

Toleranzinduktion in der Darmmukosa in Modellen spontaner autoimmuner Enzephalomyelitis



HEINRICH HEINE
UNIVERSITÄT DÜSSELDORF

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrads (Dr. rer. nat.)
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Vorgelegt von

Steffen Haupeltshofer

aus Essen

Düsseldorf, März 2019

aus dem Leibniz-Institut für umweltmedizinische Forschung
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

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

Berichterstatter:

1. Gutachter: Prof. Dr. Charlotte Esser

2. Gutachter: Prof. Dr. Dieter Willbold

Tag der mündlichen Prüfung 31.07.2019

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

Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen und habe diese Dissertation in vorliegender oder ähnlicher Form in keiner anderen Institution eingereicht.

Steffen Haupeltshofer, März 2019

Inhalt

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....	5
Abkürzungsverzeichnis	6
1. Zusammenfassung.....	7
1. Summary	9
2 Einleitung	11
2.1 Multiple Sklerose	13
2.1.1 Epidemiologie	13
2.1.2 Subtypen der MS.....	13
2.1.3 Pathophysiologie	14
2.2 Die Rolle von Smad7 in der T-Zell-Differenzierung und Autoimmunität	16
2.3 Das Immunsystems des Darms	20
2.4 Aufbau und Immunsystem des Darms	21
2.5 Das Darmmikrobiom und dessen Einfluss auf das Immunsystem.....	25
2.6. Relevante Tiermodelle demyelinisierender Erkrankungen	27
2.6.1 Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis (EAE)	27
2.6.2 Optikospinale Enzephalomyelitis (OSE)	27
2.6 Fragestellung	29
3 Material und Methoden	30
3.1 Verbrauchsmittel	30
3.1.1 Reagenzien und Chemikalien.....	30
3.1.2 Kits und PCR Mastermix	31
3.1.3 Zytokine und Antikörper für Zellkultur	32
3.1.4 PCR Primer (Maus).....	32
3.1.6 ELISA	32
3.1.7 Antikörper für Durchflusszytometrie und Histologie	33
3.1.8 Geräte	34
3.1.9 Programme	35
3.1.10 Medium, Puffer und Lösungen	35
3.2 Methoden	38
3.2.1 Tiere und Krankheitsbewertung.....	38
3.2.2 Induktion der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE)	39
3.2.3 Antigene	39
3.2.4 Histologische Färbung von Mausgewebe	39
3.2.5 Durchflusszytometrie	40

3.2.5 Intrazelluläre Färbung	40
3.2.6 Analyse ZNS-infiltrierender Zellen und Adoptiver Transfer.....	40
3.2.7 Aufregulation der Darm-Homing-Rezeptoren	41
3.2.8 Das adoptive Transfer-EAE-Model	41
3.2.9 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)	41
3.2.10 Isolation der Lamina propria Lymphozyten.....	42
3.2.11 Real-time Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR).....	42
3.2.12 Proliferations-Assay	42
3.2.13 Suppressions-Assay.....	43
3.2.14 Eradikation des Darm-Mikrobioms.....	43
3.2.15 <i>In vivo</i> Proliferation von T-Zellen.....	43
3.2.16 Isolation von ZNS-infiltrierenden Lymphozyten.....	43
3.2.17 Permeabilität der Bluthirnschranke	44
3.2.187 Histologische Analyse humaner intestinaler Biopsien.....	44
3.2.19 Statistische Analyse	44
3.2.20 Studiengenehmigung.....	45
4. Ergebnisse	46
4.1 Der Phänotyp von OSE-Mäusen	46
4.3 Veränderungen der intestinalen Architektur und der Immunzellinfiltration während der OSE	52
4.4 Proliferation autoreaktiver T-Zellen	57
4.5 Autoreaktive intestinale T-Zellen induzieren ZNS-Autoimmunität	67
4.6 Migration von Darm-ständigen T-Zellen in das ZNS	73
4.6 Die Expression von Smad7 und T-Zell-Differenzierungsmarkern in der intestinalen Mukosa von Patienten mit Multipler Sklerose	85
5 Diskussion.....	91
5.1 Charakterisierung des Smad7-OSE-Mausmodells.....	92
5.1.1 TGF- β in der Darmmukosa	94
5.2 Einfluss des Mikrobioms auf die T-Zell-Differenzierung	94
5.3 Smad7 und Adoptiver Transfer	96
5.4 Die Rolle von Smad7 in der Multiplen Sklerose	98
5.5 Limitation in Maus und Mensch	99
5.6 Zusammenfassung und Ausblick	101
Danksagung.....	103
Referenzen.....	104
Anhang	115

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1: Subtypen der Multiple Sklerose.	14
Abbildung 2: Schematische Darstellung des TGF-beta- und BMP-Signalwegs.....	18
Abbildung 3 Differenzierung naiver T-Zellen in verschiedene Effektor- und regulatorischen T-Zellen.	24
Abbildung 4: Lymphozyten aus OSE-Mäusen mit T-Zell-spezifischer Smad7-Deletion oder Smad7-Überexpression.	47
Abbildung 5: Klinischer Verlauf von OSE-Mäusen mit T-Zell-spezifischer Smad7-Überexpression oder Smad7-Deletion.....	49
Tabelle 1: Klinische Statistik zu der Erkrankung von OSE- und OSE-Mäusen mit Smad7-Deletion oder Smad7-Überexpression.....	49
Abbildung 8: T-Zell-Analyse aus der Lamina propria.....	55
Abbildung 9: Histologische Untersuchung von T-Zell-Subtypen in der Lamina propria.	57
Abbildung 10: Analyse der MOG ₃₅₋₅₅ spezifischen CD4 ⁺ V α 3.2 ⁺ V β 11 ⁺ T-Zellen aus der Lamina propria.....	58
Abbildung 11: MOG ₃₅₋₅₅ -spezifische Proliferation von V α 3.2 ⁺ V β 11 ⁺ CD4 ⁺ T-Zellen.....	60
Abbildung 12: Suppressions-Assay reaktiver Smad7-manipulierter T-Lymphozyten ex vivo.	61
Abbildung 13: Proliferationsanalyse von T-Zellen in der Lamina propria in vivo.	63
Abbildung 15: Frequenz der anergischen und regulatorischen T-Zellen unter Smad7-Expression.....	66
Abbildung 16: Retinsäure abhängige Expression von intestinalen Homing Rezeptoren..	68
Abbildung 19: Histologische Analyse der Lamina propria zur Darstellung GFP-markierter T-Zellen nach adoptivem Transfer.....	74
Abbildung 20: Smad7-abhängige Suppressionsmechnismen von T-Zellen in der Lamina propria.	75
Abbildung 22: Infiltration adoptiv transferierter 2D2xGFP ⁺ CD4 ⁺ T-Zellen in das Rückenmark.....	77
Abbildung 24: Der T-Zelltyp in Rückenmarks-Läsionen wird von deren Smad7-Expression bestimmt.....	80
Tabelle 2: Klinische Statistik zum Immunglobulin-Titer aus dem Blut erkrankter OSE-Mäuse und von Tieren mit Smad7-Deletion oder Smad7-Überexpression.....	84
Abbildung 27: Permeabilisierung der Blut-Hirn-Schranke während der AT-EAE.	85
Abbildung 28: T-Helfer Zellen in der Lamina Propria von MS- und HC-Darmbiopsien.	86
Abbildung 30: TGF- β abhängige Veränderung der T-Zell-Polarisation im Darm von MS-Patienten.	88
Abbildung 31: Erhöhte Expression von Smad7 in der murinen Lamina propria bildet Befunde der MS-Biopsien ab.	90

Abkürzungsverzeichnis

AT = Adoptiver Transfer
APZ = Antigen präsentierende Zelle
BBB = Blut-Hirn-Schranke
BTN = Milchprotein Butyrophilin
CD = Morbus Crohn
CFSE = Carboxyfluoresceinsuccinimidylester
CFA = Komplettes Freundesches Adjuvants
ZNS = Zentrales Nervensystem
DC = Dendritische Zelle
EAE = Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis
IBD = *engl.* inflammatory bowel disease
ICL = Intrazellulärer Lymphozyt
IEL = Intraepithelialer Lymphozyt
Ig = Immunglobulin
IL = Interleukin
LAMP1 = *engl.* lymphocyte peyer's patch adhesion molecule 1
MAIT = *engl.* mucosal associated invariant T cells
MOG = Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein
MS = Multiple Sklerose
OSE = Optikospinale Enzephalomyelitis
PTX = Pertussistoxin
PFA = Paraformaldehyd
RA = Retinsäure
rMOG = rekombinantes Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein
Smad7 = *engl.* mothers against decapentaplegic homolog 7
TGF- β = *engl.* transforming growth factor beta
Th = T-Helfer-Zellen
Treg = Regulatorische T-Zellen
UC = Ulzerative Colitis
ZNS = Zentrales Nervensystem

1. Zusammenfassung

Der Signalweg des Zytokins *transforming growth factor* (TGF)- β wird durch das intrazelluläre Protein Smad7 reguliert. Smad7 ist an der Entstehung autoreaktiver T-Zellen beteiligt und könnte durch seine proinflammatorische Rolle Autoimmunerkrankungen wie Morbus Crohn und Multiple Sklerose (MS) beeinflussen. Im Kontext des stetig wachsenden Verständnisses von Induktionsmechanismen für die MS, ist der Darm im letzten Jahrzehnt in den Fokus der Forschung gerückt. Bisher ist unzureichend verstanden, welche Rolle das spezialisierte Immunsystem des Darms bei der Entstehung der MS spielt. Auch ist nicht bekannt, ob und auf welche Weise eine erhöhte Expression von Smad7 in T-Lymphozyten die Induktion von Autoimmunität gegenüber dem ZNS begünstigt

In dieser Dissertation wurde deshalb das experimentelle Mausmodell der Darmmikrobiom-induzierten, spontan entstehenden, optikospinalen Enzephalomyelitis (OSE) verwendet. Die ZNS-Entzündung in diesem Modell wird durch Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein (MOG)-Peptid₃₅₋₅₅ erkennende T- und B-Zellen ausgelöst. Zusätzlich wurde eine T-Zell-spezifische Smad7-Überexpression (Smad7^{CD2}) oder eine Smad7-Deletion (Smad7^{CD4-/-}) in OSE-Tiere eingebracht.

Die Überexpression von Smad7 in T-Zellen von OSE-Tieren führte zu einem schwereren Verlauf der Erkrankung. Eine Deletion von Smad7 in T-Zellen führte zu einem Schutz vor der Erkrankung. T-Zellen im Darm von Smad7^{CD2}-Tieren differenzierten überwiegend zu T-Helfer (Th)1-Zellen, wohingegen sich in Smad7^{CD4-/-}-Tieren überwiegend Th17- und regulatorische T-Zellen entwickelten. Die MOG₃₅₋₅₅-spezifische Proliferation von T-Zellen war in Smad7^{CD2}-Tieren gesteigert. Der adoptive Transfer autoreaktiver CD4⁺-T-Zellen zeigte, dass der Darm als Initiationsorgan für die Entstehung und Migration inflammatorischer CD4⁺-T-Zellen in das ZNS während der spontanen OSE obligat ist. Die Analyse der Läsionen im Rückenmark verdeutlichte, dass Darm-ständige T-Zellen abhängig von der Smad7-Expression den Entzündungsprozess steuern. Translationale Untersuchungen von Darmbiopsien von MS-Patienten bestätigten einen fehlregulierten TGF- β /Smad7-Signalweg und eine proinflammatorische Differenzierung von T-Zellen im menschlichen Darm, wie sie auch in Smad7^{CD2}-Mäusen zu finden war.

Zusammenfassend weisen die Daten dieser Arbeit auf die Bedeutung der Smad7-Expression in T-Zellen hin und identifizieren den Darm als möglichen Ausgangspunkt

für die Induktion der MS. Eine Überexpression von Smad7 in T-Zellen sorgt für die Überwindung der Toleranzmechanismen im Darm. Die nachfolgende Migration Darm-ständiger T-Zellen in das ZNS führt zur Entstehung entzündlicher Läsionen. Die Reduktion von Smad7 in T-Zellen schützt vor der Entstehung klinischer Symptome und könnte daher einen therapeutischen Nutzen als zukünftige MS-Behandlung bieten.

1. Summary

The signaling pathway of the cytokine transforming growth factor (TGF)- β is regulated by the intracellular protein Smad7. Smad7 is involved in the generation of auto-reactive T cells and by its proinflammatory nature can influence autoimmune diseases like Crohn's disease and multiple sclerosis (MS). In the context of the ever-growing understanding of induction mechanisms for MS, the gut has become the focus of research over the last decade. So far, the very specialized role of the intestinal immune system in the development of MS is insufficiently understood. It is also unknown whether and by which mechanisms an elevated expression of Smad7 in T cells favors the development of autoimmunity targeted against the central nervous system (CNS).

In this thesis, the experimental mouse model of gut microbiome-induced spontaneous optic-spinal encephalomyelitis (OSE) was used. CNS inflammation in this model is facilitated by myelin-oligodendrocyte-glycoprotein (MOG) peptide₃₅₋₅₅ recognizing T and B cells. In addition, a T cell-specific Smad7 overexpression (Smad7^{CD2}) or a Smad7 deletion (Smad7^{CD4^{-/-}}) was bred into OSE animals.

