. zu einer Schädigung führten oder die - im Gegensatz zur ersten Krankheitsperiode - erste klinische Symptome verursachten. Bei chronischen Erkrankungen kommt es zu einem sogenannten *Epitope Spreading*, was innerhalb des EAE-Modells als Entstehung neuer autoaggressiver T-Zellen beschrieben wurde¹⁰⁴. Diese T-Zellen können spezifisch für ein neues Epitop aus demselben Molekül (intramolekulares Epitop) oder aus anderen Proteinen des ZNS (intermolekulares Epitop) stammen^{105,106}. Nach Immunisierung von SJL-Mäusen mit PLPp₁₃₉₋₁₅₁ wurde bspw. das Auftreten neuer T-Zell-Epitope, PLPp₁₇₈₋₁₉₁ (intramolekulares *Epitope Spreading*) und MBP₈₄₋₁₀₄ (intermolekulares *Epitope Spreading*), beschrieben, die für den Schub bzw. Krankheitsrückfall nach einer ersten sowie zweiten Phase der Remission (ca. 40 und ca. 55 Tage nach Induktion) verantwortlich gemacht wurden¹⁰⁴.

Das mittels ELISpot-Analyse erstellte Zytokinprofil zeigte, dass eine Antigen-Restimulation zu einer höheren Sekretion aller Zytokine gegenüber der Mediumkultur und zu einer niedrigeren Sekretion gegenüber der Aktivierung der Zellen via CD3/TZR-Komplex (mit α CD3) führte. Während des gesamten Krankheitsverlaufs - und wie bei den Zellen aus naiven Tieren - war nahezu keine Sekretion des antiinflammatorischen Zytokins IL-5 zu messen. Bei IL-6, einem wichtigen Mediator systemischer Inflammationen, wurde bis auf die starke Reduktion an Tag 14 ein nahezu konstantes Level gemessen. Das Zytokinprofil der proinflammatorischen Zytokine IL-17 und IFN- γ innerhalb des fortschreitenden Krankheitsverlaufs impliziert eine Beteiligung im Inflamationsprozess innerhalb des ZNS

und in der Entstehung der EAE. In der Peripherie war die Anzahl IFN- γ - und IL-17-sezernierender Zellen beider MOG-Modelle an Tag 8, vor Ausbruch der ersten Symptome (wenn MOG-spezifische T-Lymphozyten aktiviert werden), am höchsten. Im ZNS des MOG₃₇₋₅₀-Modells konnte zu diesem Zeitpunkt keine Sekretion von IFN- γ und nur eine leichte Sekretion von IL-17 gemessen werden. Die aktivierten T-Zellen migrieren im Anschluss über die Blut-Hirn-Schranke ins ZNS. Dieses wird in dem Zytokinmuster (Abb. 4.2) reflektiert, das Level IFN- γ - und IL-17-sezernierender Zellen verlagert sich von der Peripherie ins Zielorgan. Dort werden die Effektorzellen durch lokale, infiltrierte APZ-präsentierte Selbstantigene reaktiviert^{63,82}. Peak der klinischen Krankheitskurve in der ersten Periode innerhalb des MOG₃₇₋₅₀-induzierten Modells, zwischen Tag 14 und 16, war gleichzeitig Peak der Sekretion von IFN- γ und IL-17 im ZNS. Die qPCR unterstützte die ELISpot-Daten einer erhöhten Präsenz von IL-17 im Rückenmark während des Peaks der MOG₃₇₋₅₀-induzierten EAE. Die Expression von IL-17 war 15 Tage nach der Immunisierung verglichen mit naiven Tieren 343-fach erhöht. Wahrscheinlich wurde dabei nicht nur die Expression von IL-17 gesteigert, sondern ebenfalls die Anzahl migrierter IL-17-sezernierender Zellen. Immunhistochemische Untersuchungen könnten bspw. Aufschluss darüber geben, ob sowohl die Expression als auch die migrierten IL-17-sezernierenden Zellen zunehmen - und darüber hinaus, wo die Zellen im ZNS lokalisiert sind. In der Peripherie war zu diesem Zeitpunkt die Sekretion beider Zytokine in beiden EAE-Modellen stark reduziert. 35 Tage nach der Immunisierung, kurz vor dem Ausbruch der zweiten Krankheitsperiode, konnte in der Peripherie ein erneuter, leichter Anstieg der MOG-spezifischen Sekretion beider Zytokine gemessen werden. Dies unterstützt die Annahme eines *Epitope Spreading* bzw. die Bildung neuer autoaggressiver T-Zellen innerhalb der progredienten EAE. Besonders der quantitative Unterschied der Sekretion proinflammatorischer Zytokine nach Restimulation mit dem jeweiligen MOG-Peptid gegenüber des TZR-Stimulus lässt darauf schließen. Am letzten Versuchstag, Tag 56, sank die Zytokinproduktion wieder und in der Peripherie wurde die niedrigste Frequenz gemessen.

Die FACS-Daten (Abb. 4.3) beider EAE-Modelle unterstützten die unterschiedlich ausgeprägte Sekretion beider Zytokine im Verlauf der fortschreitenden EAE in der Peripherie (besonders die Sekretionsreduktion von Tag 8 auf Tag 14) und zeigen, dass CD4⁺- sowie CD8⁺-T-Zell-Populationen ihren Zytokinphänotyp simultan ändern. Dabei waren, unabhängig vom verwendeten Epitop, zu jedem Zeitpunkt der EAE die CD4⁺-T-Zellen die hauptproduzierende Zellpopulation in der Peripherie. Der prozentuale Anteil an zytokinsezernierenden CD4⁺-T-Zellen beider EAE-Modelle lag im gesamten Zeitraum

doppelt so hoch wie der Anteil der CD8⁺-T-Zellen. Auch das periphere T-Zell-Repertoire bestand insgesamt zu allen Zeitpunkten aus einem doppelt so hohen Anteil CD4⁺-T-Zellen.

Insgesamt wurde mit beiden MOG-Modellen eine EAE induziert, deren Ausbruch und Peak sich um einen Tag unterschied. Es konnte ein fast identisches Zytokinprofil für IL-17 und IFN- γ im progressiven Krankheitsverlauf erstellt werden. Der klinische Peak der Krankheit entsprach dem Peak der Sekretion im ZNS und gleichzeitig dem Tiefpunkt beider proinflammatorischen Zytokine in der Peripherie. Dies impliziert eine relevante Rolle von IFN- γ und IL-17 im progressiven Autoimmunprozess, gibt jedoch keinen Aufschluss darüber, mit welchen genauen Mechanismen die Zytokine den Krankheitsverlauf beeinflussen. Unklar ist, ob lediglich IL-17 oder IFN- γ ausschlaggebend an der Pathogenese beteiligt sind oder ob weitere Zytokine bzw. Signalmoleküle, die durch eine folgende Signalkaskade von den gleichen Zellen oder anderer migrierter Zellen sezerniert werden, eine Rolle spielen. Die Vorstellung, eine T_H1-Antwort, Hauptproduzent von IFN- γ , sei zentral verantwortlich für Autoimmunität bzw. für die Entwicklung einer EAE, wurde in verschiedenen Studien widerlegt^{101,107}. Darin entwickelten Tiere mit einer fehlenden funktionellen T_H1-Antwort eine EAE, bei IFN- γ Knockout-Mäusen im Vergleich zum Wildtyp sogar eine exazerbierte EAE^{101,107}. In diesem Zusammenhang wurde IFN- γ eher eine protektive statt einer pathogenen Funktion zugesprochen¹⁰¹. IFN- γ wurde allerdings durch seine regulatorische Funktion bezüglich der IL-17-Produktion - IFN- γ inhibiert die IL-17-Produktion durch Aktivierung des Transkriptionsfaktors STAT-1 - eine Rolle innerhalb der Krankheitsentwicklung zugesprochen^{26,98}. IL-17 ist neben MS auch mit vielen weiteren Autoimmunerkrankungen wie rheumatoider Arthritis, Psoriasis, Morbus Crohn und MS assoziiert¹⁰⁸. IL-17-mRNA- sowie Protein-Level waren in Läsionen des ZNS sowohl bei MS-Patienten als auch im Tieräquivalent erhöht^{109,110}. In IL-17-Knockout-Mäusen entwickelte sich zudem eine signifikant reduzierte EAE¹⁰¹. Obwohl in dieser Arbeit der Zusammenhang zwischen IL-17 und Entwicklung einer EAE gestützt wird, konnte abschließend nicht geklärt werden, ob IL-17 direkt oder andere, wechselwirkende Faktoren ausschlaggebend für die Entwicklung der EAE sind. Auf eine Stimulation mit IL-17 bilden der IL-17-Rezeptor (IL-17R) A und C einen Komplex und induzieren verschiedene Signalkaskaden wie NF- κ B, MAPKs (*mitogen-activated protein kinases*) JNK (*c-Jun N-terminal kinase*), p38 und ERK (*extracellular-signal-regulated kinase*), C/EBPs (*CCAAT/enhancer-binding proteins*), PI3K (*phosphoinositide 3-kinase*) und JAK (*Janus kinase*)/STATs²⁸. Exprimiert von verschiedenen Zelltypen wie Epithelzellen, Fibroblasten, Makrophagen, DZ oder T-Zellen werden u. a. Zytokine, Chemokine oder CSFs (*colony stimulating factors*) freigesetzt, die

entscheidende Faktoren im Autoimmunprozess spielen können²⁸. Die ELR+CXC-Chemokine wie CXCL1 sowie CXCL2 rekrutieren bspw. neutrophile Granulozyten u. a. ins ZNS, sind an ihrer Chemotaxis beteiligt und fördern eine neutrophile Entzündung¹¹¹. Innerhalb von EAE- und MS-Läsionen wurden CXCL1 sowie CXCL2 in Astrozyten entdeckt¹¹². IL-17-produzierende Zellen sezernieren außerdem weitere Zytokine wie IL-21, IL-22 oder IL-23, wobei IL-23 eine zentrale Rolle innerhalb der Entwicklung einer EAE zugesprochen wurde. Zum einen potenziert IL-23 eine T_H17-Antwort und zum anderen wiesen in Studien IL-23R-Knockout Mäuse eine Resistenz gegenüber einer EAE-Entwicklung auf^{17,101,113}. Die Zytokine IL-22 und IL-17 fördern durch Beeinflussung der *tight junctions* die Migration der T_H17 über die Blut-Hirn-Schranke ins ZNS. Der T_H17-Signalweg führt unter verschiedenen autoimmunen Konditionen und Lokalisationen zu spezifischen Genen und Mechanismen. Ein adoptiver Transfer von T_H17 nach Anreicherung unter unterschiedlichen *ex vivo*-Kulturbedingungen führte auf der einen Seite mit TGF- β , IL-6 und IL-23 zu einer EAE-Entwicklung, auf der anderen Seite blieb mit TGF- β und IL-6 diese hingegen aus¹¹¹. Dies verdeutlicht zum einen nochmal die Involvierung von T_H17 im Autoimmunprozess und zeigt zum anderen, wie andere Faktoren den Mechanismus beeinflussen können. Für T_C17 wurden in Studien ähnliche Konditionen wie für T_H17 demonstriert - IL-6, IL-21 sowie TGF- β fördern die Differenzierung und IL-23 stabilisiert den Phänotyp⁹.

Obwohl es sich bei beiden MOG-Modellen um zwei unterschiedliche Myelinepitope bezüglich CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen handelt, war kein größerer Unterschied im peripheren IL-17- sowie IFN- γ -sezernierendem T-Zell-Repertoire zu verzeichnen. Inwieweit sich das Verhältnis der IL-17- und IFN- γ -sezernierenden CD8⁺-T-Zellen beider MOG-Modelle innerhalb des ZNS verändert bzw. ob die Anzahl MOG₃₇₋₅₀-spezifischer, IL-17- und IFN- γ -sezernierender CD8⁺-T-Zellen im ZNS ansteigt, muss in weiteren Versuchen wie FACS-Analysen untersucht werden. Die Präsenz der CD8⁺-T-Zellen innerhalb des ZNS wurde für eine EAE-Induktion mit diesem MOG-Peptid als charakteristisch beschrieben⁸¹. Außerdem konnte in Studien demonstriert werden, dass sich innerhalb einer progredienten EAE die Präsenz und Aktivität autoantigenspezifischer CD4⁺-T-Zellen in verschiedenen Organen wie bspw. die Aktivität der CD4⁺-T-Zellen im peripheren Blut gegenüber der Aktivität im inflammatorischen ZNS unterscheiden kann^{114,115}. In der MOG₃₇₋₅₀-induzierten EAE konnte bereits die Anwesenheit IL-17-sezernierender CD8⁺-T-Zellen gezeigt werden¹⁰². In dieser Arbeit kann nur eine Beteiligung von T_C17 in der Autoimmunerkrankung aufgrund der Präsenz und der Migrationsaktivität vermutet werden. Basierend auf dem Zytokinmuster

und der Präsenz von CD4⁺-T-Zell-Populationen scheinen diese entscheidend für die Sekretion wichtiger Mediatoren des Immunsystems und der Initiator der MOG₃₇₋₅₀-induzierten EAE zu sein. Wahrscheinlich ist auch ein Zusammenspiel beider T-Zell-Populationen. Innerhalb der MOG₃₇₋₄₆-induzierten EAE (ein Epitop für CD8⁺-T-Zellen) wurden für die Induktion einer schwerer ausgeprägten EAE und andauernden Inflammation im ZNS MOG₃₇₋₄₆-reaktive CD4⁺-T-Zellen als notwendig beschrieben¹¹⁶. Auch ist eine Beteiligung von MOG-reaktiven CD8⁺-T-Zellen innerhalb der MOG₃₅₋₅₅-induzierten EAE bekannt¹¹⁶. Dem widerspricht eine neuere Studie, in der gezeigt wurde, dass CD4⁺-T-Zellen für eine EAE-Induktion benötigt werden und die Präsenz von CD8⁺-T-Zellen im ZNS ein Epiphänomen darstellt und für eine Erkrankung nicht relevant ist¹¹⁷. In Läsionen von MS-Patienten wurden schon in früheren Studien die Anwesenheit beider T-Zellpopulationen nachgewiesen, deren Proportionen in den verschiedenen Studien - wahrscheinlich abhängig von der Lokalisation - variieren¹¹⁸. So wurden die CD8⁺- (lokalisiert im perivaskulären Spalt und Parenchym) und CD4⁺-T-Zellen (lokalisiert im perivaskulären Spalt und den Meningen) als dominant auftretende Zellpopulation beschrieben¹¹⁸. Dabei agieren die beiden Zelltypen auf unterschiedliche Weise. Während CD4⁺-T-Zellen Signalkaskaden durch Rekrutierung von Makrophagen auslösen, die u. a. Zytokine und destruktive Moleküle freisetzen, sind CD8⁺-T-Zellen in der Lage, mittels zweier verschiedener Mechanismen einen inflammatorischen Schaden im ZNS zu verursachen^{119,120}. CD8⁺-T-Zellen können entweder direkt agieren, indem sie MHC-Klasse I-exprimierende Axone attackieren, oder indirekt, indem sie Oligodendrozyten angreifen, was die Zerstörung der Myelinschicht zur Folge hat^{119,120}. Ebenfalls wurde ein Anstieg von IL-17 in CD4⁺- und in CD8⁺-T-Zellen sowie auch in Astrozyten und Oligodendrozyten in aktiven Bereichen von MS-Läsionen gezeigt¹¹⁸. Diese Studien unterstützen die Annahme, dass IL-17, sezerniert von CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen, ein entscheidendes Zytokin in der Pathogenese der MS dargestellt. Der exakte Mechanismus, wie T_H17 und T_C17 einen pathogenen Effekt bewirken, ist bisher noch unbekannt und es sind weitere Studien hierfür erforderlich.

Besonders die Entwicklung weiterer Tiermodelle kann dabei helfen, die Pathogenese der MS besser zu verstehen und weitere wichtige Mediatoren zu identifizieren. Tiermodelle reflektieren nur Teilaspekte, zudem existieren zwischen der EAE und MS signifikante Unterschiede. Wie in den hier verwendeten Modellen spielt beispielsweise in den meisten EAE-Modellen die CD8⁺-T-Zell-Population nicht wie in der MS eine Schlüsselrolle, sondern ist eher untergeordnet. Um die Rolle von T_C17 weiter zu untersuchen, wird ein Mausmodell benötigt, bei dem CD8⁺-T-Zellen ausschlaggebend für die Pathogenese sind bzw. die

Proportion zu CD4⁺-T-Zellen ähnlicher zur MS ist. Das 1C6-Mausmodell wurde u. a. als ein aussichtsreiches EAE-Modell beschrieben¹¹⁹.

Die funktionale Avidität ist definiert durch die Stärke einer antigenspezifischen T-Zell-Antwort zu ihrem Antigen (4.1.3)¹²¹. In der Autoimmunität entscheidet die Signalstärke über das Schicksal einer autoreaktiven T-Zelle wie bspw. ihr Überleben, den Status ihrer Aktivierung oder den Effektor-Zelltyp, in den sich die Zelle differenziert¹²². Im Immunprozess einer passiven EAE besitzen Effektorzellen nicht nur eine Migrationsaktivität (von den Lymphknoten in den Blutstrom, die Milz und das ZNS), sie können außerdem ihre Funktionalität ändern^{115,123}. In der aktiv induzierten EAE wird davon ausgegangen, dass nur die Klone mit geringer Affinität in die Peripherie rezirkulieren, während die für die Krankheit relevanten Klone mit hoher Affinität im ZNS verbleiben¹¹⁵. In dieser Arbeit wurde untersucht, ob sich die funktionale Avidität der MOG₃₇₋₅₀-spezifischen IL-17-produzierenden Zellen im Verlauf der EAE verändert (Abb. 4.6), es wurden aber keine signifikanten Veränderungen der funktionalen Avidität des T-Zell-Repertoires im fortschreitenden Krankheitsverlauf gefunden. Ein Grund hierfür könnte das Zusammenfügen der Splenozyten aller in einem Versuch verwendeten Tiere sein, die sich in der Dauer bis zum Krankheitsausbruch und in der Stärke der klinischen Symptome unterschieden. Der Peak der zweiten Krankheitsperiode setzt sich zusammen aus einer Verschlechterung der Symptomatik bei bereits erkrankten Tieren und einer Primärsymptomatik von vereinzelten Tieren.

Zusammenfassend resultiert eine EAE-Induktion mit MOG₃₇₋₅₀ in keiner höheren Immunantwort von CD8⁺-T-Zellen in der Peripherie. Ein ähnlicher Zytokinphänotyp in dem progradienten EAE-Verlauf beider EAE-Modelle wurde detektiert, die migratorische Aktivität von IL-17 und IFN- γ (in Peripherie und Zielorgan) indiziert eine Involvierung beider Zytokine in die Krankheitsentstehung. Die Daten zeigten keine Veränderungen bezüglich der funktionalen Avidität der MOG₃₇₋₅₀-spezifischen IL-17-sezernierenden Zellen im EAE-Verlauf.

5.1.2 Der Einfluss verschiedener PAMPs auf die IL-17-Sekretion MOG₃₇₋₅₀- und MOG₃₅₋₅₅-spezifischer T-Zell-Populationen

Für die Pathogenese von MS wird eine Kombination aus genetischen Faktoren und Umweltfaktoren verantwortlich gemacht. Eine Infektion kann einen starken Einfluss auf den Krankheitsverlauf der MS nehmen. Von PRRs erkannt, sind mikrobielle Pathogene bzw. PAMPs nicht nur in der Lage, den fortschreitenden Autoimmunprozess der Krankheit zu verstärken oder zu supprimieren, sondern auch als potentes Adjuvans zu agieren und eine EAE sowie andere Autoimmunerkrankungen zu induzieren. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, die Wirkung verschiedener PAMPs - gedacht als eine systematische Infektion - auf die geprimte, antigenspezifische T-Zell-vermittelte Immunantwort im Vergleich zu einer T-Zell-vermittelten Immunantwort ungeprimter, naiver Tiere zu untersuchen. Hierfür wurden Splenozyten aus naiven Tieren und beiden MOG-Modellen (bei dem MOG₃₇₋₅₀-induzierten Modell für die Messung der IL-17-Sekretion zusätzlich ZNS-infiltrierende Zellen) 14 Tage nach der Immunisierung entnommen (Peak der EAE). Die Zytokinsekretion wurde nach Kultivierung mit den verschiedenen PAMPs mit und ohne Restimulation mit entsprechendem MOG-Peptid bzw. Stimulation mit α CD3 bei den naiven Tieren mittels ELISpot- oder FACS-Analyse ausgewertet (Abb. 4.7, 4.8, 4.10).

Unabhängig vom Autoimmunprozess hatten nahezu alle PAMPs einen stimulierenden sowie kostimulierenden Effekt auf die IL-6- und keinen Effekt auf die IL-5-Sekretion (außer LPS auf ungeprimte und Curdlan auf MOG₃₇₋₅₀-spezifische Zellen). Auf die Hauptakteure in Autoimmunerkrankungen wie EAE, IFN- γ und IL-17, hatten die meisten PAMPs nur einen kostimulierenden Effekt mit unterschiedlich ausgeprägtem Zytokinprofil, abhängig vom Aktivierungsstatus der T-Zelle. In ungeprimten T-Zellen kostimulierten LPS, Loxoribine und CpG die IFN- γ - und IL-17-Sekretion sowie Zymosan zusätzlich die IL-17-Sekretion. Die MOG₃₇₋₅₀-spezifischen IFN- γ -sezernierenden Zellen wurden von allen PAMPs kostimuliert, die IL-17-sezernierenden Zellen allerdings nur mit LPS. Auf die Sekretion MOG₃₅₋₅₅-spezifischer Zellen wirkten Loxoribine, CpG und Curdlan kostimulierend auf die IL-17-Sekretion und Curdlan auf die IFN- γ -Sekretion. Im Gegensatz zur IL-17-Sekretion unterstützten die FACS-Daten einen kostimulierenden Effekt der PAMPs auf die IFN- γ -Sekretion. Unterschiede innerhalb der ELISpot- und FACS-Analyse lassen sich wie folgt erklären: Bei der ELISpot Analyse wird die Zytokinsekretion aller präsenten Zellen über den gesamten Zeitraum der Kultivierung gemessen, während die Daten der FACS-Analyse die Anzahl der zytokinsezernierenden Zellen zu einem Zeitpunkt reflektieren.

Bis auf Curdlan, ein Dectin-1-Agonist, wurden hier Agonisten verschiedener TLR, erstes identifiziertes und am besten charakterisiertes Mitglied der PRRs, eingesetzt: Zymosan,

Poly I:C, LPS, Loxoribine und CpG (Abb. 1.4)¹²⁴. Zur besseren Übersicht sind die TLR-Signalwege in Abb. 5.1 dargestellt. PRRs unterscheiden sich in ihrer Ligandenspezifität sowie in ihrer zellulären Lokalisation, sie rekrutieren verschiedene Adaptermoleküle, induzieren unterschiedliche Signalwege und biologische Antworten, die ebenfalls als Zelltyp-spezifisch beschrieben wurden^{124,125}. Diese Charakteristika verschiedener PRRs sowie der Aktivierungsstatus einer T-Zelle können zu unterschiedlichen oder auch zu ähnlichen Mustern der Zytokinsekretion führen.

Aufgrund ihrer Lokalisation und ihrer spezifischen Liganden lassen sich die TLR (bzw. PRRs) in zwei Untergruppen teilen. Auf der Zelloberfläche exprimiert, erkennen TLR2, TLR4, TLR6 und (und Dectin-1) größtenteils mikrobielle Membrankomponenten³⁰. TLR3, TLR7 und TLR9 sind in intrazellulären Vesikeln exprimiert und erkennen hauptsächlich mikrobielle Nukleinsäuren³⁰. Nach Ligandenbindung rekrutieren TLR7 und TLR9 ausschließlich MyD88. TLR2 und TLR6, bilden unter anderem einen Komplex miteinander, rekrutieren neben MyD88 zusätzlich TIRAP (= MAL). TLR3-Signale verlaufen unabhängig von MyD88 und TIRAP über die Rekrutierung von TRIF (= TICAM1), dieser Signalweg wird auch als TRIF-abhängiger Signalweg oder MyD88-unabhängiger Signalweg bezeichnet^{14,124}. TLR4 rekrutiert MyD88 und TRIF über TIRAP und TRAM, TLR4 induziert damit sowohl den MyD88-abhängigen als auch den TRIF-abhängigen Signalweg¹⁴.

Die induzierten Signalkaskaden dieser Adaptermoleküle lösen unterschiedliche Signalwege aus, die weitere unterschiedliche Adaptermoleküle involvieren und schließlich zur Aktivierung verschiedener Transkriptionsfaktoren führen. So rekrutiert bspw. MyD88 IRAK1 (*IL-1R-associated kinase 1*) und IRAK4, welche assoziiert mit TRAF6 TAK1 aktivieren. TAK1 aktiviert wiederum den IKK-Komplex, der den NF-κB-Inhibitor, IκB, phosphoryliert¹⁴. Die Aktivierung von NF-κB transkribiert verschiedene Zielgene einschließlich proinflammatorischer Zytokine, TNF, IL-6, pro IL-1β und pro-IL-18¹⁴. TAK1 beeinflusst ebenfalls den MAPK (*mitogen-activated protein kinase*)-Signalweg, inklusive p38 und ERK. Über CREB (*cyclic AMP response element-binding protein*) stimuliert p38 die Sekretion von IL-10, die Phosphorylierung von ERK stimuliert die IL-23-Synthese^{126,127}. Die Phosphorylierung der MAPK führt außerdem zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP-1. TRIF aktiviert NF-κB über RIP1 (*receptor-interacting protein 1*) und IRF3 über TRAF3 ebenfalls involviert sind TBK1 (*TANK-binding kinase 1*) und IKKε (IκB Kinase ε), was in der Transkription von IFN sowie inflammatorischer Zytokine resultiert. TLR7 und TLR9 aktivieren über MyD88 IRF1, IRF5 und IRF7, wodurch in DZ die Sekretion von Typ-I-IFN und inflammatorischen Zytokinen stimuliert wird. Die Sekretion verschiedener Zytokine moduliert dann die Aktivierung weiterer Signalkaskaden und Antworten des Immunsystems.

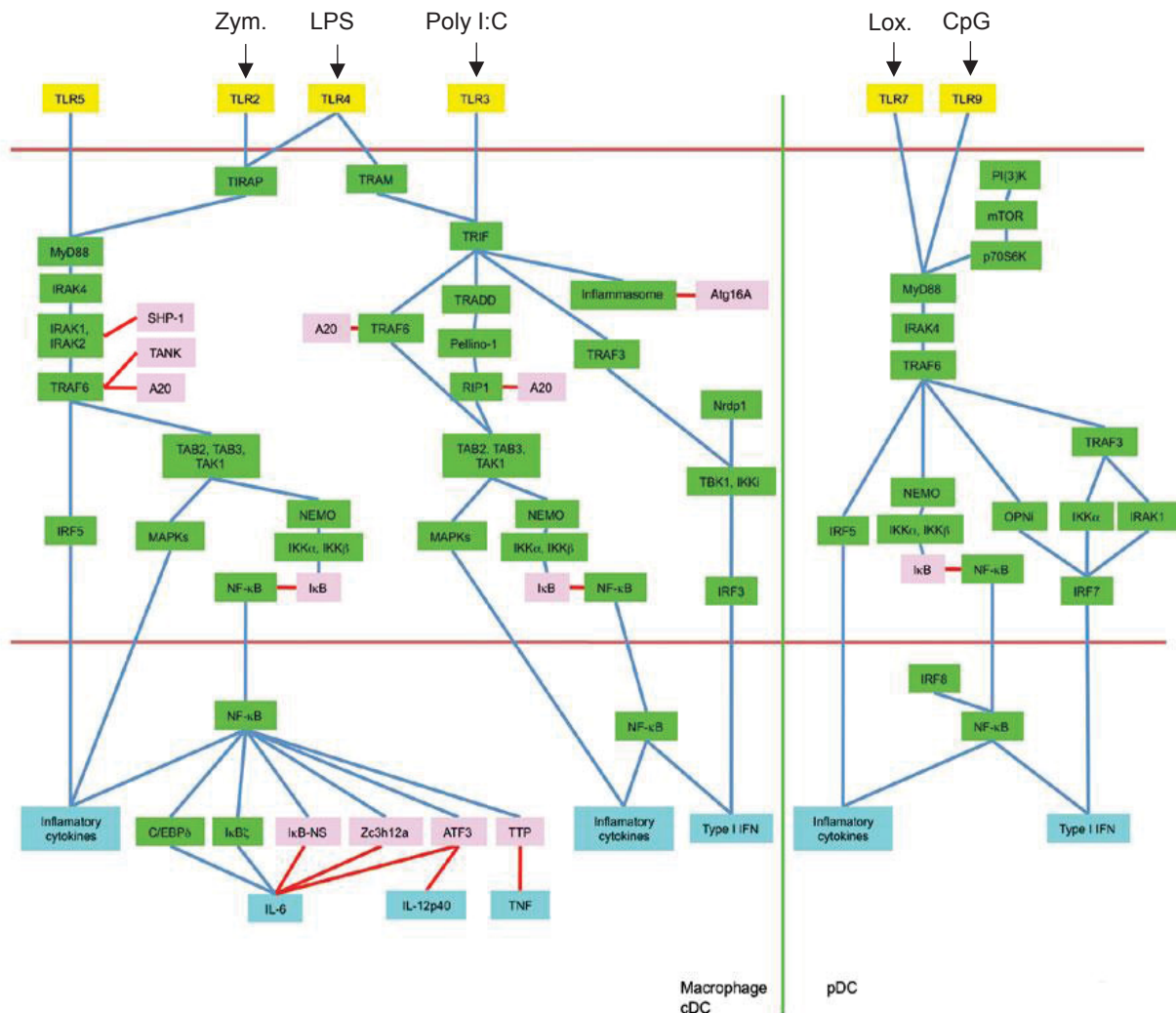


Abb. 5.1: Übersicht verschiedener TLR-Signalwege (modifiziert nach Kawai und Akira)³⁰. Verschiedene Signalwege und Adaptermoleküle durch Aktivierung unterschiedlicher TLR in Makrophagen und dendritischen Zellen. gelb: TLR (Toll-like Rezeptoren); grün: Stimulatoren; pink: inhibierende Regulatoren; blau: Zielgene; Zym.: Zymosan; Lox.: Loxoribine.

TLR7 erkennt u. a. **Loxoribine**, ein Guanosin-Analogon (Nukleosid bestehend aus der Nukleinbase Guanin und dem Zucker β -D-Ribose). **CpG** (*unmethylated cytosine-phosphate-guanine*)-Dinukleotide in endotoxinfreien bakteriellen DNA-Sequenzen aus *E. coli* K12 aktivieren eine Signalkaskade via TLR9 (u. a. exprimiert von DZ oder B-Zellen)¹²⁸. Wie oben beschrieben, führt die Aktivierung beider Signalwege zur Sekretion inflammatorischer Zytokine und Typ-I-IFN. Nach einer Infektion mit RNA-Viren wurde eine hohe Expression von TLR7, nach einer Infektion mit DNA-Viren hingegen die Expression von TLR9 auf plasmazytoiden DZ beschrieben, die zu dieser Immunantwort führte³⁰. CpG aktiviert außerdem direkt plasmazytoide DZ, Makrophagen sowie B-Zellen und ist für starke

T_H1 -Antworten bekannt^{30,129}. Beide Liganden induzieren in allen Tieren eine hohe IL-6-Antwort und nahezu keine IL-5-Antwort. Die IL-17-Sekretion wurde leicht erhöht, die Lymphozyten aber kaum beeinflusst. Die MOG₃₇₋₅₀-spezifischen, ZNS-infiltrierenden Zellen wurden jedoch im Gegensatz zu den Splenozyten mit Loxoribine signifikant kostimuliert. PAMPs beeinflussen das lokale Zytokin- und Chemokin-Mikromilieu und induzieren unterschiedliche Signalkaskaden in verschiedenen Zellen des jeweiligen Gewebes. Dabei können Splenozyten und ZNS-infiltrierende Zellen *in vivo* sowie *ex vivo* von verschiedenen (gewebsspezifischen) Faktoren beeinflusst werden wie bspw. die Mikroglia im ZNS oder Makrophagen in der Peripherie. Wie in der Literatur beschrieben, wurde eine hohe T_H1 -Antwort (IFN- γ -Sekretion) induziert. Bis auf die CD4⁺-T-Zellen der MOG₃₇₋₅₀-induzierten EAE wurde die MOG-spezifische IFN- γ -Produktion aller Zellpopulation beider MOG-Modelle mit Loxoribine und CpG ebenfalls angeregt. Interessanterweise unterschied sich die IFN- γ -Sekretion beider Liganden hinsichtlich der produzierenden Splenozyten naiver Tiere. CpG führt auch bei den Lymphozyten, den CD4⁺- sowie auch den CD8⁺-T-Zellen zu einer starken Erhöhung der IFN- γ -Sekretion. Alle drei Zellpopulationen, besonders die CD8⁺-T-Zellen, werden allerdings durch Loxoribine reduziert. Eine Möglichkeit wäre, dass die via Loxoribine-induzierte Signalkaskade andere IFN- γ -sezernierende Zellen anregt, während CpG eine Antwort in Lymphozyten auslöst. Eine weitere Möglichkeit wäre, es auf die beiden unterschiedlichen Methoden - Messung der Zytokinsekretion aller präsenter Zellen innerhalb des gesamten Kultivierungszeitraums und zu einem Zeitpunkt - zurückzuführen: Das Resultat der Loxoribine-induzierten Signalkaskaden könnte im Gegensatz zur CpG-induzierten Signalkaskade eine Inhibierung von IFN- γ sein. Zytokine können sich zudem gegenseitig beeinflussen, beispielsweise inhibiert Typ-I-IFN die Sekretion von IFN- γ und auch von IL-17 (Abschnitt LPS) und IFN- γ inhibiert IL-17 sowie IL-5.