Overexpression of Smad7 in T cells of OSE mice resulted in a more severe disease course. A deletion of Smad7 in T cells led to the protection from disease. Intestinal T cells in Smad7^{CD2} mice differentiated more into Th1 cells, whereas in Smad7^{CD4^{-/-}} mice Th17 and Tregs were predominant. The MOG₃₅₋₅₅-specific proliferation of T cells was significantly increased in Smad7^{CD2} mice. Adoptive transfer of autoreactive CD4⁺ T cells revealed that the intestine is an obligatory initiation organ for the development and migration of inflammatory T cells into the CNS during spontaneous OSE. The analysis of lesions in the spinal cord clarified that intestinal T cells drive the inflammatory process in a Smad7-dependent manner. Translational studies using intestinal biopsies from MS patients confirmed a dysregulated TGF- β /Smad7 signaling pathway and proinflammatory differentiation of T cells in the human gut, as found in Smad7^{CD2} mice.

In summary, the data of this thesis point to the importance of Smad7 expression in T cells for autoimmunity and identify the intestine as a possible initiation site of autoimmunity in MS. The overexpression of Smad7 in T cells overrules the mechanisms of tolerance in the gut. The following migration of intestinal-resident T

cells into the CNS enables lesion formation. Thus, the reduction of Smad7 in T cells represents a valuable therapeutic target for MS treatment.

2. Einleitung

Die Aufgabe des Immunsystems ist es, den Schutz des Körpers gegenüber Pathogenen zu gewährleisten. Das Immunsystem hat daher diverse konservierte, genannt angeborenes Immunsystem, und anpassungsfähige Mechanismen, genannt adaptives Immunsystem, entwickelt, um auf Gefahrensignale wie Bakterien, Viren, Chemikalien oder Strahlung zu reagieren. Dabei durchlaufen die Immunzellen verschiedene Stationen der Reifung und interagieren auf vielfältige Weise miteinander. Das adaptive Immunsystem ist aufgrund seiner hohen Variabilität gegenüber neuen intra- und extrazellulären Signalen (z.B. Steuerung von Entzündungsprozessen durch T-Zell-Subtypen) von großer funktioneller Bedeutung für das körpereigene Abwehrsystem.

Die Multiple Sklerose (MS) ist die am häufigsten auftretende Autoimmunerkrankung des zentralen Nervensystems (ZNS) im jungen Erwachsenenalter. Dabei wird in einer immunologischen Fehlerkennung die isolierende Myelinschicht der Nervenbahnen angegriffen und es kommt zu wiederkehrenden Entzündungsreaktionen des ZNS. Unbehandelt führt diese Erkrankung häufig rasch zu einer Zunahme neurologischer Schäden bis hin zur Lähmung der Extremitäten und anderen schweren Ausfallerscheinungen. Die Entstehung dieser Immunreaktion ist bisher nur unzureichend verstanden. So begünstigen beispielsweise Risikofaktoren, wie genetische Prädisposition, Lebensstil und Infektionen, aber auch der geografische Standort die Entstehung der MS. Als Vermittler dieser degenerativen Erkrankung sind heute T-Zellen als hauptverantwortlich anerkannt. Diese orchestrieren die immunologische Zusammensetzung und die Intensität der Entzündungsreaktion. T-Zellen können dabei in verschiedene Gruppen unterschiedlicher Funktionen und Eigenschaften unterteilt werden. Maßgeblich beteiligt an der Determinierung dieser Funktion ist der TGF-beta-Signalweg und dessen evolutionär konservierter Inhibitor Smad7. Das Gleichgewicht dieser Signale bestimmt, auch wenn nicht ausschließlich, ob eine entzündungsfördernde oder hemmende T-Zelle entsteht. Die Persistenz und Aktivierung dieser, in der MS beteiligten, auto-entzündlichen T-Zellen konnten bisher nicht erklärt werden. In Anbetracht des westlichen Lebensstils und der Ernährung im Kontext einer steigenden Inzidenz der MS ist die Beteiligung von intestinalen Einflüssen wahrscheinlich. Der Darm repräsentiert, ähnlich wie Haut und Lunge, ein Grenzorgan, welches in stetigem Austausch mit körperfremden Substanzen und symbiotischen Mikroorganismen steht. Immunologisch wird der Darm dabei

engmaschig reguliert und hemmt z.B. eine Entzündungsreaktion gegenüber der Nahrung.

Die pathophysiologische Bedeutung von Smad7 in T-Zellen im Kontext des Initiationsprozesses im Darm ist für die MS bisher nicht untersucht worden. Vor Beginn dieser Dissertation existierten nur Arbeiten, die T-Zell-Smad7 im Mausmodell der EAE oder als Auslöser für entzündliche Darmerkrankung (*engl.* Inflammatory bowel disease; IBD) beschreiben. Die Verknüpfung dieser beiden Aspekte ist bisher unerforscht. Weitere Arbeiten, die den ernährungsbedingten Einfluss auf das ZNS thematisieren und eine Verknüpfung dieser Organe zeigen, konnten bisher weder den Initialmechanismus noch die Beteiligung intestinaler Immunzellen an ZNS-Erkrankungen nachweisen. In dieser Arbeit befasse ich mich deshalb mit der Klärung der Frage, inwieweit intestinale Immunzellen an der Entmarkung der Nervenbahnen beteiligt sind.

2.1 Multiple Sklerose

2.1.1 Epidemiologie

Multiple Sklerose (MS), auch Enzephalomyelitis disseminata, ist eine chronische Autoimmunerkrankung, welche das Zentrale Nervensystem (ZNS) durch die Schädigung neuronaler Myelinschichten schädigt. In Deutschland sind etwa 200.000 Menschen von Multipler Sklerose (MS), selten auch von verwandten Erkrankungen, wie Neuromyelitis optica oder akut disseminierender Enzephalomyelitis betroffen (Petersen et al., 2014, Krishnamoorthy et al., 2006, t Hart et al., 2009). Weltweit sind etwa 2.3 Millionen Menschen betroffen (Browne et al., 2014). MS führt bereits bei jungen Erwachsenen häufig zu manifesten Einschränkungen. Die ersten Symptome treten meist zwischen dem 20. und 40. Lebensjahr auf (Confavreux et al., 1980).. MS tritt zwei bis drei Mal häufiger bei Frauen als bei Männern auf (Petersen et al., 2014).

2.1.2 Subtypen der MS

Die MS kann in Ihrem Auftreten und ihrer Frequenz in drei Subtypen unterschieden werden: relapsierender, sekundär-progressiver oder primär-progressiver Verlauf (Lublin and Reingold, 1996).. Zu Beginn der Erkrankung sind etwa 85% der Patienten von relapsierender-remittierender MS (RRMS) betroffen (Stys et al., 2012). RRMS ist durch Episoden neurologischer Beschwerden mit kompletter oder inkompletter Erholung der neurologischen Ausfälle während der remittierenden Phase charakterisiert (Lublin and Reingold, 1996). Etwa 65% der RRMS-Patienten entwickeln nach 10-20 Jahren eine sekundär-progressive MS (SPMS) (Compston and Coles, 2008). Das Fortschreiten der Erkrankung ohne nennenswerte Verbesserung klinischer Symptome ist charakteristisch für die progressive Phase der MS. 10-15% der Patienten leiden unter primär-progressiver MS (PPMS) mit zunehmenden neurologischen Ausfallerscheinungen seit Beginn der Erkrankung (Thompson et al., 2000).

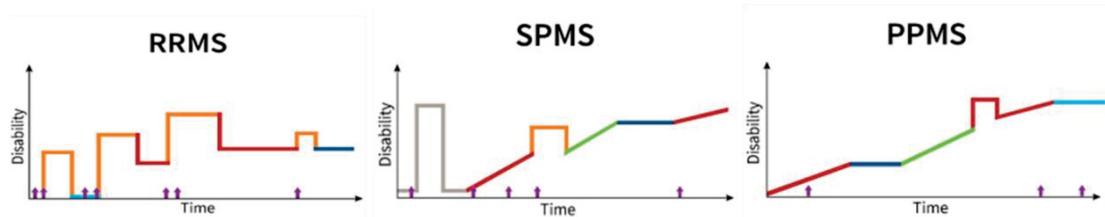


Abbildung 1: Subtypen der Multiple Sklerose. Relapsierend-Remittierende MS (RRMS), Sekundär-Progressive MS (SPMS) und Primär-Progressive MS (PPMS). Schub (orange), Aktiv ohne Verschlechterung (hellblau), Verschlechterung und inkomplette Regeneration (rot), Nicht aktiv mit Progression (grün), RRMS (grau), Stabil ohne Aktivität (lila). Adaptiert nach www.nationalmssociety.org und (Lublin, 2014)

2.1.3 Pathophysiologie

Das ZNS besteht aus dem Gehirn und dem Rückenmark. Hauptsächlich wird es von neuronalen und glialen Zellen gestellt. Neurone bilden dabei die Basis für Signalprozessierung und Informationsübertragung (Lublin, 2014). Zu den glialen Zellen zählen Ependymzellen, Mikroglia, Astrozyten und Oligodendrozyten. Ependymale Zellen kleiden das innere Vaskularsystem aus (Schünke et al., 2007). Mikroglia repräsentieren die ZNS-ständigen Makrophagen und verfügen über phagozytische Eigenschaften und sind zur Antigenpräsentation fähig, wodurch sie eine wichtige Rolle in der Immunabwehr spielen (Filiano et al., 2015); (Schünke et al., 2007). Astrozyten werden auch als strukturegebende Zellen bezeichnet und sind an der Integrität der Blut-Hirn-Schranke (BHS), dem Austausch von Nährstoffen und Metaboliten zwischen Neuronen und Blut sowie der Reparatur von geschädigtem Gewebe beteiligt (Schünke et al., 2007). Oligodendrozyten bilden die Myelinscheiden um Neurone, was die saltatorische Erregungsleitung ermöglicht und hierüber die Leitungsgeschwindigkeit von Aktionspotentiale verbessern (Schünke et al., 2007). Aufgrund limitierter Regenerationsfähigkeiten gegenüber Pathogenen, Neurotoxinen, Fluktuationen der Plasmakompositionen und dem Immunsystem wird die Bluthirnschranke benötigt, um Nervengewebe vor Schaden zu bewahren. Im Vergleich zu anderen Geweben wird das ZNS weniger stark von Immunzellen patrouilliert, z.B. durch neutrophile Granulozyten, und wird daher als immunprivilegiertes Organ bezeichnet (Abbott et al., 2010).

Die experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis (EAE) ist ein Tiermodell der MS und wird verwendet, um die Pathologie der MS zu untersuchen. Die EAE wird durch

die Immunisierung mit Myelin-Komponenten oder durch den Transfer von Myelinreaktiven CD4⁺ T-Zellen ausgelöst (Zamvil and Steinman, 1990). Zu Beginn der Erkrankung werden T-Zellen in genetisch prädisponierten Individuen in der Peripherie, nach einem bis heute unbekanntem Mechanismus, aktiviert (Inglese, 2006). Myelin-Komponenten werden durch Antigen-präsentierende Zellen (APZ) aufgenommen und dem umliegenden Immunsystem präsentiert (Zamvil and Steinman, 1990). Ebenso ist die hierbei mögliche Kreuzreaktivität von bakteriellen und viralen Antigenen mit Selbst-Antigenen, auch molekulare Mimikry genannt (Martin et al., 2001), ein diskutierter zusätzlicher Effekt bei der Aktivierung von T-Zellen. Das Integrin $\alpha 4 \beta 1$ auf aktivierten T-Zellen interagiert mit dem endothelial exprimierten VCAM-1 (engl. Vascular cell adhesion molecule-1) und ermöglicht die Migration von T-Zellen über die Blut-Hirn-Schranke in ZNS (Gold and Wolinsky, 2011). Die erhöhte Expression von VCAM-1 und ICAM-1 (engl. intercellular adhesion molecule-1) wurde auf Endothelzellen in MS-Läsionen gefunden (Cannella and Raine, 1995). Der Prozess der Transmigration wird durch die Matrix Metalloproteasen und Chemokine ermöglicht (Gold and Wolinsky, 2011);(Inglese, 2006);(O'Connor et al., 2001).

Innerhalb des ZNS exprimieren gliale APZs und dendritische Zellen Autoantigene über den MHC-II-Komplex (engl. Major histocompatibility complex) und können T-Zellen reaktivieren (Gold and Wolinsky, 2011);(Inglese, 2006). Diese schädigen anschließend die Myelinscheiden des ZNS, wodurch erneut Autoantigene freigesetzt werden (O'Connor et al., 2001). Durch aktivierte Mikroglia werden anschließend weitere proinflammatorische Zytokine sekretiert und periphere Immunzellen, u.a. autoreaktive B-Zellen, zu Läsionen rekrutiert (Gold and Wolinsky, 2011);(Inglese, 2006).

Die Erhöhung intrathekaler Immunglobuline (Compston and Coles, 2008) und das gelegentliche Auftreten von B-Zellen in MS-Läsionen (Hafler, 2004) zeigen die Beteiligung von B-Zellen in der Pathogenese der MS. Darüber hinaus zeigt sich eine erhöhte Anzahl von CD8⁺ T-Zellen in der Rückenmarksflüssigkeit (Jacobsen et al., 2002) und den Läsionen von MS-Patienten (Compston and Coles, 2008).

Kennzeichnend für die MS sind die inflammatorischen Infiltrate, die zu demyelinisierten Plaques und Neurodegeneration führen (Compston and Coles, 2008). Prozesse, wie das Sterben von Oligodendrozyten, axonaler Schaden und Ionen-Dysfunktion sind assoziiert mit der Degeneration (Kleinschmitz et al., 2007). Der

Schaden an Axonen und deren konsekutiver Verlust in MS-Läsionen korreliert mit irreversiblen neurologischen Schäden (Trapp et al., 1998). Axonale Schädigung tritt in aktiv demyelinisierenden Läsionen, in Periplaques, in chronischer MS (Ferguson et al., 1997) und in der normalen weißen Substanz auf (Trapp et al., 1998). Weiter spielen Astrozyten eine außerordentlich wichtige Rolle in der Pathologie der MS (Van Der Voorn et al., 1999). Als Konsequenz des geschädigten Nervenparenchyms entsteht eine reaktive Astroglie. Astrozyten agieren sowohl pro- als auch anti-inflammatorisch: Sie bilden Narben, welche auf der einen Seite das umliegende normale Gewebe vom entzündeten Bereich abgrenzt und auf der anderen Seite die Regeneration der Axone eingeschränkt wird (Sofroniew, 2005). Die Ablation reaktiver Astroglie resultiert in einem Rückgang der Reparaturmechanismen der Bluthirnanstranke, gesteigerter Demyelinisierung und dem Tod von Neuronen und Oligodendrozyten (Faulkner et al., 2004).

2.2 Die Rolle von Smad7 in der T-Zell-Differenzierung und Autoimmunität

Das Immunsystem hat vielfältige Funktionen, nicht nur um seinen Wirt vor pathologischen Agenzien zu schützen, sondern auch um abnormale Immunreaktionen gegenüber Autoantigenen zu verhindern. Um die immunologische Selbsttoleranz zu gewährleisten unterliegt der Hauptteil der autoreaktiven T-Lymphozyten während der Reifung im Thymus der negativen Selektion. Autoimmunerkrankungen sind häufig die Konsequenz immunologischer Selbsterkennung und können ebenfalls in gesunden Patienten gefunden werden, wo sie jedoch häufig deletiert werden (Wekerle and Hohlfeld, 2003, Sakaguchi, 2000).

T-Helfer-Zellen spielen eine wichtige Rolle der adaptiven Immunantwort. Sie sind zudem beteiligt an Autoimmunität, Asthma und Allergien sowie Tumorummunität. Abhängig vom vorliegenden Zytokinmilieu und der Aktivierung des T-Zell-Rezeptor (engl. T cell receptor, TCR) können sich naive T –Zellen in viele unterschiedliche Subtypen z.B. Th1, Th17 und regulatorische T-Zellen (Tregs) entwickeln.

TGF(engl.: transforming growth factor)- β ist ein multifunktionales Zytokin, welches zu der TGF- β -Superfamilie gehört (Biancheri et al., 2014). Es reguliert Zellproliferation und -differenzierung, Expression von Adhäsionsmolekülen und

Apoptose verschiedenster Zelltypen (Dennler et al., 2002);(Massague, 1990); (Nakao et al., 2002). Aktiviertes TGF- β bindet an den TGF- β -Rezeptor (TGF- β R) II, welcher durch seine intrinsische Serin/Threonin-Aktivität den TGF- β RI phosphoryliert. Dieser aktiviert und phosphoryliert nachfolgend, durch seine eigene Serin/Threonin-Kinase, Smad2 und Smad3 (Nakao et al., 1997),(Nakao et al., 2002);(Wrana et al., 1994). Hierdurch bildet Smad2/3 zusammen mit Smad4 einen Komplex, der in den Nukleus transloziert und die Transkription von Zielgenen reguliert (Ando et al., 2007). TGF- β unterstützt die Konversion peripher naiver T-Zellen durch die Aufregulation der FoxP3-Genexpression in regulatorische T-Zellen (Chen et al., 2003) und fördert zusätzlich die Th17-Differenzierung (Mangan et al., 2006). Im Gegenzug inhibiert TGF- β die Entstehung von Th1- und Th2-Zellen aus naiven T-Zellen (Gorelik et al., 2002, Gorelik et al., 2000). Es konnte gezeigt werden, dass TGF- β 1 eine fundamentale Rolle bei der Suppression des Immunsystems während Autoimmunerkrankungen spielt (Mirshafiey and Mohsenzadegan, 2009). In einer Studie von Kuruvilla und Kollegen konnte durch die Administration von TGF- β 1 die Kollagen-induzierte Arthritis und das Fortschreiten der EAE verhindert werden (Kuruvilla et al., 1991), wohingegen TGF- β 1 Knockout-Mäuse nach der Geburt einer massiven entzündlichen Infiltration von T-Lymphozyten in multiplen Organen erliegen (Kulkarni et al., 1993). Der TGF- β -Signalweg wird negativ durch inhibitorische Smad-Proteine beeinflusst. Die Familie der Smad-Proteine zählt zu den Transkriptionsfaktoren und den intrazellulären Vermittlern des TGF- β - und BMP-Signalwegs. Der Name Smad leitet sich vom homologen Gen der Taufliege *Drosophila melanogaster*, MAD (engl. mother against decapentaplegic) und dem Gen für das Protein Sma (engl. small body size) des Fadenwurms *Caenorhabditis elegans* ab. Hinsichtlich ihrer Funktion werden Smad-Proteine in drei Klassen unterschieden. Die Rezeptor-beeinflussenden Smad-Proteine (R-SMAD) 1-3, -5, -8 sowie -9 können mittels direkter Phosphorylierung ihrer C-terminalen Domäne durch den TGF-beta-Rezeptor I aktiviert werden. Als eigenständige funktionale Klasse wird SMAD4 (engl. common-mediator-Smad4, Co-SMAD) beschrieben, welches mit den R-Smads interagiert. R- und Co-SMADs können durch die hemmende dritte Klasse durch SMAD6 und 7 (I-SMAD) inhibiert oder antagonisiert werden.

Smad7 wird durch TGF- β selbst induziert und bindet kompetitiv an den TGF- β R I; die Phosphorylierung von Smad2 und Smad3 durch die Serin/Threonin-Kinase wird verhindert (Nakao et al., 1997). Auch bewirkt Smad7 die Degradation des TGF- β R I

(Ebisawa et al., 2001) und die Inaktivierung des TGF- β R I durch Dephosphorylierung (Shi et al., 2004). Zhang und Kollegen fanden heraus, dass die nukleäre Funktion von Smad7 durch die Bindung an die *mad homology* (MH)-2-Domäne und die Bindung an *plasminogen activator inhibitor type* (PAI)-1, eine DNA-Bindungsdomäne, ebenfalls zu einer Inhibition des TGF- β -Signalwegs unabhängig von der Typ1-Serinkinase führt (Zhang et al., 2007).

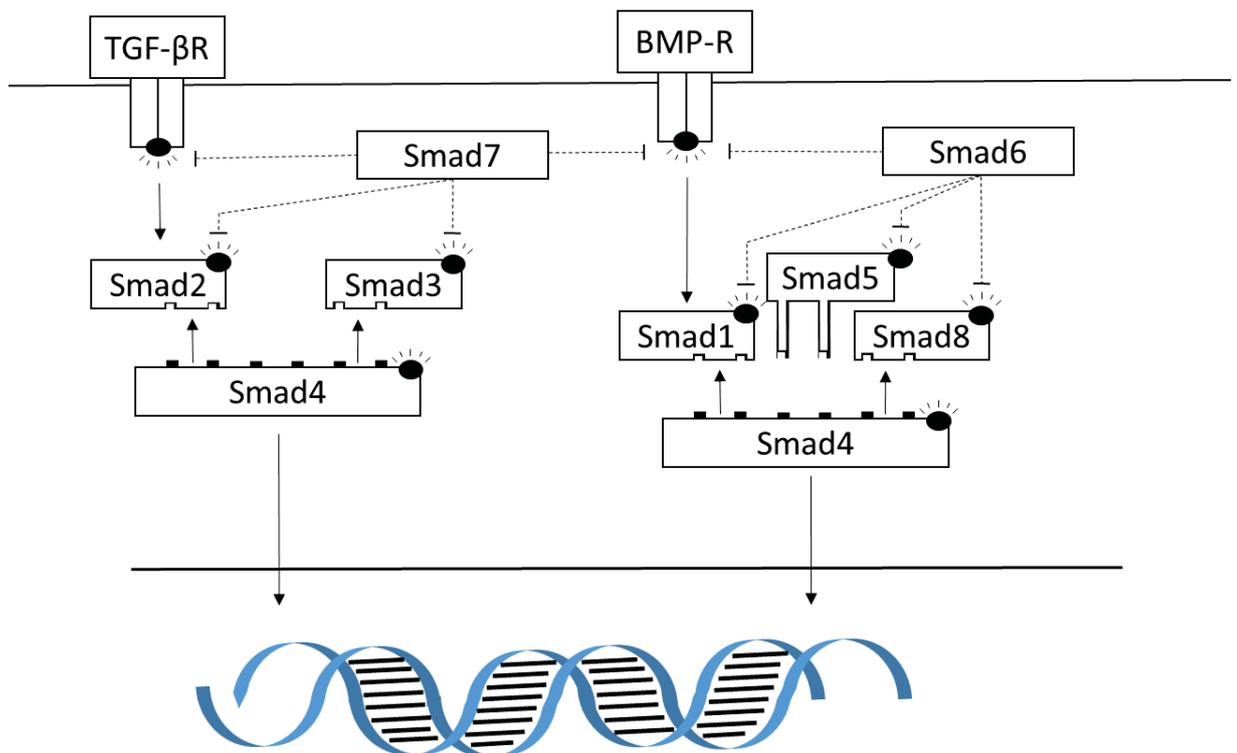


Abbildung 2: Schematische Darstellung des TGF-beta- und BMP-Signalwegs. Der besonders für die T-Zell-Differenzierung wichtige TGF-beta-Signalweg wird über Smad2/3 und Smad4 übermittelt. Smad7 kann hier als inhibitorisches Element agieren. Der BMP-Signalweg repräsentiert einen weiteren Smad-vermittelten Signalweg über Smad1/5/8 und Smad4. Inhibitorisch können hier sowohl Smad7 als auch Smad 6 wirken.

Die MS wird den Erkrankungen mit autoimmuner Pathogenese zugeordnet, in welcher selbst-reaktive CD4⁺ T-Zellen die Myelinscheiden des Nervensystems attackieren (Martin et al., 1992). Zwei CD4⁺ T-Helfer-Zellen, IFN γ -produzierende Th1-Zellen und IL-17 sekretierende Th17-Zellen stehen im Verdacht, die autoimmune Inflammation des ZNS zu initiieren (McFarland and Martin, 2007).

Zahlreiche Studien zeigen den Einfluss von IL-17 auf die Pathogenese der MS und deren Tiermodelle. Die Inhibition von IL-23, welches normalerweise die Sekretion von IL-17 erhält, sorgt für ein verringertes Serum-Level von IL-17 und anderen pro-inflammatorischen Zytokinen, wodurch die Induktion einer EAE verhindert werden kann (Chen et al., 2006). Eine andere Studie kam zu dem Ergebnis, dass infiltrierende T-Zellen deutlich schneller eine Entzündung des Parenchyms auslösen, wenn mehr Th17- als Th1-Zellen im ZNS vorhanden sind (Stromnes et al., 2008). Außerdem konnte gezeigt werden, dass IL-17 und IL-22 eine Schädigung der *Zonula occludens* (engl. Tight junctions) der Blut-Hirn-Schranke hervorruft (Kebir et al., 2007).

In einigen EAE-Modellen konnte dagegen gezeigt werden, dass Th17-Zellen eine untergeordnete Rolle im Vergleich zu Th1-Zellen bei der Krankheitsentwicklung spielen; die dominante Entwicklung von Th1-Zellen in Smad7-überexprimierenden Mäusen führt zu einem stärkeren Krankheitsverlauf und verminderter Th17-Zellzahl in der Peripherie (Kleiter et al., 2010). Weiter bewiesen Haak und Kollegen, dass IL-17F-defiziente Mäuse eine ähnliche Inzidenz und Erkrankungsschwere während einer EAE aufweisen, wenn diese mit IL-17A monoklonalen Antikörpern behandelt werden (mABs) (Haak et al., 2009).

Monteleone und Kollegen untersuchten TGF- β im Kontext entzündlicher Darmerkrankungen (IBD), die durch eine erhöhte Expression von Smad7 und geminderte Phosphorylierung von Smad3 in der Darmmukosa charakterisiert sind. Ein aktiver TGF- β -Signalweg und erhöhte Expression von pSmad3 treten hingegen unter nicht-entzündeten Konditionen auf. Die Inhibition von Smad7 stellt die TGF- β 1-Signalgebung wieder her und führt zu gesteigerter Phosphorylierung von Smad3; die Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine wird gesenkt (Monteleone et al., 2015). Die orale Administration von Smad7-Antisense-Oligonukleotiden sorgt bei Morbus Crohn zu einer signifikant verbesserten Remissionsrate im Vergleich zu Patienten, denen Placebos verabreicht wurden (Monteleone et al., 2015).