TLR4 dient im Komplex mit MD-2 (*myeloid differentiation factor 2*) als Hauptbindungsstelle einer Komponente der äußeren Membran gramnegativer Bakterien, Lipopolysaccharid (LPS)¹⁴. Als potenter Immunmodulator wurde die LPS-induzierte Signalkaskade via TLR4 mit verschiedenen Erkrankungen, u. a. Erkrankungen der Atemwege wie AAD (*Allergic Airway Disease*) in Zusammenhang gebracht¹³⁰. Hansen *et al.* zeigten, dass sich neben Mykobakterien LPS bestens als Adjuvans eignet und eine moderate bis schwere EAE auslösen kann⁴⁰. Auch in dieser Arbeit konnte eine starke stimulierende Wirkung von LPS auf die Sekretion verschiedener Zytokine gezeigt werden. Die Sekretion von IL-6 wurde in allen Kulturen mit LPS stimuliert und kostimuliert sowie die Sekretion von IL-5 in den

Kulturen naiver Tiere. Die IFN- γ -Sekretion wurde durch Kostimulation mit LPS sowohl in den Zellpopulationen der MOG₃₇₋₅₀-induzierten EAE als auch in gesunden Tieren erhöht. Bis auf die CD4⁺-T-Zell-Populationen naiver Tiere, sezernierte bei allen Versuchstiere jede Zellpopulation vermehrt IFN- γ . LPS hatte ebenfalls einen kostimulierenden Effekt auf die IL-17-sezernierenden Splenozyten naiver Tiere, in der MOG₃₇₋₅₀-induzierten EAE sowie einen stimulierenden Effekt in der MOG₃₅₋₅₅-induzierten EAE. Die IL-17-Sekretion der verschiedenen Zellpopulationen in naiven Tieren blieb nach LPS-Kostimulation nahezu unverändert, nur bei den CD4⁺-T-Zellen beider MOG-Modelle und den CD8⁺-T-Zellen der MOG₃₇₋₅₀-induzierten EAE wurde die Sekretion erhöht.

Nach der Bindung von LPS mithilfe involvierter Proteine wie LBP (*LPS-binding protein*) und CD14 initiiert der TLR4-MD-2-Komplex den MyD88- und den TRIF-abhängigen Signalweg¹³¹. Dies führt (wie z. T. oben beschrieben) über den MyD88-Signalweg zur Sekretion der inflammatorischen Zytokine IL-6, IL-12p40, IL-18, IL-1 β , IL-23 und TNF. Über einen zweiten Weg, den TRIF-abhängigen Signalweg, führt dies ebenfalls zur Sekretion von Typ-I-IFN und weiterer inflammatorischer Zytokine¹⁴. Die Zytokine können weitere Signalwege induzieren und sich gegenseitig stimulieren sowie inhibieren. IL-12 stimuliert die Differenzierung und Sekretion von T_H1, was eine erhöhte IFN- γ -Antwort erklärt¹³². IL-6, IL-23, IL-18 und IL-1 fördern die Differenzierung und Proliferation von T_H17 und eine IL-17-Antwort¹⁴. Gleichzeitig inhibiert IFN- γ IL-17 über die Aktivierung von STAT-1 (*signal transducer and activator of transcription-1*) und auch der TRIF-Signalweg führt zu einer Inhibierung von IL-17²⁶. Über Typ-I-IFN führt das Signal über IFNAR (Typ-I-IFN Rezeptor) zur Aktivierung der IL-27-Expression. IL-27 stimuliert die IL-10-Sekretion, IL-10 inhibiert die T_H17-Differenzierung und IL-17-Sekretion sowie die von T_H1 und IFN- γ ^{14,133}. Die Kombination beider Signalwege resultiert dann in einer hohen IL-6-Sekretion und in einer eher mäßigen Erhöhung der IL-17- und IFN- γ -Sekretion (mit Ausnahme IFN- γ bei naiven Tieren).

Poly I:C, ein synthetisches dsRNA-Analogon, induziert via TLR3-Signalweg nur den TRIF-abhängigen Signalweg. Poly I:C hatte auf die Zytokinsekretion nur einen leichten kostimulierenden Effekt, außerdem nicht auf jedes Zytokin. Das Resultat der Signaltransduktion via TRIF-Signalweg ist u. a. eine Inhibierung der IL-17- und IFN- γ -Antwort sowie die Stimulation inflammatorischer Zytokine.

Die IL-6-Sekretion wurde durch Kostimulation mit Poly I:C leicht erhöht (signifikant bei naiven Tieren und MOG₃₇₋₅₀-Tieren). Keinen Einfluss hat Poly I:C auf die IL-5-Sekretion. Auf die IFN- γ -sezernierenden Zellen wirkte Poly I:C leicht kostimulierend. Die IFN- γ -

Produktion der Zellpopulation naiver Tiere und die des MOG₃₇₋₅₀-Modells (diese nur schwach) wurden reduziert. Einen leichten kostimulierenden Effekt hatte Poly I:C auf die MOG₃₅₋₅₅-spezifischen IFN- γ -sezernierenden CD8⁺-T-Zellen, die Produktion der CD4⁺-T-Zellen blieb hingegen unverändert und die Sekretion der Lymphozyten insgesamt wurde herabgesetzt.

Die leichte IFN- γ -Erhöhung in den ELISpot-Daten (alle Zellen) nach Kostimulation mit Poly I:C verglichen mit der Reduzierung innerhalb der FACS-Daten (Lymphozyten) deutet daraufhin, dass Poly I:C wahrscheinlich andere Zellen als Lymphozyten zur IFN- γ -Sekretion anregt. Dies wird vor allem bei den Zellen naiver Tiere deutlich. IFN- γ wird zwar hauptsächlich von Lymphozyten sezerniert, allerdings wurde in verschiedenen Studien auch beschrieben, dass ebenfalls einige myeloide Zellen IFN- γ sezernieren¹³⁴⁻¹³⁶. Fast keinen Einfluss hatte Poly I:C auf das IL-17-Profil der Splenozyten und ZNS-infiltrierender Zellen. In der EAE und in MS werden aktiviertem T_H1 (IFN- γ) und T_H17 (IL-17) eine Schlüsselrolle zugeschrieben, Poly I:C reduzierte hier allerdings die IFN- γ -Sekretion von T_H1 und hatte nahezu keinen Einfluss auf die IL-17-Sekretion⁷². Dies unterstützt die Annahme, dass der MyD88-Signalweg essentiell ist für die Aktivierung von APZ und eine Stimulation von T-Zellen sowie für eine EAE-Entwicklung¹³⁷. Marta *et al.* demonstrierten bspw. eine Resistenz gegenüber einer MOG-induzierten EAE in MyD88^{-/-} Mäusen, was mit einer reduzierten Antwort IL-6 und IL-23 (von DZ) sowie IL-17 und IFN- γ (von T-Zellen) assoziiert ist^{14,137,138}. Hansen *et al.* zeigten, dass die Immunsierung von Mäusen mit MOG₃₅₋₅₅ und Poly I:C selbst bei hohen Konzentrationen nur zu einer milden EAE führte und Touil *et al.*, dass Poly I:C die PLPp-induzierte EAE in Mäusen supprimiert^{40,139}.

TLR2 kann von einem weiten Spektrum an PAMPs wie Derivaten von Bakterien, Parasiten, Pilzen und Viren aktiviert werden¹²⁴. TLR2 bildet im Allgemeinen Heterodimere mit TLR1 oder TLR6. **Zymosan**, Zellwandbestandteil von *Saccharomyces cerevisiae*, aktiviert eine Signalkaskade via TLR2-TLR6 und via Dectin-1, wobei die induzierte Immunantwort als ein Zusammenspiel beider Rezeptoren beschrieben wurde¹⁴⁰. Zymosan wird in verschiedenen Studien als ein potenter Aktivator des Immunsystems beschrieben¹⁴¹. Der Einsatz von Zymosan kann zu verschiedenen Immunreaktionen führen und verschiedene immunvermittelte entzündliche Erkrankungen induzieren wie Arthritis und EAE (ähnlich wie Mykobakterien über eine induzierte T_H17-Antwort)^{142,143}. Dectin-1 führt über Syk (*spleen tyrosine kinase*) und Raf-1 (*rapid accelerated fibrosarcoma-1*, Kinase-Isoform) zur Aktivierung zweier unabhängiger Signalwege⁴¹. Raf-1 fördert die Aktivierung von NF- κ B. Syk aktiviert wie MyD88 via TLR2-TLR6 über den CBM (CARD9-BCL10-MALT1)-Komplex

den Transkriptionsfaktor NF- κ B und über MAPK den Transkriptionsfaktor AP-1, was IL-1 β , IL-12 und IL-23 induziert^{41,142}. Die Rekrutierung von Syk führt außerdem über ROS (*reactive oxygen species*) zu einer Inflammasom-vermittelten Aktivierung von Caspase-1 und zur IL-1 β -Sekretion^{41,144}. TLR und Dectin-1 sind in verschiedenen Zelltypen wie DZ und Makrophagen exprimiert^{14,98}. In DZ und Makrophagen resultierte das Zymosan-induzierte Signal in eine Antwort inflammatorischer Zytokine inklusive TNF- α , IL-6, IL-10, IL-12 und IL-23^{98,145,146}. Die IL-6-Sekretion wurde hier durch Zymosan in naiven sowie in beiden MOG-Modellen kostimuliert (und in MOG₃₅₋₅₅ ebenfalls stimuliert), die IL-5-Sekretion blieb immer nahezu null. Auf die MOG-spezifische IFN- γ -Sekretion hatte Zymosan ebenfalls einen kostimulierenden (nur signifikant bei MOG₃₇₋₅₀) und einen leichten kostimulierenden Effekt in Kombination mit α CD3 auf ungeprimte Zellen. Auch die geprimten und ungeprimten Lymphozyten, die CD4⁺- und CD8⁺-T-Zell-Populationen wurden jeweils durch Zymosan zu einer erhöhten Sekretion von IFN- γ angeregt, insbesondere die CD8⁺-T-Zellen. Die MOG₃₇₋₅₀-spezifische IL-17-Sekretion der Splenozyten wurde leicht reduziert, allerdings wurde die Sekretion der ZNS-infiltrierenden Zellen erhöht. Einen leichten kostimulierenden Effekt hatte Zymosan auf die MOG₃₅₋₅₅-spezifischen IL-17-sezernierenden Zellen und auf die ungeprimten Zellen. In den FACS-Daten war kaum eine Beeinflussung durch Zymosan auf die jeweiligen IL-17-produzierenden Zellen ersichtlich.

Auch hier wird wieder deutlich, wie sich verschiedene Signaltransduktion u. a. auch von anderen Zellen des Immunsystems induziert wird bzw. sich Splenozyten auf das Zytokinmuster auswirken und sich die Zytokine gegenseitig beeinflussen. IL-23, IL-1 β , IL-6 (hier eine hoch-induzierte Antwort) fördern die Differenzierung von T_H17 und T_C17, während Typ-I-IFN und IL-10 diese supprimieren. Ebenfalls wird die Sekretion von IL-17 durch IFN- γ supprimiert. Hier konnte eine hohe Antwort von IFN- γ detektiert werden, wahrscheinlich von IL-12 induziert. T_H1 inhibieren außerdem T_H2 (IL-5-Sekretion). Insgesamt scheint Zymosan hier die Sekretion von IL-17 zu inhibieren - durch andere Zellen und induzierte Signalwege. IFN- γ aktiviert beispielsweise Makrophagen, die daraufhin u. a. die Sekretion weiterer Zytokine fördern⁴¹. Die MOG₃₇₋₅₀-spezifische IL-17-Sekretion ZNS-infiltrierender T-Zellen, die durch Zymosan im Gegensatz zur reduzierten Sekretion der Splenozyten erhöht wurde, unterstützt diese Vermutung.

Curdlan, ein β -(1,3)-Glucan, produziert von dem Bakterium *Alcaligenes faecalis*, induziert nur Dectin-1. Die via Dectin-1-ausgelöste Signalkaskade führt CARD9-abhängig zu einer Aktivierung von NF- κ B sowie MAP-Kinasen, was wie in vielen Studien beschrieben, u. a. zu einer Aktivierung der IL-1 β -Sekretion führt, die wiederum die Differenzierung von T_H17

fördert³⁷. In dieser Arbeit führte die Stimulation mit Curdlan zu einer signifikanten Stimulation / Kostimulation von IL-6-sezernierenden Zellen in der EAE, aber nicht in naiven Tieren. Bis auf die MOG₃₇₋₅₀-spezifische IL-5-Sekretion (leicht erhöht) wurde die IL-5-Sekretion nicht verändert und lag bei nahezu Null. Die IL-17-Sekretion aller Splenozyten und der ZNS-infiltrierenden MOG₃₇₋₅₀-spezifischen Zellen wurden leicht kostimuliert, signifikant war der Effekt jedoch nur bei den MOG₃₅₋₅₅-sezernierenden Splenozyten. Die MOG-spezifische IFN- γ -Sekretion wurde signifikant erhöht, die der ungeprimten Zellen nicht. Interessanterweise wurde hier die Sekretion der Lymphozyten, der CD4⁺-T-Zellen und CD8⁺-T-Zellen der ungeprimten Zellen reduziert, während die MOG₃₅₋₅₅-spezifische Sekretion erhöht wurde und die MOG₃₇₋₅₀-spezifische Sekretion (wenn überhaupt) ganz leicht reduziert wurde. Die durch Curdlan via Dectin-1-induzierte T_H1- und T_C1-Antwort scheint vom Aktivierungsstatus der T-Zelle abhängig zu sein. Beim Vergleich mit Zymosan fällt, trotz unterschiedlicher Quelle des β -(1,3)-Glucans (Pilz und Bakterium) und einer zusätzlichen Zymosan-induzierten TLR2-TLR6-Aktivierung, ein ähnlicher Trend bezüglich der Sekretion proinflammatorischer Zytokine auf. Dectin-1 kann einerseits eigene intrazelluläre Signale vermitteln, andererseits - beschrieben für β -(1,3)-Glucan mykotischen Ursprungs - mit verschiedenen TLR kooperieren^{37,147}. Neben TLR2 wurde eine Zusammenarbeit von Dectin-1 mit TLR4, TLR5, TLR7 und TLR9 beschrieben³⁷. Um Auskunft darüber zu geben, welche induzierten Signalwege zu dem ähnlichen Zytokinphänotyp führen, sind weitere Versuche erforderlich, bspw. mit Knockout-Mäusen oder mit Inhibierung verschiedener Signalwege.

In den Daten zeigte sich neben einer spezifischen biologischen Antwort individueller TLR-Initiation auch eine spezifische Immunantwort bei individuellen Tieren, basierend auf einem unterschiedlichen genetischen Hintergrund und variierendem T-Zell-Aktivierungsstatus. MS wurde beschrieben als eine Erkrankung mit einer Heterogenität der pathologischen Veränderungen im ZNS sowie einer interindividuellen Heterogenität, die sich u. a. in einem unterschiedlichen Ansprechen auf Therapien äußert¹⁴⁸. Diese Variationen werden hier im Tiermodell, in der Krankheitsausprägung sowie in der spezifischen Immunantwort auf verschiedene PAMPs reflektiert.

TLR sind hauptsächlich Sensoren des angeborenen Immunsystems, die exprimiert auf APZ indirekt T-Zellen über kostimulierende Moleküle und inflammatorische Zytokine modulieren und so die Antwort des adaptiven Immunsystems auf eine Infektion steuern. Verschiedene Studien beschrieben, dass TLR nicht nur auf Zellen des angeborenen Immunsystems und

B-Zellen des adaptiven Immunsystems exprimiert werden, sondern auch auf CD4⁺-T-Zellen^{149,150,151}. Gelman *et al.* demonstrierten, dass aktivierte CD4⁺-T-Zellen RNA von TLR3, TLR5 und TLR9 exprimieren und kein TLR2 und TLR4 (im Gegensatz zu naiven CD4⁺-T-Zellen)¹⁵¹. In Studien wurde ebenfalls gezeigt, dass auch CD8⁺-T-Zellen TLR exprimieren^{152,153}. Dies würde bedeuten, dass PAMPs in der Lage sind, aktivierte T-Zellen auch direkt zur Zytokinsekretion anzuregen. Nachdem in dieser Arbeit ein kostimulierender Effekt der PAMPs auf die IL-17-Sekretion gezeigt wurde, war der nächste Schritt, zu untersuchen, ob die PAMPs eine direkte oder indirekte T-Zell-Antwort von IL-17 induzieren und welcher Zelltyp der Hauptproduzent ist (Abb. 4.9).

Die α CD3-induzierte IL-17-Sekretion der CD4⁺-T-Zellen wurde durch alle PAMPs bis auf Poly I:C erhöht, signifikant aber nur durch Zymosan. CD8⁺-T-Zellen sezernierten nach Stimulation mit allen PAMPs verstärkt IL-17, signifikant nur nach Kostimulation mit Zymosan, LPS und Curdlan. Eine Titrationskurve mit einer variierenden Anzahl an APZ und konstanter Anzahl an CD4⁺- bzw. CD8⁺-T-Zellen zeigt, dass die IL-17-Sekretion beider Zellpopulationen mit sinkender Anzahl von APZ reduziert wird. Die MOG₃₇₋₅₀-induzierte IL-17-Sekretion CD4⁺-T-Zellen stieg durch alle PAMPs. Signifikant erhöht wurde die IL-17-Produktion aber nur nach Stimulation mit LPS, Loxoribine, CpG und Curdlan. Die CD8⁺-T-Zellen sezernierten nach Stimulation mit allen PAMPs verstärkt IL-17, aber nicht signifikant. Auch hier zeigte die APZ-Titrationskurve eine Reduktion der IL-17-Sekretion mit sinkender Anzahl an APZ. Im Gegensatz zu den naiven T-Zellen konnte aber auch ohne die Zugabe von APZ IL-17 detektiert werden. Der Einfluss der PAMPs wurde daraufhin zusätzlich auf die MOG₃₇₋₅₀-geprimten T-Zellen ohne Zugabe der APZ untersucht. Hier zeigte sich, dass die Hauptproduktion von IL-17 indirekt, in Anwesenheit von APZ, induziert wurde. Um eine Antwort IL-17-sezernierender Zellen zu induzieren ist eine Stimulation des TZR notwendig, zum einen für die Restimulation der T-Zellen (obwohl die Titrationskurve dem widerspricht) und zum anderen scheinen die TLR das TZR-induzierte Signal, wie bereits für CD4⁺-Effektorzellen und TLR2, TLR3 und TLR9 beschrieben, nicht zu komplementieren^{154,155}.

Weiter zeigte sich hier die CD4⁺-T-Zell-Population als Hauptproduzent von IL-17 in antigengeprimten bzw. in MOG₃₇₋₅₀-spezifischen T-Zellen. Besonders im Vergleich zu den FACS-Daten (Abb.4.8), wo die IL-17-Sekretion der CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen in Anwesenheit beider Populationen analysiert wurde und ähnlich war, liegt ein starkes Zusammenspiel von CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen nahe. Unter anderem wurde die Präsenz von CD4⁺-T-Zellen für die Induktion der Effektorfunktion von CD8⁺-T-Zellen als Notwendigkeit beschrieben¹⁵⁶. In den beiden ungeprimten T-Zell-Populationen wurden ähnliche Antworten detektiert. Die Antworten der Zellpopulationen scheinen außerdem

unabhängig von der Herkunft des PAMP (und abhängig vom TLR-induzierten Signalweg) zu sein. Ursprünglich galten CD8⁺-CTLs als Verteidigungsmediatoren gegen virale Infektionen und CD4⁺-T-Zellen gegen bakterielle Infektionen¹⁵⁷. Alle PAMPs induzieren eine höhere IL-17-Antwort bei den MOG₃₇₋₅₀-spezifischen CD4⁺-T-Zellen, bei den ungeprimten T-Zellen wurde bspw. mit LPS eine stärkere IL-17-Antwort der CD4⁺-T-Zellen, aber bei CpG eine stärkere Antwort der CD8⁺-T-Zellen induziert.

Werden die ELISpot-Daten der Splenozyten mit den ELISpot-Daten der isolierten Zellen verglichen, ist die IL-17-Antwort der isolierten Zellen größer. Zum einen könnte dies auf eine milieuabhängige Signaltransduktion hindeuten, zum anderen könnte es auch einfach an der Anzahl IL-17-sezernierender Zellen liegen.

Zusammenfassend sind PAMPs in der Lage, Autoimmunprozesse zu steuern und den Verlauf einer Autoimmunerkrankung zu beeinflussen, wenn sie die Adapterproteine MyD88 oder Syk (für den Dectin-1-Signalweg) rekrutieren. Die IL-17-Antwort in T_H17 und T_C17 wird indirekt (über APZ) und die Effektorfunktion der CD8⁺-T-Zellen wahrscheinlich mithilfe von CD4⁺-T-Zellen induziert. Insgesamt haben fast alle PAMPs nur einen kostimulierenden Effekt auf die IL-17- und IFN- γ -sezernierenden Zellen, der zu einer spezifischen biologischen Antwort führt, abhängig von einer Kombination verschiedener Faktoren wie dem induzierten Signalweg, dem Gewebemilieu, dem Aktivierungsstatus der T-Zelle und dem individuellen genetischen Hintergrund.

5.2 Der Einfluss von Zymosan und CpG auf das Zytokinprofil naiver

Thymozyten und Splenozyten⁹⁸

Die Sepsis ist bedingt durch eine komplexe inflammatorische Kaskade, die durch eine Infektion mit mikrobiellen Pathogenen (Bakterien, Viren, Pilze, Parasiten) ausgelöst wird und u. a. die Funktion von Organen in der Immunperipherie sowie den Thymus stark beeinträchtigen kann^{50,158,159}. In diesem Teil der Arbeit wurden die Konditionen einer fungalen und bakteriellen Sepsis / eines septischen Schocks mithilfe zweier gut charakterisierter TLR-Agonisten, Zymosan und CpG, systematisch in einem murinen ex-vivo-Modell nachgeahmt und die Sekretion pro- und antiinflammatorischer Zytokine reifer Immunzellen (Splenozyten) sowie unreifer (Thymozyten) untersucht¹⁶⁰.

Zymosan, Zellwandkomponente von *S. cerevisiae*, löst als potenter Stimulator via TLR2- und Dectin-1-Signalweg Antworten des adaptiven Immunsystems aus¹⁶¹. CpG aus *E. coli* K12 induzieren über den TLR9-Signalweg, der u. a. von plasmazytoiden DZ und B-Zellen exprimiert wird, eine T_H1 -Antwort (5.1.2)¹²⁸. Der immunologische Effekt beider TLR-Agonisten wurde auf die Thymozyten und Splenozyten mit und ohne zusätzliche Aktivierung des TZR-Komplex durch α CD3 analysiert^{162,163}. Die Sekretion der proinflammatorischen Zytokine IFN- γ , IL-6 und IL-17 sowie des antiinflammatorischen Zytokins wurden dabei detektiert (Abb. 4.11 -Abb. 4.13). Studien demonstrierten bereits, dass eine Sepsis in einer Produktion proinflammatorischer Zytokine resultiert und eine Apoptose sowie Atrophie von Thymozyten induziert^{164,165}. Andere Studien zeigten, dass IL-17-sezernierende Zellen ebenfalls präsent im Thymus von naiven Mäusen sind und durch PAMPs kostimuliert werden können^{162,166,167}. **Zymosan** erhöhte konzentrationsabhängig die α CD3-induzierte Produktion aller proinflammatorischen Zytokine in der Milz sowie im Thymus. Die Sekretion von IFN- γ und IL-6 sank mit niedrig werdender Dosis Zymosan, während interessanterweise die α CD3-induzierte IL-17-Sekretion der Thymozyten und Splenozyten zunächst stieg und dann kontinuierlich bei weiterer Erniedrigung der eingesetzten Menge Zymosan sank. Auf die IL-5-sezernierenden Thymozyten und Splenozyten hatte Zymosan keinen Einfluss. Ohne zusätzlichen TZR-Stimulus wurde nur die IL-6-Sekretion in beiden Organen angeregt. Die FACS-Daten unterstützten die kostimulierende Wirkung von Zymosan auf IFN- γ bzw. auf die T_H1 -Antwort in Thymozyten und Splenozyten. Im Gegensatz dazu weisen die FACS-Daten (es wurde hier keine IL-6 Kostimulation detektiert) darauf hin, dass andere Zellen, nicht Lymphozyten, nach Kostimulation mit Zymosan zu einer erhöhten Sekretion angeregt wurden. IL-6 wird von einer großen Anzahl an Zellen wie Makrophagen, Monozyten, B-Zellen, Neutrophilen, Mastzellen etc. als Antwort auf

verschiedene Stimuli sezerniert^{168,169}. PRRs wie TLR und Dectin-1 werden hauptsächlich in Zellen des angeborenen Immunsystems wie Makrophagen und DZ exprimiert¹⁴. Eine Induktion Zymosan-abhängiger Antworten in Makrophagen sowie in DZ, die u. a. in eine erhöhte IL-6-Sekretion resultieren (5.1.2), wird hier unterstützt^{137,141}. Verschiedene Studien demonstrierten, dass in Abhängigkeit von Dosis und Zeit der Einsatz von Zymosan zu verschiedenen Immunreaktionen führen und sowohl proinflammatorische als auch antiinflammatorische Effekte haben kann¹⁷⁰. Hansen *et al.* demonstrierten, dass Zymosan einerseits als effizientes Adjuvans eine EAE induzieren kann, Li *et al.* zeigten andererseits, dass eine niedrige Dosis Zymosan zu einer Verbesserung der EAE führt und es als ein aktives immunregulatorisches Medikament Potenzial in der Behandlung von MS besitzt^{40,170}. Zymosan supprimiert dabei die Autoimmuninflammation des ZNS durch die Regulierung von APZ-Kostimulatoren, die MHC-Klasse-II-Expression und die Förderung der T_{reg}-Differenzierung¹⁷⁰. In Abhängigkeit von der Dosis und der Zeit zeigte sich eine Herunterregulierung von IFN- γ und IL-17 sowie eine Hochregulierung von IL-5¹⁷⁰. Werden die Antworten der proinflammatorischen Zytokine nach Einsatz unterschiedlicher Konzentrationen von Zymosan hier verglichen, so wird eine dosisabhängige Wirkung auf T-Zellen - und auf andere Zellen unterstützt.

Weiter wurde die Wirkung von Zymosan auch auf ein PLPp-spezifisches Zytokinmuster in einer PLPp-induzierten akuten EAE in SJL/J Mäusen untersucht. Bezüglich der PLPp-spezifischen Sekretion von IFN- γ , IL-6 und IL-17 zeigte sich zwar ein Trend, aber einen signifikanten kostimulierenden Einfluss hatte Zymosan nur auf die IL-6-Sekretion. Die IL-5-Sekretion wurde hingegen durch Zymosan signifikant reduziert. Neben einer dosis- und zeitabhängigen Zymosan-induzierten Immunantwort scheint diese auch vom T-Zell-Aktivierungsstatus abhängig zu sein. Es resultiert eine signifikant erhöhte Sekretion der proinflammatorischen Zytokine bei den ungeprimten im Gegensatz zu den geprimten T-Zellen.

CpG hatte nahezu nur eine kostimulierende Wirkung auf die Zytokinproduktion der Thymozyten und Splenozyten. Keinen stimulierenden Effekt hatte CpG auf die α CD3-induzierte IL-5-Produktion und keinen relevanten Effekt auf die IL-17-Produktion der Splenozyten sowie Thymozyten. Parallel zu der Zymosan-induzierten Immunantwort, kostimulierte CpG die α CD3-induzierte Sekretion von IFN- γ und IL-6 in beiden Organen. Die IL-6-sezernierenden Thymozyten und Splenozyten wurden hauptsächlich von den höchsten Konzentrationen CpG kostimuliert wie auch die IFN- γ -sezernierenden Thymozyten. Die die IFN- γ -sezernierenden Splenozyten auch bei niedrigeren Dosen

kostimuliert, aber nicht signifikant. Die FACS-Daten unterstützten den kostimulierenden Effekt von CpG auf IFN- γ sowie auch hier eine IL-6-Sekretion anderer Zellpopulationen, nicht T-Zellen.

Die qualitativen und quantitativen Unterschiede zwischen den Zymosan- und CpG-induzierten Zytokinmustern sind durch unterschiedlich aktivierte Immunzellen via verschiedener TLR zu erklären¹²⁴. Jeder TLR hat verschiedene intrazelluläre Signalprozesse und rekrutiert bspw. ein spezifisches Set von Adaptermolekülen, die über unterschiedliche Signaltransduktionen ein spezifisches Zytokinmuster induzieren, das dann zu weiteren Signalkaskaden führt bzw. weitere Zellen beeinflusst. Wie in 5.1.2 bereits beschrieben, aktiviert bspw. IL-6 - erhöht bei beiden TLR-Liganden - die IL-17-produzierenden Zellen. Die in Studien beschriebene, Zymosan-induzierte IL-23-Sekretion fördert die T_H17-Differenzierung, die beschriebene IL-12-Sekretion hingegen die T_H1 Differenzierung - CpG induziert ebenfalls eine starke T_H1-Antwort - und IFN- γ inhibiert die IL-17-Sekretion^{30,39,171}.

Wird das Zytokinmuster der unreifen Immunzellen (Thymozyten) mit den reifen Immunzellen (Splenozyten) verglichen, besteht für (fast) alle Zytokine und Konditionen nur ein quantitativer Unterschied, kein qualitativer. Lediglich die Frequenz der Zytokine innerhalb der Splenozyten war bei Kostimulation höher als bei den Thymozyten. Das Mikromilieu im Thymus unterscheidet sich von dem der Milz auch bezüglich auslösender Immunantworten¹⁶².

Zusammenfassend zeigt dieser Teil der Arbeit, dass Zymosan und CpG eine erhöhte Antwort von IFN- γ und IL-6 (sezerniert von Zellen des angeborenen Immunsystems) sowie eine moderate Antwort von IL-17 im Thymus und in der Milz induzierten. Dies unterstützt die Annahme, dass IL-17 keine Schlüsselrolle im pathologischen Prozess einer bakteriellen oder fungalen Sepsis besitzt¹⁷². Die Immunantwort auf einen mikrobiellen Stimulus kann dabei abhängig von der Dosis und vom Aktivierungsstatus einer T-Zelle variieren.

6 Klinischer Bezug und Ausblick^{82,98}

Multiple Sklerose ist eine chronisch inflammatorische Erkrankung des ZNS, verursacht durch das Myelin der Nervenzellen attackierende, autoreaktive T-Zellen. Epidemiologische Studien zeigten, dass eine genetische Disposition sowie Umweltfaktoren starken Einfluss auf die Pathologie der MS haben. Verschiedene Wirkstoffe wirken (selektiv und unselektiv) immunmodulierend bzw. immunsuppressiv oder haben einen Effekt auf die Zellmigration von Immunzellen und auf die Immunantwort im ZNS. Für die Behandlung von MS wurden im Laufe der Zeit verschiedene Strategien mit unterschiedlichen Wirkmechanismen entwickelt (Abb. 6.1)⁶⁸.