Während der EAE führt die Behandlung mit Smad7-Antisense-Oligonukleotiden (Smad7-ase) zu verringerter Smad7-Menge in Immunzellen der Lymphknoten von Nagern, einer Verbesserung der Krankheitssymptome und einer verzögerten Krankheitsinitiierung. Smad7-ase verringert das Smad7-mRNA und Smad7-Proteinlevel in T-Zellen, wodurch ein suppressiver Effekt erzielt wird (Kleiter et al.,

2007). Eine Studie von Kleiter und Kollegen zeigte in Smad7-Knockout-Mäusen eine reduzierte Inzidenz und gemilderte Symptome während der EAE (Kleiter et al., 2010). Außerdem zeigten diese Mäuse eine gesteigerte Zellzahl an FoxP3⁺ regulatorischen T-Zellen im ZNS und zeitgleich eine Aufregulation der Th-17-spezifischen Transkripte (IL-17A, IL-17F) in CD4⁺ T-Zellen. Im peripheren Blut von Patienten mit einer aktiven MS konnten erhöhte Level von Smad7 und dem Th1-spezifischen Differenzierungsmarker T-bet in CD4⁺ T-Zellen im Vergleich zu remittierenden Patienten gefunden werden (Kleiter et al., 2010).

2.3 Das Immunsystems des Darms

Das Immunsystem soll den Körper vor Pathogenen, Toxinen und entarteten körpereigenen Zellen schützen. Diese Aufgabe wird durch ein sensibles Netzwerk aus Zellen und Molekülen des angeborenen und adaptiven Immunsystems bewältigt. Störungen dieses Zusammenspiels, etwa durch veränderte Gen-Expression, die für Differenzierung und immunologische Kompetenz verantwortlich sind, können schnell zu gefährlichen Konsequenzen für den Organismus, z.B. die Entstehung von Autoimmunität, führen.

Eine bedeutende Barriere gegenüber der Außenwelt bildet der Darm. Alle zugehörigen lymphatischen Strukturen des Darms (gut associated lymphoid tissue; GALT) beherbergen etwa 1/3 der Lymphozyten des Organismus. Sie stehen in ständigem Kontakt mit Umweltschadstoffen, Inhaltsstoffe unserer Nahrung und Bakterien. Dabei muss das GALT schnell und zuverlässig auf Schädigungen reagieren, aber auch in der Lage sein, harmlose Antigene zu tolerieren. Eine Störung dieses Gleichgewichts kann in eine chronische Entzündung, z.B. Morbus Crohn oder Colitis ulcerosa, zur Folge haben. Bei diesen Erkrankungen scheinen die vermehrt in den Darm einwandernden Th17-Zellen (Seiderer et al., 2008) für die gestörte Balance an anti-inflammatorischen (IL-4, IL-10) und pro-inflammatorischen Zytokinen (IL-1 β , IL-6, IFN- γ und TNF- α) mitverantwortlich zu sein (Ardizzone and Bianchi Porro, 2005). Th17-Zellen spielen eine wichtige Rolle in der Abwehr von mikrobiellen Infektionen in Epithelien, aber auch bei der Entstehung von Autoimmunerkrankungen. Da die Ursachen der vermehrten Einwanderung dieser Zellen in den Darm erkrankter Personen unbekannt sind, erfolgt die Behandlung symptomatisch mit anti-inflammatorischen, meist gegen TNF α gerichteten Medikamenten. Ebenso konnte gezeigt werden, dass die

Differenzierung von T-Zellen im Darm über eine Smad7-Fehlregulation zu einem Ungleichgewicht des T-Zell-Repertoires führt. Interessanterweise konnten in ersten Studien zu Morbus Crohn erhebliche Verbesserungen mit einem Smad7-Antisense-Molekül, vermeintlich durch die gesteigerte Polarisierung zu FoxP3⁺ regulatorischen T-Zellen, erzielt werden (Monteleone et al., 2015). Somit könnte Smad7 einen Organismus-weiten Regulator für die Verbesserung von Autoimmunerkrankungen darstellen.

2.4 Aufbau und Immunsystem des Darms

Das Immunsystem des Darms besteht aus den intraepithelialen Lymphozyten (IEL), den Leukozyten der unterhalb des Epithels liegenden Lamina propria (LP), den mesenterialen Lymphknoten (mLN) und deren Peyer'schen Plaques (PP).

Die Lamina propria wird hauptsächlich durch CD4⁺ T-Zellen und vorwiegend von IgA sekretierenden B-Zellen dominiert, weniger durch dendritische Zellen oder CD8⁺ T-Zellen. CD4⁺ T-Zellen können anhand ihrer Funktion unterschieden werden.

Th1-Zellen sind besonders wichtig für die Verteidigung gegenüber intra-zellulären Bakterien, z.B. *Mycobacterium tuberculosis*. Diese Bakterien können sich in den Phagosomen vermehren und die Aktivierung lysosomaler Proteasomen verhindern. Dabei entgehen sie verschiedenen Verteidigungsmechanismen. Über die Sekretion von IFN γ können TH1-Zellen Makrophagen aktivieren, die dann diese Pathogene beseitigen können. Die Defizienz von Th1-Zellen kann bei Patienten zu verstärkten Infektionen gegenüber *Mycobacterium tuberculosis* und *Salmonella* (Filipe-Santos et al., 2006) führen.

Th2-Zellen sind essenziell für die Kontrolle von Helminthen-Infektionen. Eine Mutation im IL-4-Gen sorgt in Patienten führt häufig zur Helminthen-Infektion (Urban et al., 1998). Über die CD40-CD40L-Interaktion können Th2-Zellen einen Immunglobulin-Klassenwechsel zu IgG1, IgE und IgG4 in B-Zellen hervorrufen. Th2-Sekretion von IL-4 und IL-13 sorgt für eine Immunreaktion, kombiniert aus Neutrophilen, Granulozyten, Mastzellen und Makrophagen, zur Eingrenzung parasitärer Infektion (Anthony et al., 2007).

Th17-Zellen werden im Mausmodell und in Patienten selten als nicht-pathologischer Zelltyp gefunden (Korn et al., 2007);(Esplugues et al., 2011). Segmentierte filamentöse Bakterien (SPF) sind in der Lage Th17-Zellen spezifisch zum terminalen Ileum zu dirigieren. Über die Sekretion von Serum-Amyloid A und ATP können sich Th17-Zellen über die Promotion mononukleärer Phagozyten in einem Feedback-Loop eigenständig differenzieren (Ivanov et al., 2007). Ob Th17-Zellen anti- oder pro-inflammatorische Eigenschaften annehmen, ist durch das Zytokin-Mileu bestimmt. Neben TGF- β sorgt IL-1 β in Kombination für die Entstehung pathogener Th17-Zellen, wohingegen TGF- β zusammen mit IL-6 für die Differenzierung IL-10 sekretierender anti-inflammatorischer Th17-Zellen, v.a. im Darm, sorgt (Ghoreschi et al., 2010); (McGeachy et al., 2007). Th17-Zellen und deren sekretorisches Profil (IL-17 ist obligat) sind von den umgebenden Umwelteinflüssen abhängig. Während einer Infektion durch Pilze, Gram-positiven und -negativen Bakterien (Conti et al., 2009); (Iwakura et al., 2008); (Ishigame et al., 2009) oder Viren erhöht sich die Zahl der Th17-Zellen drastisch (Esplugues et al., 2011). IL-22, ebenfalls von Th17-Zellen sekretiert, erfüllt im Darm eine wichtige Rolle in der Pathogenabwehr und der Gewebe-Homeostase. Es sorgt für die Produktion antimikrobieller Peptide auf Epithelzellen und für die Limitierung bakterieller Replikation (Ouyang et al., 2009).

CD4⁺ CD25⁺ Treg-Zellen supprimieren auto-reaktive T-Zellen, die der Negativ-Selektion entkommen und in die Peripherie gelangen konnten (Sakaguchi, 2000). Der Transkriptionsfaktor FoxP3 (Forkhead-Box-Protein 3) ist obligat für die Entwicklung und Funktion der regulatorischen T-Zellen (Hori et al., 2003). Wichtige lösliche supprimierende Faktoren sind IL-10 und TGF- β (Huber et al., 2011); (Fahlen et al., 2005) wohingegen CLTA-4 (Annunziato et al., 2002); (Bopp et al., 2007) zu den kontaktvermittelten Mediatoren gehören. Im genetisch veränderten Mausmodell *scurfy* führen Mutationen im FoxP3-Gen, in der Expansion autoreaktiver T-Zellen manifestierend, zu einer extensiven Multiorgan-Autoimmunität (Brunkow et al., 2001) und dem IPEX-Syndrom (Immune Dysregulation, Polyendokrinopathie, Enteropathie, X-chromosomales Vererbungssyndrom) (Bennett et al., 2001). Anti-inflammatorische CD4⁺ T-Zellen des Darms können in (A) Thymus-abstammende CD4⁺ T-Zellen (tTreg), (B) peripher-induzierte Tregs (iTreg) und (C) dem T regulatorischen Typ 1 (Tr1) unterschieden werden. Die tTregs entstehen im Thymus und sind besonders auf die Kontrolle von autoreaktiven, Selbstantigen-erkennenden Effektor-T-Zellen spezialisiert (Coutinho et al., 2005). Die induzierten Tregs (iTregs) werden, reaktiv

auf sich ändernde Umwelteinflüsse und neue immunologische Anforderungen, gebildet. Dendritische Zellen (DC) im Darm unterstützen die Entwicklung naiver T-Zellen in iTregs. Das T-Zell-Rezeptor (TCR)-Repertoire wird dabei deutlich spezifischer als bei tTregs auf das Mikrobiom abgestimmt. Im peripheren Blut von MS-Patienten konnte eine Reduktion von CD4⁺ CD25⁺ regulatorischer T-Zellen im Vergleich zu gesunden Kontrollen gezeigt werden (Viglietta et al., 2004).

Tr1-Zellen entstehen in der Peripherie. Sie sekretieren große Mengen von IL-10 und TGF- β . Anders als konventionelle Tregs exprimieren Tr1-Zellen kein FoxP3 (Vieira et al., 2004);(Maynard et al., 2007). Hierdurch sind Tr1-Zellen vor allem in der Lage die immunologischen Reaktionen von Th1, Th2 und Th17 zu regulieren. Zudem können Tr1-Zellen kompensatorisch für gemindertem Aufkommen von Tregs wirken.

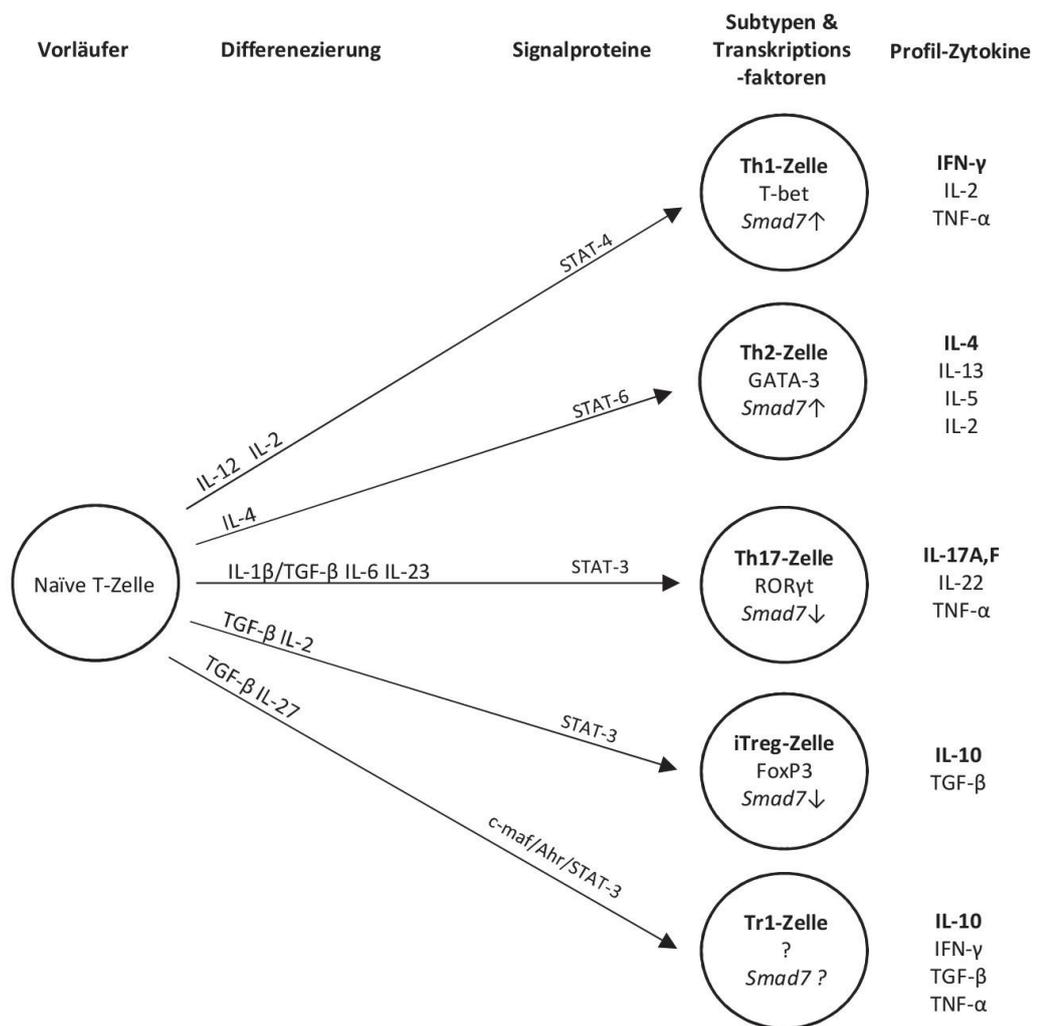


Abbildung 3 Differenzierung naiver T-Zellen in verschiedene Effektor- und regulatorischen T-Zellen. Bestimmte Kombinationen von Zytokinen sorgen für die Entstehung unterschiedlicher Subtypen von T-Helfer-Zellen. Jede T-Helfer-Zelle ist durch spezifische Signalproteine, Transkriptionsfaktoren und ein spezielles Sekretom charakterisiert. Letztere vermitteln die funktionellen Eigenschaften jedes Subtyps. Verändert nach (Gagliani et al., 2012).