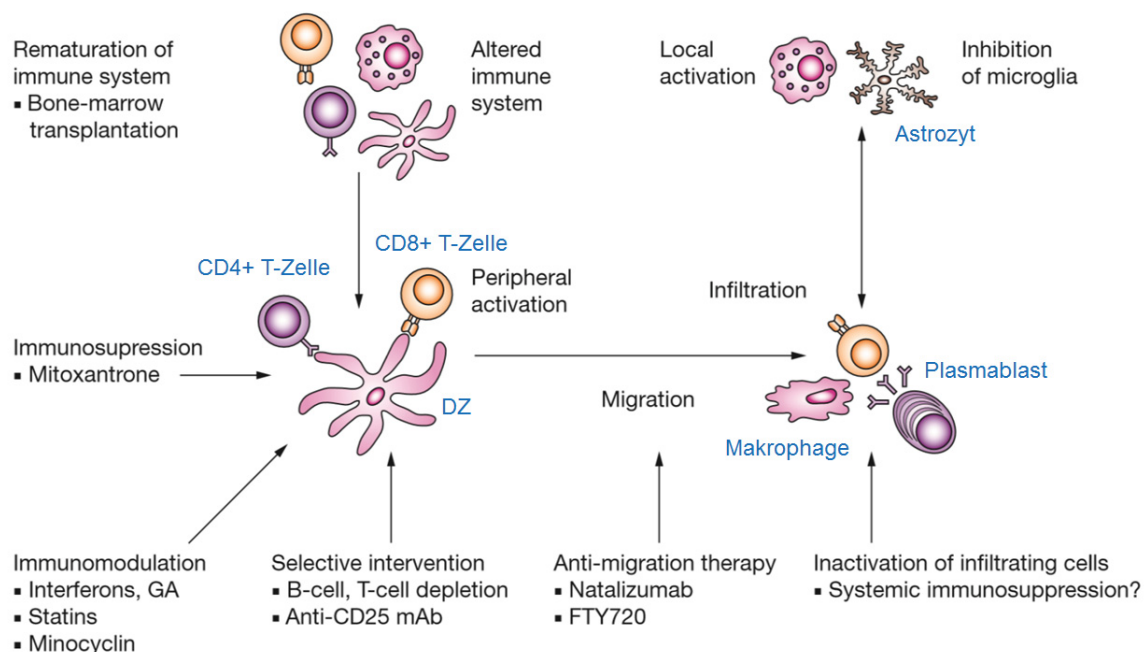


Abb. 6.1: Übersicht über die vielen Behandlungsstrategien in der Multiplen Sklerose (modifiziert nach Hemmer *et al.*)⁶⁸

Im Laufe der Zeit wurden verschiedene Behandlungsstrategien und Therapeutika mit unterschiedlichen Zielen im Immunprozess entwickelt. Darunter finden sich unter anderem Immunsuppressiva, Immunmodulatoren oder Anti-Migrations-Therapien. DZ: Dendritische Zelle

Der Großteil der Forschung im MS-Sektor ist auf das Tiermodell in Form der EAE zurückzuführen, welches viele klinische und neuropathologische Prozesse reflektiert⁷⁸. Die Wirksamkeit von Natalizumab wurde bspw. zunächst mit einem analogen Antikörper bei der EAE gezeigt⁶⁸. Immunologische Differenzen - bspw. sind CD8⁺-T-Zellen relevant in der Pathologie der MS, aber irrelevant in vielen EAE-Modellen - können auch zu unterschiedlichen Antworten auf immunmodulierte Therapien führen⁶⁸. Diese Arbeit unterstützt eine zentrale Rolle der proinflammatorischen Zytokine IFN- γ und IL-17 im

inflammatorischen und autoimmunen Prozess der EAE. Während verschiedene Studien für IFN- γ einen gegenteiligen Effekt in MS und EAE (Besserung oder kein Effekt innerhalb der EAE / Verschlechterung innerhalb der MS) zeigten, gilt ein IL-17-Antikörper als vielversprechender Ansatz in der MS-Antikörpertherapie⁶⁹. Studien demonstrierten sogar eine Verbesserung der klinischen Symptome bei einer genetischen Defizienz oder Neutralisierung von IL-17 in der EAE^{97,101}. In klinischen Studien wird derzeit die Effizienz und Sicherheit des humanen monoklonalen IL-17-Antikörpers Secukinumab (AIN457), ursprünglich als Psoriasis-Therapeutikum entwickelt, als neuer therapeutischer Behandlungsansatz getestet^{69,70}. Antikörper machen ebenfalls die Depletion von Immunzellen möglich. Die Depletion von CD20-exprimierenden B-Zellen und die Depletion CD52-exprimierender T-Zellen, B-Zellen und Monozyten scheinen in der MS-Behandlung sehr aussichtsreich zu sein^{173,174}. Autoreaktive CD8⁺-T-Zellen, in vielen Studien als Schlüsselrolle für MS beschrieben, könnten ein weiteres, vielversprechendes Ziel in der Entwicklung neuer Behandlungsstrategien darstellen¹²⁰. Studien demonstrierten bereits die Entwicklung einer milderen EAE in CD8⁺-T-Zell-defizienten Mäusen im Vgl. zum Wildtyp^{116,175}. Die Depletion von CD4⁺-T-Zellen hatte trotz effizienter Wirkung in der EAE keinen Effekt in der MS⁶⁸. Ein weiterer vielversprechender Angriffspunkt neuer Behandlungsstrategien ist die Modulation von Immunantworten durch PAMPs-induzierte Signalwege¹⁷⁶. MyD88 ist essentiell für die Induktion einer progression EAE und auch TLR9 scheint eine unverzichtbare Funktion zu haben - in TLR9^{-/-} Mäusen entwickelte sich keine EAE^{138,177}. Weiter wurde eine Inhibierung des MyD88-abhängigen Signalweges mithilfe von Antagonisten verschiedener TLR (TLR2, TLR4, TLR7, TLR8, TLR9) als effizientes Ziel beschrieben¹⁷⁸. Diese Arbeit unterstützt eine Aktivierung des MyD88-unabhängigen und eine Inhibierung des MyD88-abhängigen Signalweges durch TLR-Agonisten, Antagonisten oder anderer Moleküle, die innerhalb der induzierten Signalkaskaden eingreifen, als weitere vielversprechende Möglichkeit¹⁷⁸.

Der Einsatz von Tiermodellen führte in der MS zu neuen pathophysiologischen Kenntnissen sowie zur Entwicklung verschiedener Behandlungsstrategien und lieferte neue Angriffsziele im Immunprozess für Therapeutika. Diese Arbeit zeigt eine relevante Rolle für IL-17 und verschiedener PAMPs innerhalb der EAE-Pathogenese und unterstützt den Einsatz eines IL-17-Antikörpers sowie Modulatoren der PRR-Signalwege als vielversprechende Behandlungsstrategien innerhalb der MS. Eine Weiterentwicklung des EAE-Modells, vielleicht auch in Kombination mit Modellen anderer Autoimmunerkrankungen, könnte weitere wichtige Mediatoren in der Pathogenese identifizieren und helfen, die Wirksamkeit künftiger Therapien zu prüfen.

7 Zusammenfassung^{82,98}

Die genaue Ätiologie der Multiplen Sklerose ist bislang unbekannt. Intensive Studien deuten auf eine zentrale Rolle des Immunsystems hin und zeigen einen Einfluss endogener und exogener Faktoren auf die Entwicklung und Symptomatik der Erkrankung. Die EAE, das Tieräquivalent zur MS, ist essentiell, um die Pathophysiologie der MS zu untersuchen und neue Medikamente oder Behandlungsstrategien zu entwickeln. T_H17 und T_C17 wurden eine relevante Rolle in der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen wie MS und EAE zugeschrieben. In dieser Arbeit wurden die T-Zell-Populationen und das Zytokinmuster in der MOG₃₇₋₅₀- und MOG₃₅₋₅₅-induzierten progressiven EAE miteinander verglichen und der Einfluss verschiedener PAMPs untersucht. Charakteristisch für die MOG₃₇₋₅₀-EAE-Induktion sind peptidspezifische CD8⁺-T-Zellen im ZNS, dagegen stellt MOG₃₅₋₅₅ ein immundominantes Epitop für CD4⁺-T-Zellen dar. Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass (1) die Induktion der EAE mit MOG₃₇₋₅₀ nicht in einer höheren Immunantwort von CD8⁺-T-Zellen in der Peripherie resultiert. (2) Das Zytokinmuster der MOG₃₇₋₅₀-induzierten EAE im Krankheitsverlauf ähnelt dem der MOG₃₅₋₅₅-induzierten EAE. (3) Die Migrationsaktivität IL-17- und IFN- γ -sezernierender Zellen unterstützt eine Involvierung beider Zytokine in der EAE-Pathogenese, (4) die funktionale Avidität der MOG₃₇₋₅₀-spezifischen IL-17-sezernierenden Zellen bleibt im EAE-Verlauf unverändert. (5) Fast alle PAMPs haben nur einen kostimulierenden Effekt auf IL-17- und IFN- γ -produzierende Zellen und die Modifikation von Zytokinen der T-Zell-Populationen hängt von verschiedenen Faktoren ab: (6) von der MyD88- oder Syk-Rekrutierung, dem genetischen Hintergrund, (7) der Präsenz von APZ (PAMPs lösen die IL-17-Antwort indirekt in T-Zellen aus) und (8) CD4⁺-T-Zellen (für die Effektorfunktion von CD8⁺-T-Zellen).

PAMPs können zu einer Überproduktion von proinflammatorischen Zytokinen führen und eine Sepsis zur Folge haben. Der Einfluss von zwei TLR-Liganden - gedacht als systematische Infektion - auf reife und unreife Immunzellen wurde in einem zweiten Teil untersucht: (1) Zymosan und CpG führen hauptsächlich zu einer erhöhten IFN- γ - und IL-6-Sekretion sowie zu einer moderaten IL-17-Sekretion in beiden Immunzellpopulationen (kein qualitativer Unterschied), (2) Hauptproduzenten sind Zellen des angeborenen Immunsystems. (3) Die Immunantwort auf PAMPs scheint sowohl dosisabhängig als auch abhängig vom Aktivierungszustand einer T-Zelle zu sein.

Der modulierende Effekt von PAMPs und IL-17 auf Immunprozesse und Autoimmunerkrankungen zeigt, dass IL-17 sowie Modulatoren der PRR-Signalwege vielversprechende Ziele in der Entwicklung neuer Therapeutika in der Behandlung von MS darstellen.

8 Summary^{82,98}

In MS, the precise mode of disease etiology is still not known, but intensive research has revealed a central role for the immune system and that both - genetic and environmental factors - influence the risk of developing disease and progression of disease. Animal models (EAE) might help growing knowledge of pathophysiology of MS and develop different intervention strategies in the treatment of MS or provide novel therapeutics.

Several studies have linked PRRs and IL-17-producing T cells - most studies have focused on CD4⁺ T cells although CD8⁺ T cells are predominantly present - with autoimmune diseases. Here, the contribution of IL-17-producing CD8⁺ T cells (T_C17) (using the MOG₃₇₋₅₀ EAE model that was described for EAE induction through present CD8⁺ T cells) and the influence of different PAMPs on the cytokine signature in autoimmune disease was examined. In conclusion, (1) induction of EAE with MOG₃₇₋₅₀ did not result in higher immune responses of CD8⁺ T cells compared with induction of EAE with MOG₃₅₋₅₅. (2) In both models of EAE, a similar cytokine phenotype in progressive disease was noted - produced by CD4 and CD8⁺ T cells - and (3) the migratory activity of IL-17- and IFN- γ -secreting cells supports (3) an involvement of IFN- γ and IL-17 in the disease onset. (4) No significant changes in functional avidity of MOG₃₇₋₅₀-specific IL-17-producing cells in the course of EAE was found. PAMPs are able to drive autoimmune processes and to influence the course of autoimmune disease, but (5) almost all PAMPs only had a costimulating effect on IL-17 and IFN- γ -producing cells. To modify the cytokine expression of different T cell populations, a combination of distinct factors is required: the activation of MyD88 or Syk (6), the genetic background, (7) the presence of APCs - PAMPs acted indirectly to induce IL-17 responses in T cells - and (8) CD4⁺ T cells - the help of CD4⁺ T cells was required to induce effector function of CD8⁺ T cells. Furthermore, PAMPs can induce (over-)production of pro-inflammatory cytokines which can give rise to SIRS, sepsis or septic shock. The influence of two different TLR ligands - known to mimic such conditions - on immature and mature immune cells were investigated: (1) both zymosan and CpG mainly affect cells of the innate immune system such as macrophages and DCs both in mature and immature immune cell populations, (2) IFN- γ and IL-6 are predominantly triggered, but not IL-17, (3) there are no qualitative differences between the effect of both substances, respectively on immature versus mature immune cells and (4) the T cell activation status seems to be crucial. Relevant roles for PAMPs driving immunological networks and IL-17 in the onset and progression of disease were proven in this work which support the idea that α IL-17 antibodies or PRR-signalling modulators might be promising approaches.

9 Literatur

- 1 Tan, B. T., Park, C. Y., Ailles, L. E. & Weissman, I. L. The cancer stem cell hypothesis: a work in progress. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* **86**, 1203-1207, doi:10.1038/labinvest.3700488 (2006).
- 2 Germain, R. N. T-cell development and the CD4-CD8 lineage decision. *Nature reviews. Immunology* **2**, 309-322, doi:10.1038/nri798 (2002).
- 3 Mills, K. H. Regulatory T cells: friend or foe in immunity to infection? *Nature reviews. Immunology* **4**, 841-855, doi:10.1038/nri1485 (2004).
- 4 Janeway, C. A., Jr. & Medzhitov, R. Innate immune recognition. *Annual review of immunology* **20**, 197-216, doi:10.1146/annurev.immunol.20.083001.084359 (2002).
- 5 Mukhopadhyay, S., Pluddemann, A. & Gordon, S. Macrophage pattern recognition receptors in immunity, homeostasis and self tolerance. *Advances in experimental medicine and biology* **653**, 1-14 (2009).
- 6 Rabinovitch, M. Professional and non-professional phagocytes: an introduction. *Trends in cell biology* **5**, 85-87 (1995).
- 7 Li, K., Sacks, S. H. & Sheerin, N. S. The classical complement pathway plays a critical role in the opsonisation of uropathogenic Escherichia coli. *Molecular immunology* **45**, 954-962, doi:10.1016/j.molimm.2007.07.037 (2008).
- 8 Bassing, C. H. *et al.* T cell receptor (TCR) alpha/delta locus enhancer identity and position are critical for the assembly of TCR delta and alpha variable region genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 2598-2603, doi:10.1073/pnas.0437943100 (2003).
- 9 Huber, M. & Lohoff, M. Change of paradigm: CD8+ T cells as important helper for CD4+ T cells during asthma and autoimmune encephalomyelitis. *Allergo journal international* **24**, 8-15, doi:10.1007/s40629-015-0038-4 (2015).
- 10 Fukui, Y. *et al.* Positive and negative CD4+ thymocyte selection by a single MHC class II/peptide ligand affected by its expression level in the thymus. *Immunity* **6**, 401-410 (1997).
- 11 Huang, B., Yachou, A., Fleury, S., Hendrickson, W. A. & Sekaly, R. P. Analysis of the contact sites on the CD4 molecule with class II MHC molecule: co-ligand versus co-receptor function. *Journal of immunology* **158**, 216-225 (1997).
- 12 Wong, P. & Pamer, E. G. CD8 T cell responses to infectious pathogens. *Annual review of immunology* **21**, 29-70, doi:10.1146/annurev.immunol.21.120601.141114 (2003).
- 13 Kisielow, P., Teh, H. S., Bluthmann, H. & von Boehmer, H. Positive selection of antigen-specific T cells in thymus by restricting MHC molecules. *Nature* **335**, 730-733, doi:10.1038/335730a0 (1988).
- 14 Mills, K. H. TLR-dependent T cell activation in autoimmunity. *Nat Rev Immunol* **11**, 807-822, doi:nri3095 [pii] 10.1038/nri3095 (2011).
- 15 Mueller, S. N., Gebhardt, T., Carbone, F. R. & Heath, W. R. Memory T cell subsets, migration patterns, and tissue residence. *Annu Rev Immunol* **31**, 137-161, doi:10.1146/annurev-immunol-032712-095954 (2013).
- 16 Weigle, W. O. Persistence of immunological memory to soluble protein antigens. *Immunology* **10**, 377-382 (1966).
- 17 Korn, T., Oukka, M., Kuchroo, V. & Bettelli, E. Th17 cells: effector T cells with inflammatory properties. *Seminars in immunology* **19**, 362-371, doi:S1044-5323(07)00083-8 [pii] 10.1016/j.smim.2007.10.007 (2007).
- 18 Weaver, C. T., Harrington, L. E., Mangan, P. R., Gavrieli, M. & Murphy, K. M. Th17: an effector CD4 T cell lineage with regulatory T cell ties. *Immunity* **24**, 677-688, doi:10.1016/j.immuni.2006.06.002 (2006).
- 19 Dong, C. TH17 cells in development: an updated view of their molecular identity and genetic programming. *Nature reviews. Immunology* **8**, 337-348, doi:10.1038/nri2295 (2008).
- 20 Abbas, A. K., Murphy, K. M. & Sher, A. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* **383**, 787-793, doi:10.1038/383787a0 (1996).
- 21 Delfs, M. W., Furukawa, Y., Mitchell, R. N. & Lichtman, A. H. CD8+ T cell subsets TC1 and TC2 cause different histopathologic forms of murine cardiac allograft rejection. *Transplantation* **71**, 606-610 (2001).

- 22 Petermann, F. & Korn, T. Cytokines and effector T cell subsets causing autoimmune CNS disease. *FEBS letters* **585**, 3747-3757, doi:10.1016/j.febslet.2011.03.064 (2011).
- 23 Minami, Y., Kono, T., Miyazaki, T. & Taniguchi, T. The IL-2 receptor complex: its structure, function, and target genes. *Annual review of immunology* **11**, 245-268, doi:10.1146/annurev.iy.11.040193.001333 (1993).
- 24 Kelso, A. Cytokines: principles and prospects. *Immunology and cell biology* **76**, 300-317, doi:10.1046/j.1440-1711.1998.00757.x (1998).
- 25 Broughton, S. E. *et al.* The GM-CSF/IL-3/IL-5 cytokine receptor family: from ligand recognition to initiation of signaling. *Immunological reviews* **250**, 277-302, doi:10.1111/j.1600-065X.2012.01164.x (2012).
- 26 Kimura, A. & Kishimoto, T. IL-6: regulator of Treg/Th17 balance. *Eur J Immunol* **40**, 1830-1835, doi:10.1002/eji.201040391 (2010).
- 27 Scheller, J., Chalaris, A., Schmidt-Arras, D. & Rose-John, S. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochimica et biophysica acta* **1813**, 878-888, doi:10.1016/j.bbamcr.2011.01.034 (2011).
- 28 Zhu, S. & Qian, Y. IL-17/IL-17 receptor system in autoimmune disease: mechanisms and therapeutic potential. *Clinical science* **122**, 487-511, doi:10.1042/CS20110496 (2012).
- 29 Akira, S., Takeda, K. & Kaisho, T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nature immunology* **2**, 675-680, doi:10.1038/90609 (2001).
- 30 Kawai, T. & Akira, S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol* **11**, 373-384, doi:10.1038/ni.1863 (2010).
- 31 Bowie, A. & O'Neill, L. A. The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal generators for pro-inflammatory interleukins and microbial products. *Journal of leukocyte biology* **67**, 508-514 (2000).
- 32 Takeda, K. & Akira, S. Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol* **17**, 1-14, doi:10.1093/intimm/dxh186 (2005).
- 33 Barton, G. M. & Kagan, J. C. A cell biological view of Toll-like receptor function: regulation through compartmentalization. *Nature reviews. Immunology* **9**, 535-542, doi:10.1038/nri2587 (2009).
- 34 Romani, L. Immunity to fungal infections. *Nat Rev Immunol* **11**, 275-288, doi:10.1038/nri2939 (2011).
- 35 Noreen, M. *et al.* TLR4 polymorphisms and disease susceptibility. *Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society ... [et al.]* **61**, 177-188, doi:10.1007/s00011-011-0427-1 (2012).
- 36 Liu, T., Xu, Z. Z., Park, C. K., Berta, T. & Ji, R. R. Toll-like receptor 7 mediates pruritus. *Nature neuroscience* **13**, 1460-1462, doi:10.1038/nn.2683 (2010).
- 37 Goodridge, H. S., Wolf, A. J. & Underhill, D. M. Beta-glucan recognition by the innate immune system. *Immunol Rev* **230**, 38-50, doi:10.1111/j.1600-065X.2009.00793.x (2009).
- 38 Ren, X., Zhou, H., Li, B. & Su, S. B. Toll-like receptor 3 ligand polyinosinic:polycytidylic acid enhances autoimmune disease in a retinal autoimmunity model. *Int Immunopharmacol* **11**, 769-773, doi:S1567-5769(11)00054-3 [pii] 10.1016/j.intimp.2011.01.019 (2011).
- 39 Akira, S. Pathogen recognition by innate immunity and its signaling. *Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical and biological sciences* **85**, 143-156 (2009).
- 40 Hansen, B. S., Hussain, R. Z., Lovett-Racke, A. E., Thomas, J. A. & Racke, M. K. Multiple toll-like receptor agonists act as potent adjuvants in the induction of autoimmunity. *Journal of neuroimmunology* **172**, 94-103, doi:S0165-5728(05)00489-3 [pii] 10.1016/j.jneuroim.2005.11.006 (2006).
- 41 Saijo, S. & Iwakura, Y. Dectin-1 and Dectin-2 in innate immunity against fungi. *Int Immunol* **23**, 467-472, doi:10.1093/intimm/dxr046 (2011).
- 42 Ermann, J. & Fathman, C. G. Autoimmune diseases: genes, bugs and failed regulation. *Nature immunology* **2**, 759-761, doi:10.1038/ni0901-759 (2001).
- 43 Willer, C. J. *et al.* Twin concordance and sibling recurrence rates in multiple sclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 12877-12882, doi:10.1073/pnas.1932604100 (2003).
- 44 Munz, C., Lunemann, J. D., Getts, M. T. & Miller, S. D. Antiviral immune responses: triggers of or triggered by autoimmunity? *Nature reviews. Immunology* **9**, 246-258, doi:10.1038/nri2527 (2009).

- 45 Hausmann, S. & Wucherpfennig, K. W. Activation of autoreactive T cells by peptides from human pathogens. *Current opinion in immunology* **9**, 831-838 (1997).
- 46 Katz-Levy, Y. *et al.* Endogenous presentation of self myelin epitopes by CNS-resident APCs in Theiler's virus-infected mice. *The Journal of clinical investigation* **104**, 599-610, doi:10.1172/JCI7292 (1999).
- 47 Fujinami, R. S. & Oldstone, M. B. Amino acid homology between the encephalitogenic site of myelin basic protein and virus: mechanism for autoimmunity. *Science* **230**, 1043-1045 (1985).
- 48 Kurtzke, J. F. Epidemiologic evidence for multiple sclerosis as an infection. *Clinical microbiology reviews* **6**, 382-427 (1993).
- 49 Noseworthy, J. H. Progress in determining the causes and treatment of multiple sclerosis. *Nature* **399**, A40-47 (1999).
- 50 Giamarellos-Bourboulis, E. J. What is the pathophysiology of the septic host upon admission? *Int J Antimicrob Agents* **36 Suppl 2**, S2-5, doi:10.1016/j.ijantimicag.2010.11.003 (2010).
- 51 Ji, Q., Perchellet, A. & Goverman, J. M. Viral infection triggers central nervous system autoimmunity via activation of CD8⁺ T cells expressing dual TCRs. *Nature immunology* **11**, 628-634, doi:10.1038/ni.1888 (2010).
- 52 McFarland, H. F. & Martin, R. Multiple sclerosis: a complicated picture of autoimmunity. *Nat Immunol* **8**, 913-919, doi:10.1038/ni1507 (2007).
- 53 Marta, M., Meier, U. C. & Lobell, A. Regulation of autoimmune encephalomyelitis by toll-like receptors. *Autoimmunity reviews* **8**, 506-509, doi:S1568-9972(09)00010-X [pii] 10.1016/j.autrev.2009.01.006 (2009).
- 54 Zhao, C. B. *et al.* A new EAE model of brain demyelination induced by intracerebroventricular pertussis toxin. *Biochem Biophys Res Commun* **370**, 16-21, doi:S0006-291X(08)00444-0 [pii] 10.1016/j.bbrc.2008.02.161 (2008).
- 55 McFarlin, D. E. & Lachmann, P. J. Multiple sclerosis. Hopeful genes and immunology. *Nature* **341**, 693-694, doi:10.1038/341693a0 (1989).
- 56 Stohl, W. & Gonatas, N. K. Chronic permeability of the central nervous system to mononuclear cells in experimental allergic encephalomyelitis in the Lewis rat. *Journal of immunology* **121**, 844-850 (1978).
- 57 Sospedra, M. & Martin, R. Immunology of multiple sclerosis. *Annual review of immunology* **23**, 683-747, doi:10.1146/annurev.immunol.23.021704.115707 (2005).
- 58 Dyment, D. A., Ebers, G. C. & Sadovnick, A. D. Genetics of multiple sclerosis. *The Lancet. Neurology* **3**, 104-110 (2004).
- 59 Riccio, P. & Rossano, R. Nutrition facts in multiple sclerosis. *ASN neuro* **7**, doi:10.1177/1759091414568185 (2015).
- 60 Ascherio, A. *et al.* Vitamin D as an early predictor of multiple sclerosis activity and progression. *JAMA neurology* **71**, 306-314, doi:10.1001/jamaneurol.2013.5993 (2014).
- 61 Riccio, P., Rossano, R. & Liuzzi, G. M. May diet and dietary supplements improve the wellness of multiple sclerosis patients? A molecular approach. *Autoimmune diseases* **2010**, 249842, doi:10.4061/2010/249842 (2011).
- 62 Hemmer, B., Archelos, J. J. & Hartung, H. P. New concepts in the immunopathogenesis of multiple sclerosis. *Nat Rev Neurosci* **3**, 291-301, doi:10.1038/nrn784 (2002).
- 63 Goverman, J. Autoimmune T cell responses in the central nervous system. *Nature reviews. Immunology* **9**, 393-407, doi:10.1038/nri2550 (2009).
- 64 Ransohoff, R. M., Kivisakk, P. & Kidd, G. Three or more routes for leukocyte migration into the central nervous system. *Nature reviews. Immunology* **3**, 569-581, doi:10.1038/nri1130 (2003).
- 65 Liblau, R. S., Gonzalez-Dunia, D., Wiendl, H. & Zipp, F. Neurons as targets for T cells in the nervous system. *Trends in neurosciences* **36**, 315-324, doi:10.1016/j.tins.2013.01.008 (2013).
- 66 Tomioka, R. & Matsui, M. Biomarkers for multiple sclerosis. *Internal medicine* **53**, 361-365 (2014).
- 67 Cavone, L. & Chiarugi, A. Targeting poly(ADP-ribose) polymerase-1 as a promising approach for immunomodulation in multiple sclerosis? *Trends in molecular medicine* **18**, 92-100, doi:10.1016/j.molmed.2011.10.002 (2012).

- 68 Hemmer, B., Nessler, S., Zhou, D., Kieseier, B. & Hartung, H. P. Immunopathogenesis and immunotherapy of multiple sclerosis. *Nat Clin Pract Neurol* **2**, 201-211, doi:10.1038/ncpneuro0154 (2006).
- 69 Knier, B., Hemmer, B. & Korn, T. Novel monoclonal antibodies for therapy of multiple sclerosis. *Expert opinion on biological therapy* **14**, 503-513, doi:10.1517/14712598.2014.887676 (2014).
- 70 Gensicke, H. *et al.* Monoclonal antibodies and recombinant immunoglobulins for the treatment of multiple sclerosis. *CNS drugs* **26**, 11-37, doi:10.2165/11596920-000000000-00000 (2012).
- 71 Rangachari, M. & Kuchroo, V. K. Using EAE to better understand principles of immune function and autoimmune pathology. *Journal of autoimmunity* **45**, 31-39, doi:10.1016/j.jaut.2013.06.008 (2013).
- 72 Constantinescu, C. S., Farooqi, N., O'Brien, K. & Gran, B. Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) as a model for multiple sclerosis (MS). *Br J Pharmacol* **164**, 1079-1106, doi:10.1111/j.1476-5381.2011.01302.x (2011).
- 73 Racke, M. K., Hu, W. & Lovett-Racke, A. E. PTX cruiser: driving autoimmunity via TLR4. *Trends in immunology* **26**, 289-291, doi:S1471-4906(05)00083-9 [pii] 10.1016/j.it.2005.03.012 (2005).
- 74 Linthicum, D. S. Development of acute autoimmune encephalomyelitis in mice: factors regulating the effector phase of the disease. *Immunobiology* **162**, 211-220, doi:10.1016/S0171-2985(11)80001-X (1982).
- 75 Kamradt, T., Soloway, P. D., Perkins, D. L. & Geffer, M. L. Pertussis toxin prevents the induction of peripheral T cell anergy and enhances the T cell response to an encephalitogenic peptide of myelin basic protein. *Journal of immunology* **147**, 3296-3302 (1991).
- 76 Black, W. J. *et al.* ADP-ribosyltransferase activity of pertussis toxin and immunomodulation by Bordetella pertussis. *Science* **240**, 656-659 (1988).
- 77 Libbey, J. E. & Fujinami, R. S. Experimental autoimmune encephalomyelitis as a testing paradigm for adjuvants and vaccines. *Vaccine* **29**, 3356-3362, doi:10.1016/j.vaccine.2010.08.103 (2011).
- 78 Khan, N. & Smith, M. T. Multiple sclerosis-induced neuropathic pain: pharmacological management and pathophysiological insights from rodent EAE models. *Inflammopharmacology* **22**, 1-22, doi:10.1007/s10787-013-0195-3 (2014).
- 79 Mendel, I., Kerlero de Rosbo, N. & Ben-Nun, A. A myelin oligodendrocyte glycoprotein peptide induces typical chronic experimental autoimmune encephalomyelitis in H-2b mice: fine specificity and T cell receptor V beta expression of encephalitogenic T cells. *Eur J Immunol* **25**, 1951-1959, doi:10.1002/eji.1830250723 (1995).
- 80 Tompkins, S. M. *et al.* De novo central nervous system processing of myelin antigen is required for the initiation of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of immunology* **168**, 4173-4183 (2002).
- 81 Ford, M. L. & Evavold, B. D. Specificity, magnitude, and kinetics of MOG-specific CD8+ T cell responses during experimental autoimmune encephalomyelitis. *Eur J Immunol* **35**, 76-85, doi:10.1002/eji.200425660 (2005).
- 82 Steckner, C. *et al.* Alteration of the cytokine signature by various TLR ligands in different T cell populations in MOG37-50 and MOG35-55-induced EAE in C57BL/6 mice. *Clin Immunol* **170**, 22-30, doi:10.1016/j.clim.2016.05.008 (2016).
- 83 Li, J., Zhao, X., Skoff, R., Shaw, M. K. & Tse, H. Y. Differential levels of resistance to disease induction and development of relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis in two H-2b-restricted mouse strains. *Journal of neuroimmunology* **234**, 109-114, doi:10.1016/j.jneuroim.2011.03.008 (2011).
- 84 Tsunoda, I., Kuang, L. Q., Theil, D. J. & Fujinami, R. S. Antibody association with a novel model for primary progressive multiple sclerosis: induction of relapsing-remitting and progressive forms of EAE in H2s mouse strains. *Brain pathology* **10**, 402-418 (2000).
- 85 Tuohy, V. K., Lu, Z., Sobel, R. A., Laursen, R. A. & Lees, M. B. Identification of an encephalitogenic determinant of myelin proteolipid protein for SJL mice. *Journal of immunology* **142**, 1523-1527 (1989).

- 86 McRae, B. L. *et al.* Induction of active and adoptive relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) using an encephalitogenic epitope of proteolipid protein. *Journal of neuroimmunology* **38**, 229-240 (1992).
- 87 Amor, S. *et al.* Encephalitogenic epitopes of myelin basic protein, proteolipid protein, myelin oligodendrocyte glycoprotein for experimental allergic encephalomyelitis induction in Biozzi ABH (H-2Ag7) mice share an amino acid motif. *Journal of immunology* **156**, 3000-3008 (1996).
- 88 Laule, C. *et al.* Magnetic resonance imaging of myelin. *Neurotherapeutics : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics* **4**, 460-484, doi:10.1016/j.nurt.2007.05.004 (2007).
- 89 Klein, L., Klugmann, M., Nave, K. A., Tuohy, V. K. & Kyewski, B. Shaping of the autoreactive T-cell repertoire by a splice variant of self protein expressed in thymic epithelial cells. *Nature medicine* **6**, 56-61, doi:10.1038/71540 (2000).
- 90 Stecca, B. *et al.* The evolution of lipophilin genes from invertebrates to tetrapods: DM-20 cannot replace proteolipid protein in CNS myelin. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **20**, 4002-4010 (2000).
- 91 Morris-Downes, M. M. *et al.* Encephalitogenic and immunogenic potential of myelin-associated glycoprotein (MAG), oligodendrocyte-specific glycoprotein (OSP) and 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase (CNPase) in ABH and SJL mice. *Journal of neuroimmunology* **122**, 20-33 (2002).
- 92 Ford, M. L. & Evavold, B. D. Modulation of MOG 37-50-specific CD8+ T cell activation and expansion by CD43. *Cellular immunology* **240**, 53-61, doi:10.1016/j.cellimm.2006.06.007 (2006).
- 93 Gage, G. J., Kipke, D. R. & Shain, W. Whole animal perfusion fixation for rodents. *J Vis Exp*, doi:10.3791/3564 (2012).
- 94 Saiki, R. K. *et al.* Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**, 487-491 (1988).
- 95 Czerkinsky, C. C., Nilsson, L. A., Nygren, H., Ouchterlony, O. & Tarkowski, A. A solid-phase enzyme-linked immunospot (ELISPOT) assay for enumeration of specific antibody-secreting cells. *Journal of immunological methods* **65**, 109-121 (1983).
- 96 Picot, J., Guerin, C. L., Le Van Kim, C. & Boulanger, C. M. Flow cytometry: retrospective, fundamentals and recent instrumentation. *Cytotechnology* **64**, 109-130, doi:10.1007/s10616-011-9415-0 (2012).
- 97 Hofstetter, H. H. *et al.* Therapeutic efficacy of IL-17 neutralization in murine experimental autoimmune encephalomyelitis. *Cell Immunol* **237**, 123-130, doi:10.1016/j.cellimm.2005.11.002 (2005).
- 98 Zimmermann, C. *et al.* T cell activation status determines the cytokine pattern induced by zymosan and bacterial DNA both in thymocytes and splenocytes. *Clin Exp Immunol* **172**, 245-253, doi:10.1111/cei.12037 (2013).
- 99 Compston, A. & Coles, A. Multiple sclerosis. *Lancet* **372**, 1502-1517, doi:10.1016/S0140-6736(08)61620-7 (2008).
- 100 Stromnes, I. M. & Goverman, J. M. Passive induction of experimental allergic encephalomyelitis. *Nat Protoc* **1**, 1952-1960, doi:10.1038/nprot.2006.284 (2006).
- 101 Komiyama, Y. *et al.* IL-17 plays an important role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* **177**, 566-573 (2006).
- 102 Huber, M. *et al.* A Th17-like developmental process leads to CD8(+) Tc17 cells with reduced cytotoxic activity. *Eur J Immunol* **39**, 1716-1725, doi:10.1002/eji.200939412 (2009).
- 103 Mendel Kerlero de Rosbo, N. & Ben-Nun, A. Delineation of the minimal encephalitogenic epitope within the immunodominant region of myelin oligodendrocyte glycoprotein: diverse V beta gene usage by T cells recognizing the core epitope encephalitogenic for T cell receptor V beta b and T cell receptor V beta a H-2b mice. *Eur J Immunol* **26**, 2470-2479, doi:10.1002/eji.1830261030 (1996).
- 104 Vanderlugt, C. L. & Miller, S. D. Epitope spreading in immune-mediated diseases: implications for immunotherapy. *Nat Rev Immunol* **2**, 85-95, doi:10.1038/nri724 (2002).
- 105 McRae, B. L., Vanderlugt, C. L., Dal Canto, M. C. & Miller, S. D. Functional evidence for epitope spreading in the relapsing pathology of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med* **182**, 75-85 (1995).