Bei Peyer'schen Plaques (PP) handelt es sich um Lymphfollikel, die in die Wand des Dünndarms eingebettet sind. Dabei ist die Verteilung nicht gleichmäßig, sondern sie treten gehäuft im Bereich des Duodenums und besonders des Ileums auf. Über sogenannten M-Zellen, die auf Antigenaufnahme- und Präsentation spezialisiert sind, stehen die PP in direktem Kontakt mit dem Darmlumen. Somit repräsentieren M-Zellen den ersten Berührungspunkt des Immunsystems mit der Außenwelt und übernehmen mitunter die Reifung von IgA-sekretierenden B-Zellen.

Die Verteilung von B- und T-Zellen verhält sich in PP und mLN invers zueinander. Während in die PP -wie auch in der Lamina propria- überwiegend B-Zellen und kaum CD8⁺ T-Zellen vorkommen, überwiegen im mLN die CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen. Sie drainieren den gesamten Dünndarm und den proximalen Teil des Colons und übernehmen somit die Modulation der Immunreaktion für den Großteil aller Darmantigene.

2.5 Das Darmmikrobiom und dessen Einfluss auf das Immunsystem

Der menschliche Darm beinhaltet 100 Billionen (10^{12}) Mikroben (Ley et al., 2006), wovon etwa 10^{11} pro Gramm dieser Mikroben im Dickdarm vorkommen. Es konnte gezeigt werden, dass sich die Komposition der Darmflora im Laufe der Zeit, basierend auf der Analyse von Stuhlproben europäischer und afrikanischer Kinder, mit den Ernährungsgewohnheiten verändert (De Filippo et al., 2010). Neben der Nahrungsprozessierung und dem Energiemetabolismus erfüllt das Darmmikrobiom eine Schlüsselrolle in der Entwicklung und dem Erhalt des Immunsystems (Belkaid and Hand, 2014);(Ivanov et al., 2008). Das veränderte Mikrobiom spielt eine wichtige Rolle bei Autoimmunerkrankungen, wie etwa der IBD (Halfvarson et al., 2017). Eine Studie um Grevers und Kollegen zeigte eine Assoziation der intestinalen Inflammation in IBD-Patienten mit einer reduzierten Spezies-Diversität und erhöhtem Vorkommen bestimmter Taxa, z.B. *Enterobacteriaceae* (Knights et al., 2014).

Da die pathogenen Initialmechanismen für die Entstehung der MS immer noch weitgehend unverstanden sind, könnte das gastrointestinale Mikrobiom vielversprechende Antworten geben. Untersuchungen zu Stuhlproben aus MS-Patienten und gesunden Kontrollen zeigen Unterschiede der Komposition des Darmmikrobioms (Chen et al., 2016, Miyake et al., 2015). Das Aufkommen unterschiedlicher Spezies war zwischen diesen beiden Kohorten hingegen unverändert. Weiter zeigten RRMS-Patienten in Remission bezüglich der Spezies-Vielfalt vergleichbare Resultate, während Patienten mit einem sich verschlechternden Verlauf zu einer weniger starken Diversität tendierten (Chen et al., 2016). In einer Fallstudie aus China konnte gezeigt werden, dass MS-Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe an einer Überwucherung von Bakterien im Dünndarm litten. Diese MS-Patienten wiesen einen schlechteren Krankheitsverlauf, gemessen an dem Grad

der Behinderung (engl.: expanded disability status scale; EDSS) und dem Schweregrad der MS (engl.: multiple sclerosis severity score; MSSS) auf. (Zhang et al., 2017).

Eine bestimmte Komposition des Mikrobioms konnte mit einem direkten Einfluss auf T-Zellen assoziiert werden. Kolonisierung mit segmentierten filamentösen Bakterien (engl. *segmented filamentous bacterium*, SFB) induziert die Differenzierung von Th17 in der Lamina propria (LP) des Dünndarms, Dickdarms (Ivanov et al., 2009) und im Rückenmark bei Mäusen (Lee et al., 2011). Mäuse, die hingegen mit Antibiotika behandelt werden, zeigen weniger Th17-Zellen, eine gesteigerte Anzahl von FoxP3⁺ Zellen in der LP (Ivanov et al., 2008) und den peripheren Lymphknoten, resultierend in einer Verbesserung des Krankheitsstatus (Ochoa-Reparaz et al., 2009). Die Kolonisierung mit *Clostridium*-Spezies sorgen für erhöhte TGF- β -Expressionslevel und vermehrt FoxP3⁺ regulatorischen T-Zellen (Atarashi et al., 2011). MS-Patienten mit intestinaler Parasiteninfektion zeigten eine substantielle Erhöhung an CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Zellen im Vergleich mit nicht infizierten MS-Patienten (Correale and Farez, 2007).

Im Vergleich von spezifisch pathogen-frei (engl. specific pathogen-free; SPF) gezüchteten Tieren zeigen solche unter keimfreien Bedingungen (engl. germ free; GF) gehaltenen weniger IL-17, jedoch erhöhte Frequenzen von FoxP3⁺ regulatorischen T-Zellen (Ivanov et al., 2008); (Lee et al., 2011). Zudem sind GF-Mäuse weniger anfällig gegenüber der Induktion der EAE und zeigen verminderte Erkrankungssymptome als SPF-Mäuse (Lee et al., 2011). Dagegen konnte gezeigt werden, dass GF-Mäuse durch die Herunterregulation der *tight junctions* im Vergleich mit einer nicht-pathogenen Darmflora eine erhöhte Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke aufweisen. Die Substitution der nicht-pathogenen Darmflora in Mäusen führt zu keimfreien Mäusen mit geminderter Permeabilität (Braniste et al., 2014). Berer und Kollegen untersuchten den Einfluss einer nicht-pathogenen Darmbesiedelung in Mäusen, die unter SPF- und GF-Bedingungen gehalten wurden, auf die Induktion einer EAE. SPF-Mäuse entwickelten nach wenigen Monaten spontane Anzeichen einer EAE, wohingegen GF-Mäuse gesund blieben. Solche GF-Mäuse entwickelten nach Re-Kolonisierung der Darmflora ebenfalls eine spontane EAE (Berer et al., 2011),(Berer et al., 2018). GF-Mäuse zeigten eine deutliche Defizienz von IL-17 produzierender Th17-Zellen (Berer et al., 2011); (Ivanov et al., 2008),(Ivanov et al., 2009). Außerdem wiesen diese Mäuse keine Aktivierung

autoimmuner T-Zellen auf und produzierten geringere Dosen der anti-MOG-Autoantigene als SPF-Mäuse. Nach der Re-Kolonisierung konnte ein Anstieg der Autoantikörper in GF-Mäusen gezeigt werden (Berer et al., 2011). Nach MOG-Immunisierung entwickeln GF-Mäuse eine EAE mit verspäteter Initiation.

Diese Befunde weisen auf einen fundamentalen Zusammenhang zwischen dem Darm-Mikrobiom und der Induktion von Autoimmunerkrankungen des ZNS, wie der MS, hin (Berer et al., 2011) (Lee et al., 2011).

2.6. Relevante Tiermodelle demyelinisierender Erkrankungen

2.6.1 Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis (EAE)

Die Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis (EAE) ist das am häufigsten genutzte Mausmodell für die inflammatorische Komponente der Multiplen Sklerose (MS). Ein komplexes Zusammenspiel zwischen immunologischen und neuropathologischen Mechanismen führt zur Inflammation, Demyelinisierung, Gliose und axonalen Degradation im ZNS (t Hart et al., 2009). Im EAE-Modell tritt ebenfalls der anti-inflammatorische Mechanismus zur Beseitigung der überaktivierten Immunreaktion auf, sodass die EAE als ein Modell für die schubförmig-remittierende MS (RRMS) Anwendung findet. Für die Induktion der EAE werden verschiedene Substanzen als Gemisch intradomal appliziert. MOG₃₅₋₅₅ wird dabei als neuronales Antigen für die Erkennung der Myelinscheiden im ZNS durch Immunzellen gegeben. Das komplette Freund'sche Adjuvants enthält abgetötete Mykobakterien und sorgt für eine starke zelluläre Immunreaktion. Zusätzlich wird noch Pertussistoxin intraperitoneal verabreicht, um die Blut-Hirn-Schranke für Immunzellen zu permeabilisieren (Miller and Karpus, 2007). Im EAE-Modell wird die Entzündungsreaktion hauptsächlich durch autoreaktive T-Zellen vermittelt. ZNS-Schädigungen treten im Sehnerv, dem Gehirn und im Rückenmark auf. (Constantinescu et al., 2011)

2.6.2 Optikospinale Enzephalomyelitis (OSE)

Das Modell der spontanen Optikospinalen Enzephalomyelitis (OSE) ist ein Tiermodell für die humanen Erkrankungen Neuromyelitis optica (NMO) und MOG-Antikörper-assoziierte Erkrankung. Wie in der NMO, spielen in der OSE humoral vermittelte

Immunreaktionen eine tragende Rolle während der Pathogenese (Kimbrough et al., 2012). MOG₃₅₋₅₅ erkennende T- (2D2^{MOG}; 2D2-Mäuse) und B-Zellen (IgH^{MOG}; TH-Mäuse) werden in einen Genotyp gezüchtet. Anders als in der EAE, sind im OSE-Modell hauptsächlich der Sehnerv und das Rückenmark von Entzündungsreaktionen betroffen. Der Krankheitsverlauf entspricht seitens der Manifestationsorte der NMO und der MOG-Antikörper-assoziierten Erkrankung und seitens des langsam progredienten Verlaufs der primär-progressiven MS (PPMS). Durch die Besiedelung des Darms entsteht in OSE-Tieren bereits etwa 4 Wochen nach Geburt eine spontan auftretende autoimmune Entzündung des ZNS (Krishnamoorthy et al., 2006). Mikrobielle Peptide beeinflussen das Immunsystem und modulieren dessen Reaktion auf Selbst-Antigene, wie Nahrung oder die symbiontischen Mikrobiota. Ein diskutierter Mechanismus ist die Erkennung sequenzähnlicher Peptide für körpereigene Proteine, auch Molekulare Mimikry genannt. Im OSE-Modell weisen etwa 90% der 2D2-Tiere eine Rezeptor-Spezifität für MOG₃₅₋₅₅ auf (Bettelli et al., 2003). Keimfrei gezüchtete OSE-Tiere entwickeln keinerlei klinische Symptome.

2.6 Fragestellung

Die MS ist eine heterogene und multifaktorielle Erkrankung des ZNS, deren Entstehung bisher unzureichend verstanden ist. In dieser Arbeit wird die Rolle der T-Zell-Immunologie, im speziellen von intestinalen T-Zellen, an der Entstehung der MS erforscht. Hierzu wird das Darmmikrobiom-induzierte OSE-Mausmodell verwendet. Es wird vermutet, dass das Mikrobiom die autoimmunen Eigenschaften von T-Zellen verstärken und die Expansion inflammatorischer T-Zellen modulieren kann. Ein wichtiger Mechanismus zur Regulation von T-Zell-Autoimmunität ist dabei der TGF- β -Signalweg und dessen Inhibitor Smad7. Ergebnisse aus vorangegangenen Studien von Kleiter und Kollegen zeigen einen T-Zell-spezifischen Smad7-abhängigen Effekt auf den Verlauf der EAE sowie erhöhte Smad7-Spiegel im PBMCs von MS-Patienten (Kleiter et al., 2010).

Daher soll in dieser Arbeit untersucht werden, ob die Deletion von Smad7 in T-Zellen zu einer Protektion gegenüber der Initiation und Progression der OSE führt. Insbesondere soll die zelluläre Infiltration und die Demyelinisierung des ZNS in Abhängigkeit von Smad7 in T-Zellen untersucht werden. Desweiteren soll überprüft werden, ob T-Zellen durch die Modulation von Smad7 autoreaktiv werden, daraus eine strukturelle Veränderung der Darmarchitektur hervorgeht und die T-Zell-Polarisierung im Darm verändert wird. Zusätzlich soll überprüft werden, ob die Überexpression von Smad7 in T-Zellen zu einer Überwindung Darm-intrinsischer Suppressionsmechanismen führt. Unter Verwendung eines adoptiven Transfers von Smad7-modulierten T-Zellen soll deren Aktivierung und Migration aus dem Darm in das ZNS gezeigt werden. Auch soll die Eradikation des Darm-Mikrobioms Aufschluss über die Notwendigkeit einer mikrobiellen Besiedelung des Darms als Initiator für autoreaktive T-Zellen geben. Mittels eines Reportersystems soll anschließend überprüft werden, ob infiltrierende T-Zellen im Darm aktiviert wurden und zur Läsionsbildung im ZNS beitragen. Abschließend soll durch Experimente mit Darmmukosabiopsien von MS-Patienten die Übertragbarkeit von Smad7 abhängigen T-Zell-Veränderungen vom Tiermodell auf die humane Erkrankung MS untersucht werden.