- 106 Tuohy, V. K. & Kinkel, R. P. Epitope spreading: a mechanism for progression of autoimmune disease. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* **48**, 347-351 (2000).
- 107 Qu, N. *et al.* Pivotal roles of T-helper 17-related cytokines, IL-17, IL-22, and IL-23, in inflammatory diseases. *Clin Dev Immunol* **2013**, 968549, doi:10.1155/2013/968549 (2013).
- 108 Tabarkiewicz, J., Pogoda, K., Karczmarczyk, A., Pozarowski, P. & Giannopoulos, K. The Role of IL-17 and Th17 Lymphocytes in Autoimmune Diseases. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* **63**, 435-449, doi:10.1007/s00005-015-0344-z (2015).
- 109 Matusevicius, D. *et al.* Interleukin-17 mRNA expression in blood and CSF mononuclear cells is augmented in multiple sclerosis. *Mult Scler* **5**, 101-104, doi:10.1177/135245859900500206 (1999).
- 110 Zhang, G. X. *et al.* Induction of experimental autoimmune encephalomyelitis in IL-12 receptor-beta 2-deficient mice: IL-12 responsiveness is not required in the pathogenesis of inflammatory demyelination in the central nervous system. *J Immunol* **170**, 2153-2160 (2003).
- 111 Onishi, R. M. & Gaffen, S. L. Interleukin-17 and its target genes: mechanisms of interleukin-17 function in disease. *Immunology* **129**, 311-321, doi:10.1111/j.1365-2567.2009.03240.x (2010).
- 112 Segal, B. M. Th17 cells in autoimmune demyelinating disease. *Semin Immunopathol* **32**, 71-77, doi:10.1007/s00281-009-0186-z (2010).
- 113 Jadidi-Niaragh, F. & Mirshafiey, A. Th17 cell, the new player of neuroinflammatory process in multiple sclerosis. *Scand J Immunol* **74**, 1-13, doi:10.1111/j.1365-3083.2011.02536.x (2011).
- 114 Hofstetter, H. H. *et al.* The cytokine signature of MOG-specific CD4 cells in the EAE of C57BL/6 mice. *J Neuroimmunol* **170**, 105-114, doi:10.1016/j.jneuroim.2005.09.004 (2005).
- 115 Hofstetter, H. H. *et al.* Does the frequency and avidity spectrum of the neuroantigen-specific T cells in the blood mirror the autoimmune process in the central nervous system of mice undergoing experimental allergic encephalomyelitis? *J Immunol* **174**, 4598-4605 (2005).
- 116 Bettini, M., Rosenthal, K. & Evavold, B. D. Pathogenic MOG-reactive CD8+ T cells require MOG-reactive CD4+ T cells for sustained CNS inflammation during chronic EAE. *J Neuroimmunol* **213**, 60-68, doi:10.1016/j.jneuroim.2009.05.017 (2009).
- 117 Leuenberger, T. *et al.* The role of CD8+ T cells and their local interaction with CD4+ T cells in myelin oligodendrocyte glycoprotein35-55-induced experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* **191**, 4960-4968, doi:10.4049/jimmunol.1300822 (2013).
- 118 Tzartos, J. S. *et al.* 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**, 146-155, doi:10.2353/ajpath.2008.070690 (2008).
- 119 Ignatius Arokia Doss, P. M., Roy, A. P., Wang, A., Anderson, A. C. & Rangachari, M. The Non-Obese Diabetic Mouse Strain as a Model to Study CD8(+) T Cell Function in Relapsing and Progressive Multiple Sclerosis. *Front Immunol* **6**, 541, doi:10.3389/fimmu.2015.00541 (2015).
- 120 Melzer, N., Meuth, S. G. & Wiendl, H. CD8+ T cells and neuronal damage: direct and collateral mechanisms of cytotoxicity and impaired electrical excitability. *FASEB J* **23**, 3659-3673, doi:10.1096/fj.09-136200 (2009).
- 121 Vigano, S. *et al.* Functional avidity: a measure to predict the efficacy of effector T cells? *Clin Dev Immunol* **2012**, 153863, doi:10.1155/2012/153863 (2012).
- 122 Hesse, M. D., Karulin, A. Y., Boehm, B. O., Lehmann, P. V. & Tary-Lehmann, M. A T cell clone's avidity is a function of its activation state. *Journal of immunology* **167**, 1353-1361 (2001).
- 123 Flugel, A. *et al.* Migratory activity and functional changes of green fluorescent effector cells before and during experimental autoimmune encephalomyelitis. *Immunity* **14**, 547-560 (2001).
- 124 Kawai, T. & Akira, S. Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. *Immunity* **34**, 637-650, doi:10.1016/j.immuni.2011.05.006 (2011).
- 125 Lee, C. C., Avalos, A. M. & Ploegh, H. L. Accessory molecules for Toll-like receptors and their function. *Nat Rev Immunol* **12**, 168-179, doi:10.1038/nri3151 (2012).
- 126 Jarnicki, A. G. *et al.* Attenuating regulatory T cell induction by TLR agonists through inhibition of p38 MAPK signaling in dendritic cells enhances their efficacy as vaccine adjuvants and cancer immunotherapeutics. *J Immunol* **180**, 3797-3806 (2008).

- 127 Brereton, C. F., Sutton, C. E., Lalor, S. J., Lavelle, E. C. & Mills, K. H. Inhibition of ERK MAPK suppresses IL-23- and IL-1-driven IL-17 production and attenuates autoimmune disease. *J Immunol* **183**, 1715-1723, doi:10.4049/jimmunol.0803851 (2009).
- 128 Krieg, A. M. CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects. *Annu Rev Immunol* **20**, 709-760, doi:10.1146/annurev.immunol.20.100301.064842 (2002).
- 129 Akira, S., Uematsu, S. & Takeuchi, O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* **124**, 783-801, doi:10.1016/j.cell.2006.02.015 (2006).
- 130 Thorburn, A. N. *et al.* TLR2, TLR4 AND MyD88 Mediate Allergic Airway Disease (AAD) and Streptococcus pneumoniae-Induced Suppression of AAD. *PLoS One* **11**, e0156402, doi:10.1371/journal.pone.0156402 (2016).
- 131 Akashi-Takamura, S. & Miyake, K. TLR accessory molecules. *Curr Opin Immunol* **20**, 420-425, doi:10.1016/j.coi.2008.07.001 (2008).
- 132 Liu, J., Cao, S., Herman, L. M. & Ma, X. Differential regulation of interleukin (IL)-12 p35 and p40 gene expression and interferon (IFN)-gamma-primed IL-12 production by IFN regulatory factor 1. *J Exp Med* **198**, 1265-1276, doi:10.1084/jem.20030026 (2003).
- 133 Guo, B., Chang, E. Y. & Cheng, G. The type I IFN induction pathway constrains Th17-mediated autoimmune inflammation in mice. *J Clin Invest* **118**, 1680-1690, doi:10.1172/JCI33342 (2008).
- 134 Inoue, S., Niihara, M., Mineo, S. & Kobayashi, F. Roles of IFN-gamma and gammadelta T Cells in Protective Immunity Against Blood-Stage Malaria. *Front Immunol* **4**, 258, doi:10.3389/fimmu.2013.00258 (2013).
- 135 Flesch, I. E. *et al.* Early interleukin 12 production by macrophages in response to mycobacterial infection depends on interferon gamma and tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med* **181**, 1615-1621 (1995).
- 136 Suzue, K., Asai, T., Takeuchi, T. & Koyasu, S. In vivo role of IFN-gamma produced by antigen-presenting cells in early host defense against intracellular pathogens. *Eur J Immunol* **33**, 2666-2675, doi:10.1002/eji.200323292 (2003).
- 137 Marta, M., Andersson, A., Isaksson, M., Kampe, O. & Lobell, A. Unexpected regulatory roles of TLR4 and TLR9 in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Eur J Immunol* **38**, 565-575, doi:10.1002/eji.200737187 (2008).
- 138 Prinz, M. *et al.* Innate immunity mediated by TLR9 modulates pathogenicity in an animal model of multiple sclerosis. *J Clin Invest* **116**, 456-464, doi:10.1172/JCI26078 (2006).
- 139 Touil, T., Fitzgerald, D., Zhang, G. X., Rostami, A. & Gran, B. Cutting Edge: TLR3 stimulation suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis by inducing endogenous IFN-beta. *J Immunol* **177**, 7505-7509 (2006).
- 140 Ozinsky, A. *et al.* The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 13766-13771, doi:10.1073/pnas.250476497 (2000).
- 141 Frasnelli, M. E., Tarussio, D., Chobaz-Peclat, V., Busso, N. & So, A. TLR2 modulates inflammation in zymosan-induced arthritis in mice. *Arthritis Res Ther* **7**, R370-379, doi:10.1186/ar1494 (2005).
- 142 Gross, O. *et al.* Card9 controls a non-TLR signalling pathway for innate anti-fungal immunity. *Nature* **442**, 651-656, doi:10.1038/nature04926 (2006).
- 143 Veldhoen, M., Hocking, R. J., Flavell, R. A. & Stockinger, B. Signals mediated by transforming growth factor-beta initiate autoimmune encephalomyelitis, but chronic inflammation is needed to sustain disease. *Nat Immunol* **7**, 1151-1156, doi:10.1038/ni1391 (2006).
- 144 Saijo, S. *et al.* Dectin-1 is required for host defense against *Pneumocystis carinii* but not against *Candida albicans*. *Nat Immunol* **8**, 39-46, doi:10.1038/ni1425 (2007).
- 145 Veldhoen, M. *et al.* Transforming growth factor-beta 'reprograms' the differentiation of T helper 2 cells and promotes an interleukin 9-producing subset. *Nat Immunol* **9**, 1341-1346, doi:10.1038/ni.1659 (2008).
- 146 Volman, T. J., Hendriks, T. & Goris, R. J. Zymosan-induced generalized inflammation: experimental studies into mechanisms leading to multiple organ dysfunction syndrome. *Shock* **23**, 291-297 (2005).
- 147 Brown, G. D. Dectin-1: a signalling non-TLR pattern-recognition receptor. *Nat Rev Immunol* **6**, 33-43, doi:10.1038/nri1745 (2006).

- 148 Lucchinetti, C. *et al.* Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination. *Ann Neurol* **47**, 707-717 (2000).
- 149 Caramalho, I. *et al.* Regulatory T cells selectively express toll-like receptors and are activated by lipopolysaccharide. *J Exp Med* **197**, 403-411 (2003).
- 150 Imanishi, T. *et al.* Cutting edge: TLR2 directly triggers Th1 effector functions. *J Immunol* **178**, 6715-6719 (2007).
- 151 Gelman, A. E., Zhang, J., Choi, Y. & Turka, L. A. Toll-like receptor ligands directly promote activated CD4+ T cell survival. *J Immunol* **172**, 6065-6073 (2004).
- 152 Wong, C. K. *et al.* Activation profile of Toll-like receptors of peripheral blood lymphocytes in patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Immunol* **159**, 11-22, doi:10.1111/j.1365-2249.2009.04036.x (2010).
- 153 Hornung, V. *et al.* Quantitative expression of toll-like receptor 1-10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides. *J Immunol* **168**, 4531-4537 (2002).
- 154 Rahman, A. H., Taylor, D. K. & Turka, L. A. The contribution of direct TLR signaling to T cell responses. *Immunologic research* **45**, 25-36, doi:10.1007/s12026-009-8113-x (2009).
- 155 Darabi, K. *et al.* The third signal in T cell-mediated autoimmune disease? *Journal of immunology* **173**, 92-99 (2004).
- 156 Bevan, M. J. Helping the CD8(+) T-cell response. *Nature reviews. Immunology* **4**, 595-602, doi:10.1038/nri1413 (2004).
- 157 Kaufmann, S. H. The contribution of immunology to the rational design of novel antibacterial vaccines. *Nat Rev Microbiol* **5**, 491-504, doi:10.1038/nrmicro1688 (2007).
- 158 Cristofaro, P. & Opal, S. M. The Toll-like receptors and their role in septic shock. *Expert Opin Ther Targets* **7**, 603-612, doi:10.1517/14728222.7.5.603 (2003).
- 159 Li, J., Carr, B., Goyal, M. & Gaieski, D. F. Sepsis: the inflammatory foundation of pathophysiology and therapy. *Hosp Pract (1995)* **39**, 99-112, doi:10.3810/hp.2011.08.585 (2011).
- 160 Matsui, N., Nitta, T. & Takahama, Y. [Development of the thymus and immune system]. *Brain Nerve* **63**, 679-684 (2011).
- 161 Gantner, B. N., Simmons, R. M., Canavera, S. J., Akira, S. & Underhill, D. M. Collaborative induction of inflammatory responses by dectin-1 and Toll-like receptor 2. *J Exp Med* **197**, 1107-1117, doi:10.1084/jem.20021787 jem.20021787 [pii] (2003).
- 162 Hofstetter, H. H., Luhder, F., Toyka, K. V. & Gold, R. IL-17 production by thymocytes upon CD3 stimulation and costimulation with microbial factors. *Cytokine* **34**, 184-197, doi:10.1016/j.cyto.2006.04.014 (2006).
- 163 Smolianov, V. *et al.* Ex vivo activation of naturally occurring IL-17-producing T cells does not require IL-6. *Cytokine*, doi:S1043-4666(12)00025-7 [pii] 10.1016/j.cyto.2012.01.010 (2012).
- 164 Wang, S. D., Huang, K. J., Lin, Y. S. & Lei, H. Y. Sepsis-induced apoptosis of the thymocytes in mice. *J Immunol* **152**, 5014-5021 (1994).
- 165 Billard, M. J., Gruver, A. L. & Sempowski, G. D. Acute endotoxin-induced thymic atrophy is characterized by intrathymic inflammatory and wound healing responses. *PloS one* **6**, e17940, doi:10.1371/journal.pone.0017940 (2011).
- 166 Kim, J. S., Smith-Garvin, J. E., Koretzky, G. A. & Jordan, M. S. The requirements for natural Th17 cell development are distinct from those of conventional Th17 cells. *The Journal of experimental medicine* **208**, 2201-2207, doi:10.1084/jem.20110680 (2011).
- 167 Marks, B. R. *et al.* Thymic self-reactivity selects natural interleukin 17-producing T cells that can regulate peripheral inflammation. *Nature immunology* **10**, 1125-1132, doi:10.1038/ni.1783 (2009).
- 168 Kishimoto, T. The biology of interleukin-6. *Blood* **74**, 1-10 (1989).
- 169 Tanaka, T. & Kishimoto, T. Targeting interleukin-6: all the way to treat autoimmune and inflammatory diseases. *Int J Biol Sci* **8**, 1227-1236, doi:10.7150/ijbs.4666 (2012).
- 170 Li, H. *et al.* Low dose zymosan ameliorates both chronic and relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* **254**, 28-38, doi:10.1016/j.jneuroim.2012.08.013 (2013).
- 171 Holdsworth, S. R., Kitching, A. R. & Tipping, P. G. Th1 and Th2 T helper cell subsets affect patterns of injury and outcomes in glomerulonephritis. *Kidney international* **55**, 1198-1216, doi:10.1046/j.1523-1755.1999.00369.x (1999).