3. Material und Methoden

3.1 Verbrauchsmittel

Produkt	Hersteller
BD Plastikpak TM , Spritze (1ml)	BD, Heidelberg
Polystyrene Röhre 15ml	Sarstedt, Nümbrecht
Einbettform für Gewebe-Gefrierschnitte	Sakura Finetek, USA
FACS-Röhrchen für Durchflusszytometrie	Sarstedt, Nümbrecht
Kanülen Microlance	BD Biosciences, Heidelberg
MACS-Säulen	Miltenyi, Bergisch Gladbach
Objektträger Superfrost Plus	Thermo Scientific, USA
Zellsiebe 100 µm / 70 µm / 40 µm	BD, Heidelberg
ELISA-Platten	Greiner Bio-One, Frickenhausen
PAP Pen (Histologie)	BD, Heidelberg

3.1.1 Reagenzien und Chemikalien

Produkt	Hersteller
Agarose, Elektrophorese geeignet	AppliChem, Darmstadt
Albumin bovine (BSA) Fraktion V	Carl Roth, Karlsruhe
Collagenase D	Sigma-Aldrich, USA
DNase I	Sigma-Aldrich, USA
Dulbecco's PBS	Thermo Scientific, USA
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Thermo Scientific, USA
Carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE)	Life Technologies, USA
DNA Leiter 100bp	New England Biolabs, Frankfurt am Main
Entellan®	Carl Roth, Karlsruhe
Eosin Y Lösung, alkoholisch	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Hämatoxylin Lösung Gill No. 3	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Mausserum	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ziegenserum	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Hasenserum	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Rattenserum	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Proteinase K	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
MOG	Charité Berlin, Berlin
rMOG	Max-Planck-Institut für Neuroimmunologie, Martinsried

Inkomplettes Freudsches Adjuvants (CFA)	BD, Heidelberg
Komplettes Freudsches Adjuvants (CFA)	BD, Heidelberg
Pertussistoxin (PTX)	Merck Milipore, USA
Fluoromyelin F	Life Technologies, USA
NaCl	Carl Roth, Karlsruhe
KCl	Carl Roth, Karlsruhe
Na ₂ HPO ₄ +H ₂ O	Carl Roth, Karlsruhe
KH ₂ PO ₄	Carl Roth, Karlsruhe
Ketamin	Inresa, Freiburg im Breisgau
Xylazin	Bioveta, Tschechische Republik
Ventraquil	Ceva, Düsseldorf
Saccharose	Carl Roth, Karlsruhe
Evans blue	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Parafinöl	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Oleate	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
PMA	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ionomycin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Golgi-Stopp	BD, Heidelberg
Alkohol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
IMDM-Medium	Thermo Scientific, USA
β-Mercaptoethanol	Merck Milipore, USA
HBSS-Medium	Thermo Scientific, USA
DTT	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Percoll	Merck Milipore, USA
Na ₂ HPO ₄	Carl Roth, Karlsruhe
NaH ₂ PO ₄	Carl Roth, Karlsruhe
Paraformaldehyd	Carl Roth, Karlsruhe
Phosphatpuffer	Carl Roth, Karlsruhe
NaCl	Carl Roth, Karlsruhe

3.1.2 Kits und PCR Mastermix

Produkt	Hersteller
FoxP3 Staining Kit	BD, Heidelberg
CD4 ⁺ CD62L ⁺ Isolation Kit	Miltenyi biotec, Bergisch Gladbach
CD4 ⁺ Isolation Kit	Miltenyi biotec, Bergisch Gladbach
Pan T cell Isolation Kit	Miltenyi biotec, Bergisch Gladbach
CD19 ⁺ Isolation Kit	Miltenyi biotec, Bergisch Gladbach
CD8 ⁺ Isolation Kit	Miltenyi biotec, Bergisch Gladbach
CD11c ⁺ Isolation Kit	Miltenyi biotec, Bergisch Gladbach

RNeasy Kit	Qiagen, Hilden
------------	----------------

3.1.3 Zytokine und Antikörper für Zellkultur

Produkt	Verwendete Konzentration	Hersteller
Anti-Maus CD3	1µg/ml	BD, Heidelberg
Anti-Maus CD28	1ng/ml	BD, Heidelberg
Anti-Maus IL-4	10µg/ml	BD, Heidelberg
Anti-Maus IFN γ	10µg/ml	BD, Heidelberg
r-mIL-12	10µg/ml	BD, Heidelberg
r-mIL-2	20ng/ml	BD, Heidelberg
r-mIL-6	10ng/ml	Immuno tools, Friesoythe
rh-TGF- β	2ng/ml	Immuno tools, Friesoythe

3.1.4 PCR Primer (Maus)

Produkt		Sequenz	Hersteller
Smad7ko	sen	GTCAGGTTGGATCACCATGCC	Microsynth, Schweiz
Smad7ko	ase	GACTGCCTGGAGAAGTGTGTC	Microsynth, Schweiz
Smad7tg	sen	CCCAGCTTCCCTGAAAGTG	Microsynth, Schweiz
Smad7tg	ase	CCGTAAGATTCACAGCAACAC	Microsynth, Schweiz
CD4cre	sen	CCCAACCAACAAGAGCTC	Microsynth, Schweiz
CD4cre	ase	CCCAGAAATGCCAGATTACG	Microsynth, Schweiz

3.1.6 ELISA

Produkt	Hersteller
IL-17	R&D Systems, USA
IFN γ	R&D Systems, USA
IL-10	R&D Systems, USA
IgG1	Affymetrix, USA
IgG2a	Affymetrix, USA
IgM	Affymetrix, USA

3.1.7 Antikörper für Durchflusszytometrie und Histologie

Spezifität	Konjugat	Klon	Verdünnung	Hersteller
CD3	PE-Cy7	145-2C11	1:300	BD Pharmingen, Heidelberg
CD4	FITC, APC	RM4-5	1:300	eBioscience, Frankfurt am M.
CD8 α	APC	53-6.7	1:200	BioLegend, Großbritannien
CD11b (Mac-1)	PE, APC	WT.5	1:300	BD Pharmingen, Heidelberg
CD11c (ITGAX)	FITC	HL3	1:300	BD Pharmingen, Heidelberg
CD25 (IL-2R α)	APC	PC61.5	1:300	eBioscience, Frankfurt am M.
CD44 (HCAM)	FITC	IM7	1:300	BD Pharmingen, Heidelberg
CD45R (B220)	APC-Cy7	A20	1:300	BD Pharmingen, Heidelberg
CD62L (L- Selektin)	FITC	MEL-14	1:300	BD Pharmingen, Heidelberg
CD69 (VEA)	PE	M1/70	1:300	BD Pharmingen, Heidelberg
CD69 (VEA)	FITC	H1.2F3	1:300	BD Pharmingen, Heidelberg
CD86 (B7-2)	APC	GL1	1:300	eBioscience, Frankfurt am M.
GM-CSF	PE	MP1-22E9	1:300	BD Pharmingen, Heidelberg
CD152 (CTLA- 4)	PE	UC10-4B9	1:200	BioLegend, Großbritannien
CD199 (CCR9)	PE	9B1	1:200	BioLegend, Großbritannien
CD274 (PD-L1)	APC	MIH5	1:300	BD Pharmingen, Heidelberg
F4/80 (EMR1)	APC	BM8	1:200	BioLegend, Großbritannien
FoxP3	PE	FJK-16s	1:100	eBioscience, Frankfurt am M.
IL-17	FITC	eBio17B7	1:100	eBioscience, Frankfurt am M.

IFN γ	FITC	XMG1.2	1:100	eBioscience, Frankfurt am M.
V α 3.2-TCR	APC	RR3-16	1:300	eBioscience, Frankfurt am M.
V β 11-TCR	PE	RR3-15	1:300	BD Pharmingen, Heidelberg
IgM ^a	PE	DS-1	1:200	BD Pharmingen, Heidelberg
IgM ^b	FITC	AF6-78	1:200	BD Pharmingen, Heidelberg
a4 β 7 (LPAM-1)	PE	DATK32	1:200	BioLegend, Großbritannien
MHCII	PE	M5/114.1 5.2	1:200	BD Pharmingen, Heidelberg
CD11b	FITC	M1/70	1:200	BD Pharmingen, Heidelberg
CD11c	APC	HL3	1:200	BD Pharmingen, Heidelberg
Smad7	-/-	AB_25335 12	1:50	Invitrogen, USA
pSmad2/3	-/-	ab63399	1:50	Abcam, Großbritannien
CD4	-/-	EPR6855	1:100	Abcam, Großbritannien
Smad7	-/-	#293039	1:25	R&D Systems, USA
pSmad2/3	-/-	D27F4	1:25	Cell Signalling, USA
FoxP3	-/-	236A/E7	1:100	eBioscience, Frankfurt am M.
IL-17	-/-	4K5F6	1:100	Novus Biologicals, USA
IFN γ	-/-	ab25101	1:100	Abcam, Großbritannien
BrdU	-/-	BU-33	1:100	Sigma-Aldrich, USA

3.1.8 Geräte

Produkt	Hersteller
Inkubator	Heracell
RT-PCR-Cycler	Life Technologies, USA
Zentrifuge	Thermo Scientific, USA
Zentrifuge, Tisch	Thermo Scientific, USA
Lichtmikroskop	Olympus, Japan

Floureszenzmikroskop	Olympus, Japan
Kryostat	Leika, Wetzlar
Waage	Thermo Scientific, USA
Feinwaage	Thermo Scientific, USA
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Vortexer	Thermo Scientific, USA
Durchflusszytometer FACS Canto II	BD Bioscience, Heidelberg
Kühl- und Gefriergeräte	Leika, Wetzlar
Mehrkanalpipette	Eppendorf, Hamburg
Neubauer Zählkammer	Carl Roth, Karlsruhe
MACS Zellseparationsaparatur	Miltinyi Biotec, Bergisch Gladbach
PCR-Maschine	Thermo Scientific, USA
Pipettierautomat Pipetboy	Eppendorf, Hamburg
Spektrophotometer NanoDrop1000	VWR, USA
Zellkultur-Werkbank	VWR, USA
Vortex Genie 2	Thermo Scientific, USA
Microplate Reader	Thermo Scientific, USA
Nano-Drop	Thermo Scientific, USA

3.1.9 Programme

Produkt	Hersteller
Graphpad Prism 6	Graphpad Software
Microsoft Office Paket	Microsoft Corperation
Microsoft Composite Editor	Microsoft Corperation
GIMP	Das GIMP-Team
Image J	NIH, USA
Endnote	Clarivate Analytics, USA
BD Diva Sofware	BD Bioscience, Heidelberg
Cell D	Olympus, Japan

3.1.10 Medium, Puffer und Lösungen

T-Zell-Medium	
RPMI 1640	450ml
1M HEPES	7,6ml
10mM Na-Pyruvat	5ml
NEAA (100x)	5ml
20mM Glutamin	5ml
100 µg/ml Penicillin/Streptomycin	5ml
FACS (10%)	50ml

2-Mercaptoethanol (14.3mol/l)	1,7ml
MACS-Puffer	
Dulbecco's PBS	500ml
BSA (5mg/ml)	2,5g
0.5 M EDTA	2ml
Lösung Vorverdau	
HBSS	100ml
EDTA	5mM
DTT	1mM
Lösung Verdau	
PBS	100ml
Kollagenase D	0,05g
DNase I	0,05g
Dispase II	0,3g
Phosphat-Puffer 0.4M	
Na ₂ HPO ₄	86,8g
NaH ₂ PO ₄	10,5g
H ₂ O	1L
PFA 4%	
Paraformaldehyd	40g
Phosphatpuffer	250ml
NaCL 10M	500µl
H ₂ O	1L
Narkose	
Ketamin	7,5ml
Xylazin	1,9ml
Ventraquil	0,75ml
0,9% NaCl	9,85ml
PBS	
NaCl	8,0g
KCl	0,2g
Na ₂ HPO ₄ +H ₂ O	1,42g
KH ₂ PO ₄	0,27g
H ₂ O	1L
Saccharose 30%	

Saccharose	30g
H ₂ O	100ml
CFA	
Parafinöl	9ml
Oleate	1ml
Immunisierungspaste (1 Maus)	
MOG ₃₅₋₅₅	25µl
IFA	41,5µl
CFA	25µl
PBS	33µl

3.2 Methoden

3.2.1 Tiere und Krankheitsbewertung

Für diese Arbeit wurden folgende transgene Mäuse verwendet: T-Zell-Rezeptoren spezifisch für MOG (TCR^{MOG}; Stamm: 2D2) (Bettelli et al., 2003), B-Zell-Rezeptoren spezifisch für MOG (IgH^{MOG}; Stamm: TH)(Litzenburger et al., 1998), Smad7-Überexpression in CD4⁺ T-Zellen (Smad7^{CD2} Stamm: S7tg)(Dominitzki et al., 2007), Smad7-knockout in CD4⁺ T-Zellen (Smad7^{CD4-/-} Stamm: S7ko)(Kleiter et al., 2007) und unter CD69 exprimierende GFP T-Zellen (Nur77, Stamm: Nur77^{GFP})(Moran et al., 2011). Alle genannten Mäuse wurden auf dem C57BL/6 genetischen Hintergrund gezüchtet. Im weiteren Verlauf der Arbeit wurden verschiedene Kombinationen der Genotypen gezüchtet, um die Fragestellung der Arbeit adäquat beantworten zu können: 2D2xTH (OSE)(Krishnamoorthy et al., 2006), THxSmad7^{CD2}, THx Smad7^{CD4-/-}, 2D2xSmad7^{CD2}, 2D2x Smad7^{CD4-/-}, 2D2xTH-Smad7^{CD2} (Smad7^{CD2}-OSE), 2D2xTH-Smad7^{CD4-/-} (Smad7^{CD4-/-}-OSE), 2D2xNur77, 2D2xNur77-Smad7^{CD2}, 2D2xTH-Smad7^{CD4-/-}. Die F1-Generation der OSE, Smad7^{CD2}-OSE und Smad7^{CD4-/-}-OSE wurden täglich gewogen und auf klinische Zeichen hin untersucht. Die Krankungsexamination „Score“ wurde entsprechend den Richtlinien der „Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) Guidelines“ durchgeführt: 0.5, Gesund; 1, Reduzierter Schwanzturnus; 1.5, Schwanz-Paralyse; 2, Ausbleiben der Ausgleichsbewegung; 2.5, Ataxie; 3, Schwäche der Hinterbeine; 3.5. Einseitige Paralyse eines Hinterbeins; 4. Beidseitige Paralyse der Hinterbeine; 4.5. Tetraparese mit paralyisierten Hinterbeinen; 5. Tod. Alle tierexperimentellen Arbeiten wurden genehmigt und unter Berücksichtigung der Richtlinien des Landesamts für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen (LANUV), Essen, Deutschland (Nr. 84-02.04.2016.A062) durchgeführt. Dementsprechend, wurden Tiere mit einem Score von 3,5 euthanasiert. Die Typisierung wurde mit den unter 2.1.4 angegeben Primern vorgenommen. Die Haltung erfolgte unter kontrollierten Bedingungen in der Zentralen Tierversuchshaltung (ZVM) der Ruhr-Universität Bochum (RUB). Futter und Wasser wurden ad libitum verabreicht.

3.2.2 Induktion der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE)

6-8 Wochen alte weibliche C57BL/6 Mäuse wurden mit 50mg MOG₃₅₋₅₅ in PBS und komplettem freudschem Adjuvants (*eng. Complete Freud's Adjuvant, CFA*) immunisiert. Um die Bluthirnschranke zu permeabilisieren, wurden an Tag 0 und 2 jeweils 200ng Pertussis Toxin verabreicht. Die Tiere wurden täglich krankheitsbewertet wie in 3.2.1 beschrieben und an Tag 20 bzw. 30 wurde der Versuch beendet.

3.2.3 Antigene

Das MOG₃₅₋₅₅-Peptid wurde von der Charité Berlin, Institut für Mikrobiologie bezogen. Ein Plasmid Konstrukt welches das Vollängen-Protein von MOG kodiert (rMOG) wurde von Guru Krishnamoorthy (Max-Plank-Institut für Neuroimmunologie, Martinsried) bereitgestellt. Die Proteine wurden aus bakteriellen Einschlusskörperchen (*engl. Inclusion bodies*) wie zuvor in der Arbeiten von Krishnamoorthy und Kollegen beschrieben (Krishnamoorthy et al., 2009)

3.2.4 Histologische Färbung von Mausgewebe

Die Tiere wurden unter tiefer Narkose mit PBS gefolgt von 4% Paraformaldehyd (PFA) perfundiert. Das Gewebe wurde anschließend explantiert und für 24Std in PFA gelagert gefolgt von einer weiteren Lagerung in 30% Sukrose für 24Std. Zu den explantierten Geweben zählten Rückenmark, Optischer Nerv, Darmgewebe und lymphoides Gewebe (axilläre, inguinale und mesenteriale Lymphknoten, Milz). Diese wurden Tissue tek O.C.T (Sakura Finetek Deutschland GmbH) eingebettet. Für die strukturelle Analyse wurden Hematoxinlin und Eosin (H&E) verwendet. Um die Demyelinisierung zu untersuchen, wurde das Gewebe mit Flouromyelin F gefärbt (Verdünnung 1:300)

3.2.5 Durchflusszytometrie

Mononukleäre Zellen wurden vom Darm, Lymphknoten und der Milz mittels Lymphopräp-Gradienten Zentrifugation und/oder pan –Zell MACS isoliert (Miltenyi Biotec, Mönchengladbach, Deutschland). Die isolierten Zellen wurden wie folgt gefärbt: CD4, CD44, PD-1/CD274, CTLA-4/CD152; Gedächtnis Phänotyp CD4, CD44, CD62L; Dendritische Zellen MHCII, CD11c. Die durchflusszytometrische Messung wurde an einem FACSCanto II durchgeführt und mit FlowJo oder FACSDiva analysiert.

3.2.5 Intrazelluläre Färbung

Um Profil-Zytokine in differenzierten T-Zellen zu überprüfen, wurden intrazelluläre Färbungen durchgeführt. Die T-Zellen werden für 4Std mit Phorbol-12-Myristate-13-Azetat (PMA; 50 ng/ml), Ionomycin (500ng/ml) und Golgi-Stopp (1µg/ml) (Alle Produkte von BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland) in T-Zell-Medium inkubiert. Permeabilisiert wurden die Zellen mit dem Zytotfix/Zytoperm-Kit. T-Zellen wurden mit Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern gegen CD4, CD25, IFN- γ , IL-17A und FoxP3 gefärbt. Zellen wurden für 15 min bei 4°C inkubiert und mit 1% PFA/PBS für 1 Std inkubiert. Zellen wurden anschließend mit Fix/Perm Puffer gewaschen. Intrazelluläre Färbungen wurden anschließend über Nacht in Fix/Perm-Puffer durchgeführt.

3.2.6 Analyse ZNS-infiltrierender Zellen und Adoptiver Transfer

Immunzellen wurden aus den Lymphknoten von 2D2-Mäusen isoliert und T-Helfer-Zellen mittels magnetischer Separation (MACS) aufgereinigt. Die Zellen wurden mit MOG₃₅₋₅₅ und 10nM Retinsäure (retinoic acid; RA) stimuliert. Nach 5 Tagen wurden die Zellen mit 15 µM Carboxyfluoresceinsuccinimidylester (CFSE) gefärbt. 1×10^6 dieser CD4⁺ T-Zellen wurden anschließend i.p. in Wildtypen oder TH-Mäuse injiziert. Nach 5 und 10 Tagen wurden die sekundär lymphatischen Organe, der Darm und ZNS auf das Vorkommen markierter T-Zellen untersucht. Aufgrund der schwindenden Fluoreszenz des CFSE (Zellteilung halbiert die vorhandene Fluoreszenz der Zelle), wurde der experimentelle Ansatz noch einmal mit einem genetisch gestütztem Modell

vorgenommen. Hierzu wurden Nur77-eGFP CD4⁺ T-Zellen verwendet und mit 2D2, Smad^{CD2}, SmadCD4^{-/-} -Zellen gekreuzt. Nur77-Zellen exprimieren GFP unter dem CD69-Promotor, einem Aktivierungsmarker für T-Zellen. Hierdurch wurde es möglich autoreaktive T-Zellen permanent durch den Organismus zu verfolgen.

3.2.7 Aufregulation der Darm-Homing-Rezeptoren

CD4⁺ T-Zellen wurden aus der Milz und den axillären Lymphknoten isoliert. 1x10⁶ wurden pro Well mit Isocove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM), 10% FCS und 30µM beta-Mercaptoethanol auf einer anti-CD3/28 behandelten 96-Well-Platte (Rundboden) für 5 Tage bei 37°C kultiviert. Nach 5 Tagen wurden 200nM Retinsäure hinzugegeben, um die Darm-Homing –Rezeptoren aufzuregulieren. Das Medium wurde jeden zweiten Tag gewechselt. CD4⁺ T-Zellen wurden für CCR9 und α4β7 mittels Durchflusszytometrie überprüft und, wie oben beschrieben, injiziert.

T-Zellen aus einem erkrankten OSE- oder EAE-Tier wurden entnommen und mit 10µM MOG₃₅₋₅₅ für 24 Std inkubiert, gefolgt von einer zusätzlichen Stimulation mit Retinsäure für weitere 24 Std.

3.2.8 Das adoptive Transfer-EAE-Modell

Für den adoptiven Transfer (AT) wurde zuerst eine aktive Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis (EAE) induziert oder sich einer spontan entstehenden OptikoSpinalen Enzephalomyelitis bedient. Im EAE-Modell wurden nach 30 Tagen, im OSE-Modell nach 80 Tagen die CD4⁺ T-Zellen aus der Milz und den Lymphknoten isoliert (Donor-Tier). Es wurden 1x10⁶ der isolierten T-Zellen in Rezipienten gegeben. In einigen Experimenten wurde zusätzlich Pertussistoxin (PTX) appliziert.

3.2.9 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Blut wurde von OSE, Smad7^{CD2}-OSE and Smad7^{CD4/-}-OSE an den Tagen 20, 40 , 60 und 80 nach Geburt gesammelt. Anschließend wurden die Immunglobulin (Ig) M, G1 und G2a mittels ELISA Ready-Set-Go!-Kit analysiert. OD-Werte der Überstände wurden mittels Microplate Reader bestimmt.

Die Zytokine IFN γ und IL-17 wurden entsprechend der Vorgaben der Hersteller durchgeführt.

3.2.10 Isolation der Lamina propria Lymphozyten

CD4⁺ T-Zellen wurden isoliert wie in der Publikation von Nature protocols beschrieben (Weigmann et al., 2007). Kurz, der Dünn- und Dickdarm wurden gespült und geschnitten. Die Mukosa wurde von der Muskelschicht des Darms getrennt und anschließend Vor-verdaut mit HBSS, EDTA und DTT für 20min bei 37°C. Um die Epithel-, Villus-, Subepithelzellen und Lymphozyten voneinander zu separieren, wurde das Gewebe in mehreren Waschschritten mit 0.05g Collagenase D und Dispase II in 100 ml PBS inkubiert. Um die CD4⁺ T-Zellen der entstandenen Zellsuspension zu separieren, wurde ein Percoll-Gradient 40 und 80%er Dichte verwendet.

Für die Isolation von CD11c⁺-Zellen wurden unter Verwendung von HBSS mit FCS, Kollagenase, Dispase und DNase I für 1 Std bei 37°C inkubiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand mit EDTA in HBSS für 5 min inkubiert, gefolgt von einer magnetischen Separation für CD11c⁺-Zellen für die Purifikation vorwiegend dendritischer Zellen.

3.2.11 Real-time Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR)

CD4⁺, CD8⁺ und CD19⁺ T- und B-Zellen aus OSE, Smad7^{CD2}-OSE und Smad7^{CD4/-}-OSE-Mäusen wurden mittels magnetischer Separation isoliert. Mit Hilfe des RNeasy Kits konnte die RNA aus den Zellen isoliert werden. Anschließend wurde mit dem Super Skript cDNA Synthese Kit die RNA revers transkribiert werden. Die Analyse erfolgte mit der quantitativen RT-PCR. Der vergleichbare Grenzwertzyklus und zwei interne Kontrollen über GAPDH und Aktin wurden verwendet. Sequenzen der Primer sind in Tabelle 3.1.11 nachzulesen.

3.2.12 Proliferations-Assay

CD4⁺ T-Zellen wurden mittels magnetischer Separation isoliert und anschließend mit 15 μ M CFSE gefärbt. Für die Proliferation wurden 250.000 Zellen in Anwesenheit von α CD3/28 (1 μ g/ml; 10 ng/ml) und verschiedenen Konzentrationen von MOG₃₅₋₅₅

(0.1-10 µg/ml) kultiviert. Die Proliferation wurde mit Hilfe der Durchflusszytometrie bestimmt.

3.2.13 Suppressions-Assay

Regulatorische CD4⁺ T-Zellen oder dendritische Zellen wurden als potenzielle suppressive Zellen aus dem Darm von Wildtyp-Mäusen isoliert. Aus den Lymphknoten wurden CD4⁺ T-Zellen von 2D2, 2D2xSmad7^{CD2} oder 2D2xSmad^{CD4-/-} als potenzielle Effektor-Zellen entfernt. 2x10⁵ der Effektor-Zellen wurden zusammen mit steigender Anzahl suppressiver Zellen gemeinsam kultiviert (1:64, 1:32, 1:16, 1:8, 1:4, 1:2 und eine Proliferationskontrolle ohne den Einfluss suppressiver Zellen).

3.2.14 Eradikation des Darm-Mikrobioms

Um das Darm-Mikrobiom von Tieren zu entfernen, wurde mittels eines Antibiotika-Cocktails, bestehend aus Ampicilin (1 g/ml), Vancomycin (0.5 g/ml), Neomycinsulfat (1 g/ml) und Metronidazole (1 g/ml), jeden zweiten Tag während der Adoptiven Transfers oral verabreicht. Für die therapeutische Eradikation wurden die Antibiotika beim ersten Anzeichen klinischer Symptome verabreicht. Die prophylaktische Eradikation wurde 5 Tage vor dem erwarteten Erkrankungsbeginn (25-28Tage nach Geburt) gegeben.

3.2.15 *In vivo* Proliferation von T-Zellen

Um die Proliferation von CD4⁺ T-Zellen *in vivo* zu untersuchen wurde eine BrdU-Färbung durchgeführt. OSE, Smad7^{CD2}-OSE oder Smad^{CD4-/-}-OSE wurden i.p. 50mg/kg BrdU 24 Std vor Perfusion. Mittels histologischem Antikörper-Nachweis (Klon MA3-071; Thermo Fisher Scientific) konnte BrdU nachgewiesen werden.

3.2.16 Isolation von ZNS-infiltrierenden Lymphozyten

Erkrankte Mäuse wurden mit PBS perfundiert und anschließend wurde das Rückenmark und das Gehirn entnommen. Das dissoziierte Gewebe wurde anschließend mit 1 mg/ml DNase in HBSS für 20min bei 37°C inkubiert. Das Gewebe wurde anschließend homogenisiert mit 2 ml RPMI und schließlich in 8 ml RPMI resuspendiert. Die Lymphozyten wurden, wie beschrieben, mittels Percoll-Gradient isoliert.