- 172 van de Veerdonk, F. L. *et al.* Differential effects of IL-17 pathway in disseminated candidiasis and zymosan-induced multiple organ failure. *Shock* **34**, 407-411, doi:10.1097/SHK.0b013e3181d67041 (2010).
- 173 Stuve, O. *et al.* Clinical stabilization and effective B-lymphocyte depletion in the cerebrospinal fluid and peripheral blood of a patient with fulminant relapsing-remitting multiple sclerosis. *Archives of neurology* **62**, 1620-1623, doi:10.1001/archneur.62.10.1620 (2005).
- 174 Milo, R. Therapeutic strategies targeting B-cells in multiple sclerosis. *Autoimmunity reviews*, doi:10.1016/j.autrev.2016.03.006 (2016).
- 175 Huber, M. *et al.* IL-17A secretion by CD8+ T cells supports Th17-mediated autoimmune encephalomyelitis. *J Clin Invest* **123**, 247-260, doi:10.1172/JCI63681 (2013).
- 176 Gambuzza, M. *et al.* Targeting Toll-like receptors: emerging therapeutics for multiple sclerosis management. *Journal of neuroimmunology* **239**, 1-12, doi:S0165-5728(11)00227-X [pii] 10.1016/j.jneuroim.2011.08.010 (2011).
- 177 Marta, M. Toll-like receptors in multiple sclerosis mouse experimental models. *Ann N Y Acad Sci* **1173**, 458-462, doi:10.1111/j.1749-6632.2009.04849.x (2009).
- 178 Gooshe, M., Aleyasin, A. R., Abdolghaffari, A. H. & Rezaei, N. Toll like receptors: a new hope on the horizon to treat multiple sclerosis. *Expert Rev Clin Immunol* **10**, 1277-1279, doi:10.1586/1744666X.2014.953061 (2014).

10 Abkürzungen

AAD	<i>Allergic Airway Disease</i>
APZ	antigenpräsentierende Zellen
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat
BHS	Blut-Hirn-Schranke
BSA	Bovine Serum Albumin
bspw.	beispielsweise
CBM	CARD9-BCL10-MALT1
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CFA	<i>complete Freund adjuvant</i>
CSF	<i>colony stimulating factors</i>
Ct	<i>cycle threshold</i>
CTL	<i>cytotoxic T-lymphocyte</i>
CREB	<i>cyclic AMP response element-binding protein</i>
C/EBPs	<i>CCAAT/enhancer-binding proteins</i>
DAMP	<i>Danger-associated molekular pattern</i>
DMEM	Dulbecco's Modified Eagke Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DZ	Dendritische Zellen
EAE	Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis
ELISpot	<i>enzyme-linked Immunospot</i>
ERK	<i>extracellular-signalregulated kinase</i>
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSC	<i>forward scatter</i>
IFA	Incomplete Freund adjuvans
IFN	Interferon
IFNAR	Typ-I-IFN Rezeptor
IKK	I κ B kinase
IRAK	Interleukin-Rezeptor assoziierte Kinase
IRF	<i>Interferon regulatory factor</i>
IL	Interleukin
JAK	Janus Kinase
JNK	<i>c-Jun N-terminal kinase</i>
LPS	Lipopolysaccharid
MACS	<i>magnetic activated cell sorting</i>
MAG	Myelin-assoziiertes Glykoprotein

MAL	<i>MyD88 adaptor like</i>
MAPKs	<i>mitogen-activated protein kinases</i>
MBP	<i>myelin basic protein</i>
MD-2	<i>myeloid differentiation factor 2</i>
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
MOG	Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein
MS	Multiple Sklerose
MyD88	<i>myeloid differentiation primary response gene 88</i>
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
NF	<i>Nuclear factor</i>
NK-Zellen	Natürliche Killer Zellen
NKT-Zellen	Natürliche Killer T-Zellen
NOD	<i>Nucleotide-binding oligomerization domain</i>
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PAMP	<i>pathogen-associated molecular pattern</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PE	Phycoerythrin
PI3K	<i>phosphoinositide 3-kinase</i>
PLP	Proteolipid-Protein
PPMS	<i>primary-progressive MS</i>
PTx	Pertussis Toxin
PRR	<i>pattern recognition receptor</i>
Raf1	<i>rapid accelerated fibrosarcoma</i>
RIP1	<i>receptor-interacting protein 1</i>
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
RRMS	<i>relapsing-remitting MS</i>
RT	Raumtemperatur
SIRS	<i>sytemic inflammatory response syndrome</i>
SSC	<i>side scatter</i>
STAT	<i>signal transducers and activation of transcription</i>
Syk	<i>spleen tyrosine kinase</i>
TAK	TGF β -aktivierte Kinase 1
TBK1	<i>TANK-binding kinase 1</i>
T _C	zytotoxische T-Zelle
T _H	T-Helferzelle

TIR	Toll-/Interleukin-1 Rezeptor
TIRAP	<i>Toll-interleukin 1 receptor domain containing adaptor protein</i>
TRAF	<i>TNF receptor associated factor</i>
TRAM/TICAM 2	<i>TRIF-related adaptor molecule</i>
T _{reg}	regulatorische T-Zelle
TRIF	<i>TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-β</i>
TLR	Toll-like-Rezeptor
TNF	<i>tumor-necrosis factor</i>
TZR/TCR	T-Zell-Rezeptor/ <i>T cell receptor</i>
ZNS	zentrales Nervensystem

11 Abbildungen und Tabellen

11.1 Abbildungen

Abb. 1.1:	Die Entwicklung der Blutzellen aus einer hämatopoetischen Stammzelle	2
Abb. 1.2:	Das Immunsystem nach einer Infektion: Ein Überblick	3
Abb. 1.3:	Die Differenzierung von T-Helferzellen	6
Abb. 1.4:	Übersicht über die verwendeten PAMPs, ihre Rezeptoren und Signalwege	9
Abb. 1.5:	Immunpathogenese der Multiplen Sklerose	13
Abb. 1.6:	Verlaufsformen der Multiplen Sklerose	14
Abb. 1.7:	Myelinstruktur im ZNS und Antigenkandidaten	17
Abb. 3.1:	Immunisierung der Mäuse mit Antigen-Emulsion und PTX	26
Abb. 3.2:	Perfusion der Tiere	27
Abb. 3.3:	Neubauer-Zählkammer	28
Abb. 3.4:	Schematische Darstellung der Zellseparation mit EasySep™ und die Reinheitsüberprüfung mittels FACS-Analyse.	30
Abb. 3.5:	Manuelle Zell-Separation mit der MACS Technologie (Miltenyi Biotec) und die Reinheitsüberprüfung mittels FACS-Analyse	31
Abb. 3.6:	Schematische Darstellung eines ELISpot-Assay	36
Abb. 3.7:	Prinzip der Durchflusszytometrie	37
Abb. 3.8:	Dot Plot	38
Abb. 4.1:	Klinischer EAE-Score	43
Abb. 4.2:	Zytokinprofil innerhalb der MOG ₃₇₋₅₀ /CFA/PTX- und MOG ₃₅₋₅₅ /CFA/PTX-induzierten EAE, sezerniert von Splenozyten und gemessen mittels ELISpot-Assay	46
Abb. 4.3:	Intrazelluläre FACS-Analyse der MOG ₃₇₋₅₀ - (A) und MOG ₃₅₋₅₅ -spezifischen (B) IFN- γ - und IL-17-Antwort innerhalb des fortschreitenden EAE-Verlaufs	48
Abb. 4.4:	Zytokinprofil innerhalb der MOG ₃₇₋₅₀ /CFA/PTX-induzierten EAE, sezerniert von Zellen aus dem Rückenmark und gemessen mittels ELISpot-Assay	51
Abb. 4.5:	Relative IL-17-Expression ZNS-infiltrierender T-Zellen	53
Abb. 4.6:	Die funktionelle Avidität der MOG ₃₇₋₅₀ -spezifischen IL-17-sezernierenden Splenozyten im chronischen Autoimmunprozess	55
Abb. 4.7:	Das Zytokinprofil antigengeprimter und ungeprimter T-Zellen aus der Peripherie nach Stimulation mit verschiedenen PAMPs, analysiert mittels ELISpot-Assay	57
Abb. 4.8:	Intrazelluläre FACS-Analyse antigengeprimter und ungeprimter T-Zellen aus der Peripherie nach Stimulation mit verschiedenen PAMPs	62

Abb. 4.9:	IL-17-Sekretion CD4 ⁺ und CD8 ⁺ naiver und MOG ₃₇₋₅₀ -spezifischer T-Zellen nach Kostimulation mit verschiedenen PAMPs und Zugabe von APZ	68
Abb. 4.10:	IL-17-Sekretion MOG ₃₇₋₅₀ -induzierter T-Zellen im Rückenmark nach Stimulation mit verschiedenen PAMPs und analysiert mittels ELISpot-Assay	71
Abb. 4.11:	Der Einfluss von Zymosan auf das Zytokinprofil naiver Thymozyten und Splenozyten mit und ohne Aktivierung des T-Zell-Rezeptors mit α CD3	75
Abb. 4.12:	Der Einfluss von CpG auf das Zytokinprofil naiver Thymozyten und Splenozyten mit und ohne Aktivierung des T-Zell-Rezeptors mit α CD3	80
Abb. 4.13:	Der Einfluss von Zymosan auf das Zytokinprofil antigenspezifischer T-Zell vermittelter Immunantwort	84
Abb. 5.1:	Übersicht verschiedener TLR-Signalwege	94
Abb. 6.1:	Übersicht über die vielen Behandlungsstrategien in der Multiplen Sklerose	105

11.2 Tabellen

Tab. 1.1:	Übersicht verschiedener Zytokine, ihrer Quelle und Funktion	7
Tab. 1.2:	Übersicht ausgewählter muriner EAE-Modelle	16
Tab. 3.1:	Firmen und ihr Sitz	19
Tab. 3.2:	Verwendete Geräte und ihre Hersteller	20
Tab. 3.3:	Verwendete Verbrauchsmaterialien und ihre Hersteller	21
Tab. 3.4:	Verwendete Chemikalien und die Bezugsquelle	22
Tab. 3.5:	Verwendete Kits und die Bezugsquelle	23
Tab. 3.6:	Verwendete Substanzen und die Bezugsquelle	23
Tab. 3.7:	Verwendete Lösungen und die Bezugsquelle	23
Tab. 3.8:	Verwendete Medien und die Bezugsquelle	23
Tab. 3.9:	Verwendete Puffer und ihre Zusammensetzung	24
Tab. 3.10:	Verwendete Software und ihre Hersteller	24
Tab. 3.11:	Verwendete Mauslinien und ihre Herkunft	25
Tab. 3.12:	Komponenten der Antigen-Emulsion	25
Tab. 3.13:	Klinischer EAE-Score	26
Tab. 3.14:	Verwendete Antigene	31
Tab. 3.15:	Einzelne Komponenten des qRT-PCR-Ansatzes	33
Tab. 3.16:	Oligonukleotidprimer für die qRT-PCR	33
Tab. 3.17:	Programm der qRT-PCR	34
Tab. 3.18:	Formeln zu Berechnung der relativen Expression	34
Tab. 3.19:	Für den ELISpot verwendete monoklonale Primärantikörper	35
Tab. 3.20:	Für den ELISpot verwendete, biotinylierter Sekundärantikörper	35
Tab. 3.21:	Für das FACS verwendete Antikörper	39
Tab. 3.22:	Gegenüberstellung der verwendeten FACS-Geräte (nach Herstellerangaben)	40

12 Anhang

12.1 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt...

- ... an erster Stelle Herrn PD Dr. Harald H. Hofstetter für die Vergabe des hochinteressanten Themas sowie für die exzellente und engagierte wissenschaftliche Betreuung.
- ... Frau Prof. Dr. Christine R. Rose für die Übernahme des Korreferates.
- ... meinem Mitdoktoranden Andreas für die Unterstützung, konstruktive Kritik und die nette Gesellschaft. Andreas, danke für die gute Zusammenarbeit.
- ... Felicitas für die vielen netten Gespräche, ihre stete Hilfsbereitschaft und das Korrigieren meiner Arbeiten.
- ... allen Mitarbeitern der AG Kieseier, speziell Kathleen, Anne, Max, Thomas und Zippora für die tatkräftige Unterstützung und das tolle Arbeitsklima. Kathleen, danke für deine helfende Hand, das Korrekturlesen meiner Arbeiten und die Schublade voller Schokolade.
- ... allen Mitarbeitern des neurochemischen Labors für die Hilfestellung bei Problemen des Laboralltags und netten Gesprächen fachlicher sowie privater Natur.
- ... meiner Familie und meinen Freunden für ihre Unterstützung und den Rückhalt. Bei Kristina und Kathrin möchte ich mich zusätzlich herzlich für die wissenschaftlichen Ratschläge und das Korrekturlesen bedanken.

12.2 Publikationen und Kongressbeiträge

12.2.1 Publikationen

- 2016 **Steckner C**, Weber A, Mausberg AK, Heininger M, Opdenhovel F, Kieseier BC, Hartung HP, Hofstetter HH. **Alteration of the cytokine signature by various TLR ligands in different T cell populations in MOG37-50 and MOG35-55-induced EAE in C57BL/6 mice.** Clin Immunol. 2016;170:22-30. Epub 2016/05/29.
- Weber A, **Zimmermann C**, Mausberg AK, Dehmel T, Kieseier BC, Hartung HP, Hofstetter HH. **Pseudomonas aeruginosa and its bacterial components influence the cytokine response in thymocytes and splenocytes.** Infection and Immunity 2016.
- 2014 Weber A, **Zimmermann C**, Kieseier BC, Hartung HP, Hofstetter HH. **Bacteria and their cell wall components uniformly co-activate IL-17- producing, thymocytes.** Clinical and experimental immunology 2014.
- 2013 Weber A, **Zimmermann C**, Meyer Zu Horste G, Kieseier BC, Hartung HP, Hofstetter HH. **Bacterial flagellin and diphtheria toxin co-stimulate IL-17producing thymocytes.** Cytokine 2013; 64:221-6.
- Weber A, **Zimmermann C**, Mausberg AK, Kieseier BC, Hartung HP, Hofstetter HH. **Induction of pro-inflammatory cytokine production in thymocytes by the immune response modifiers Imiquimod and Gardiquimod.** Int Immunopharmacol 2013; 17:427-31.
- Zimmermann C**, Weber A, Mausberg AK, Kieseier BC, Hartung HP, Hofstetter HH. **T cell activation status determines the cytokine pattern induced by zymosan and bacterial DNA both in thymocytes and splenocytes.** Clinical and experimental immunology 2013; 172:245-53.
- 2012 Albrecht P, Bouchachia I, Goebels N, Henke N, Hofstetter HH, Issberner A, Kovacs Z, Lewerenz J, Lisak D, Maher P, Mausberg AK, Quasthoff K, **Zimmermann C**, Hartung HP, Methner A. **Effects of dimethyl fumarate on neuroprotection and immunomodulation.** Journal of neuroinflammation 2012; 9:163.

12.2.2 Kongressbeiträge

- 09/2014
Poster 44th Annual Meeting German Society for Immunology (DGfI), Bonn
C. Zimmermann, A. Weber, A. K. Mausberg, B. C. Kieseier, H. P. Hartung and H. H. Hofstetter. **Characterization of IL-17-producing T cell populations in splenocytes and CNS cells in MOG 37-50 and MOG 35-55 EAE and costimulation with TLR-ligands.**
- 09/2013
Poster 43th Annual Meeting German Society for Immunology (DGfI), Mainz
C. Zimmermann, A. Weber, A. K. Mausberg, B. C. Kieseier, H. P. Hartung and H. H. Hofstetter. **T cell activation status determines the cytokine pattern induced by zymosan and bacterial DNA both in thymocytes and splenocytes.**

12.3 Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

12.4 Erklärungen

Hiermit versichere ich an Eides Statt, dass die Dissertation von mir selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“ erstellt worden ist.

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

Ort, Datum

Corinna Steckner