3.2.17 Permeabilität der Bluthirnschranke

Erkrankte Mäuse wurden thorakal geöffnet und über die Applikation einer 0,9%igen NaCl-Lösung in die linke Herzkammer infundiert. Anschließend wurden 2%iges Evans blue in 0,9% NaCl bei langsamer Flussgeschwindigkeit appliziert. Bei permeabilisierter Blut-Hirn-Schranke kann Evans blue im ZNS nachgewiesen werden.

3.2.187 Histologische Analyse humaner intestinaler Biopsien

Retrospektiv wurden 27 MS-Patienten und 27 gesunde Kontrollen (HC), Geschlechts- und Alter-übereinstimmend, ohne chronisch-entzündliche Erkrankungen identifiziert (Anhang 4). Biopsien wurden in eine 10%ige Formalin-Lösung gegeben. Die immunhistochemische Färbung wurde an Paraffin-eingebetteten 1- μ m-Abschnitten gemäß den Anweisungen des Herstellers (Dako, Glostrup, Dänemark) durchgeführt. Primär-Antikörper, die für Smad7 (1:25), pSmad2/3 (1:25), IFN γ (1: 100) und IL-17 (1: 100) spezifisch sind, wurden bei 4°C über Nacht inkubiert. Primär-Antikörper, die für CD4 (1: 100) und FoxP3 (1: 100) spezifisch sind, wurden bei 37°C für 30 Minuten gemäß dem Protokoll des Herstellers inkubiert. Die Farbentwicklung für pSmad2 / 3, CD4, FoxP3, IL-17 und IFN γ wurde mit dem Dako REAL Detection System (Dako, Glostrup, Dänemark) durchgeführt, wohingegen die Färbung für Smad7 mit AP-Polymer anti-mouse (Zytomed Systems, Berlin, Deutschland) und AP Fast Red (Zytomed Systems, Berlin). Alle Schnitte wurden mit Mayer's Hämatoxylin für 45s gegengefärbt. Basierend auf der Probengröße wurde die histochemische Immunfärbung in bis zu vier Sichtfeldern (FOV) ausgewertet. ImageJ (NIH, Maryland, USA) wurde verwendet, um die Fläche der Lamina propria jedes FOVs zu bestimmen. Gefärbte Zellen wurden pro 0,1 mm² gezählt.

3.2.19 Statistische Analyse

Alle statistischen Tests wurden mit GraphPad Prism 6.0 Software (Graphpad Software, Inc., La Jolla, USA) durchgeführt. Klinische Krankheitsverläufe wurden anhand der *area under the curve*, AUC analysiert. Experimente mit drei oder mehr Gruppen wurden unter Verwendung einer Zweiweg-ANOVA analysiert, gefolgt von einer Post-hoc-Analyse unter Verwendung des Tukey-Tests. Humane Darmbiopsien wurden, falls die Daten normalverteilt waren, mit dem student's t-Test ausgewertet

und mit dem Mann-Whitney-U-Test, falls die Daten nicht normal verteilt waren. Ein p-Wert $<0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen.

3.2.20 Studiengenehmigung

Alle Versuche, an denen Tiere beteiligt waren, wurden nach den Richtlinien des Tierpflegeausschusses der nordrheinischen Behörden genehmigt und durchgeführt Westfalen (Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz). Die Untersuchung der Darm-Biopsien wurde durch das Ethik-Gremium der Medizinischen Fakultät der Ruhr-Universität Bochum (Nummer 4747-13) genehmigt.

4. Ergebnisse

In dieser Arbeit wurde die Rolle von Smad7 im Modell der spontan entstehenden optikospinalen Enzephalomyelitis (OSE), einem Mausmodell der Multiplen Sklerose (MS), untersucht (Krishnamoorthy et al., 2006). Zwar wird Smad7 ubiquitär exprimiert, jedoch entscheidet die Expressionsstärke über die funktionellen Eigenschaften der T-Zellen (Kleiter et al., 2010). Um speziell die Funktion von Smad7 in T-Zellen untersuchen zu können, wurden T-Zell-spezifisch Smad7-überexprimierende Mäuse (Smad7^{CD2}) (Litzenburger et al., 1998) und Smad7-defiziente Mäuse (Smad7^{CD4^{-/-}}) (Kleiter et al., 2007) für die Versuche eingesetzt. Diese Mauslinien wurden anschließend in OSE-Tiere eingebracht. In dieser Arbeit wurde der Darm als Induktionsorgan für die Entstehung von ZNS-Inflammation untersucht. Im weiteren wurden die Migrationseigenschaften und die Autoreaktivität von T-Zellen mit Smad7-Überexpression oder -Deletion im Hinblick auf ZNS-Infiltration und -Demyelinisierung untersucht.

4.1 Der Phänotyp von OSE-Mäusen

Die Funktionalität der Überexpression von Smad7 in Smad7^{CD2}-OSE und der Knock-out von Smad7 in Smad7^{CD4^{-/-}}-OSE wurde durch die Genotypisierung mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und Real-time (RT)-PCR für Smad7 bestätigt. Dabei wurden die wildtypische Expression von Smad7 mit der von homozygoten Smad7^{CD2} und Smad7^{CD4^{-/-}}-Tieren verglichen (Abb. 4). Für die Spezifität gegenüber CD4⁺ T-Zellen wurden für die RT-PCR zusätzlich zytotoxische CD8⁺ und B-Zellen in die Analyse einbezogen (Abb. 4)

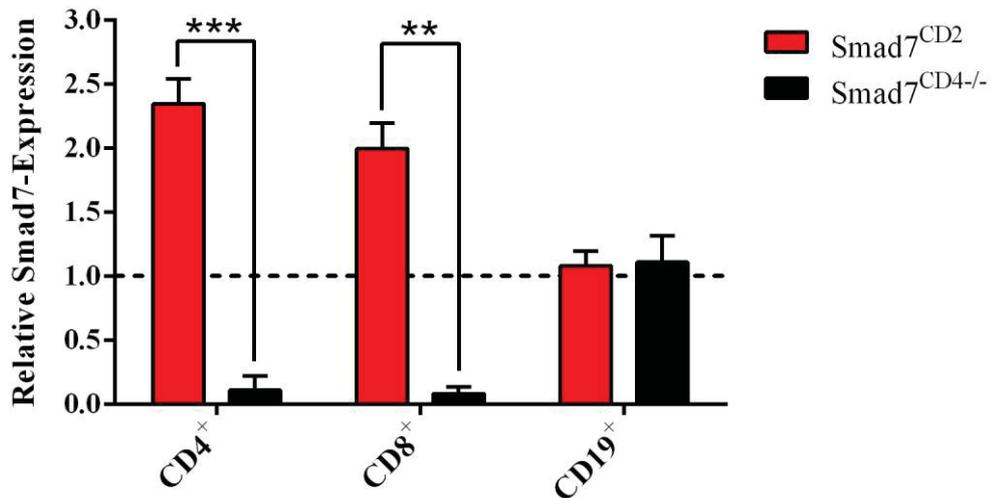


Abbildung 4: Lymphozyten aus OSE-Mäusen mit T-Zell-spezifischer Smad7-Deletion oder Smad7-Überexpression. T-Zellen wurden aus Smad7^{CD2}-OSE (rot) und Smad7^{CD4-/-}-OSE (schwarz) isoliert und mittels magnetischer Separation in T-Helfer-Zellen (CD4⁺), zytotoxische T-Zellen (CD8⁺) sowie B-Zellen (CD19⁺) aufgereinigt. Die mRNA der separierten Lymphozyten wurde isoliert und mittels RT-PCR auf die Expression von Smad7 hin untersucht. Die Abbildung zeigt die Smad7-Expression von CD4⁺, CD8⁺ und CD19⁺ Lymphozyten, normalisiert zur Kontrolle (gestrichelte Linie). Es wurden n=4 Mäuse pro Gruppe in einem Alter von 80 Tagen verwendet. Die gezeigten Werte repräsentieren den Mittelwert±SD. Die Signifikanz wurde mittels 2-seitigem ANOVA und Tukey post-hoc Analyse bestimmt. ** p<0.01, *** p<0.01.

Es konnte eine mehr als zweifach so hohe Expression von Smad7 in Smad7^{CD2}-OSE T-Zellen gegenüber der Kontrolle nachgewiesen werden (2,34±0,12; MW±SD;). Die Expression von Smad7 in Smad7^{CD4-/-}-OSE war dagegen erwartungsgemäß vernachlässigbar (0,11±0,06) (Abb. 4). Zytotoxische CD8⁺ T-Zellen wurden in gleicher Weise beeinflusst. Smad7^{CD2} wird unter dem CD2-Promotor, einen T-Zell-spezifischen Marker, konstitutiv exprimiert und hat deshalb auch Einfluss auf zytotoxische CD8⁺ T-Zellen. Smad7^{CD4-/-} betrifft aufgrund der vorhandenen Expression von CD4 während der Reifung im Thymus auch zytotoxische CD8⁺ T-Zellen. Die Expression von Smad7 in CD19⁺ B-Zellen war nicht verändert.

4.2 Die Rolle von T-Zell-Smad7 für den klinischen Verlauf der spontanen optikospinalen Enzephalomyelitis

Die spontane optikospinale Enzephalomyelitis (OSE) ist ein Mikrobiom-abhängiges Mausmodell für die induzierbare Progression MS-ähnlicher Symptome (Krishnamoorthy et al., 2006). Um zu untersuchen, welchen Einfluss Smad7 in intestinalen T-Zellen auf die spontane Entstehung der EAE hat, führten wir eine Smad7-Überexpression (Smad7^{CD2}) und eine Smad7-Deletion (Smad7^{CD4^{-/-}}) in 2D2- und TH-Mäusen durch. Die entstandenen Linien 2D2-Smad7^{CD2}, TH-Smad7^{CD2} und 2D2-Smad7^{CD4^{-/-}} sowie TH-Smad7^{CD4^{-/-}} wurden dann miteinander verpaart und der Einfluss von Smad7 auf die klinische Ausprägung der OSE untersucht (Abb.5).

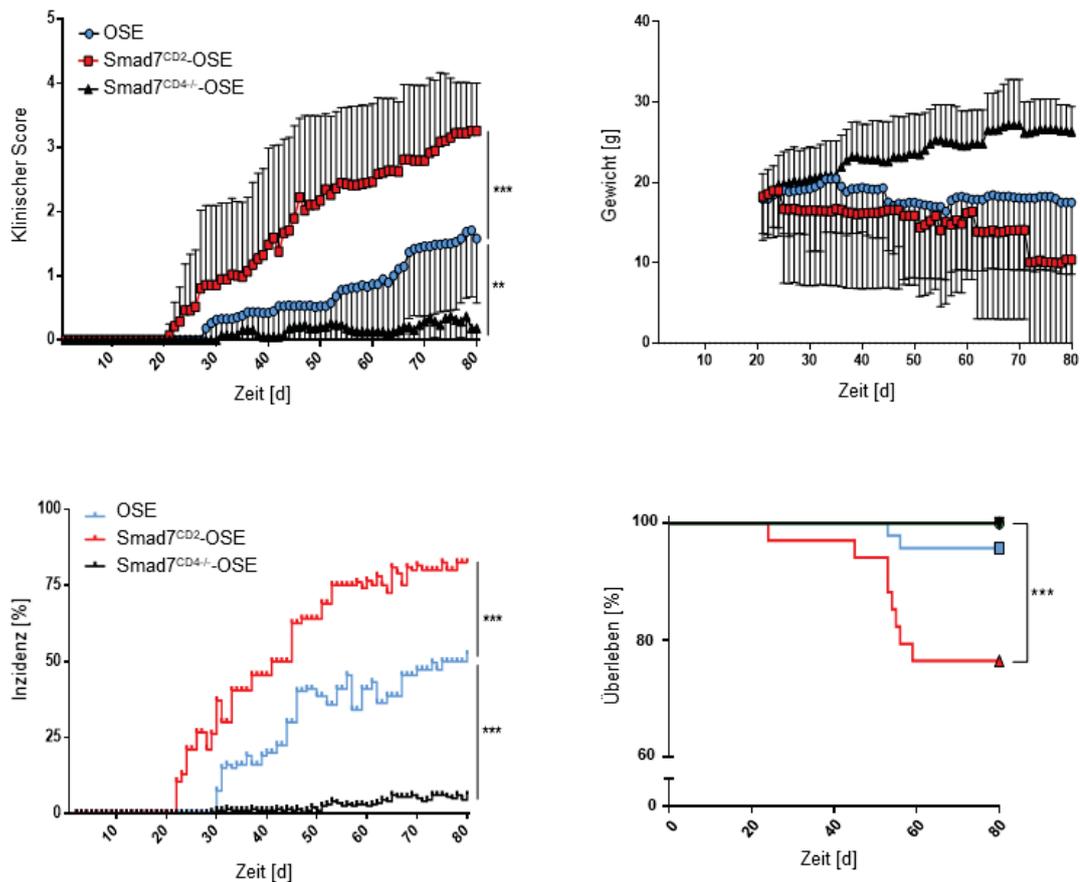


Abbildung 5: Klinischer Verlauf von OSE-Mäusen mit T-Zell-spezifischer Smad7-Überexpression oder Smad7-Deletion. OSE (blau), Smad7^{CD2}-OSE (rot), Smad7^{CD4/-}-OSE (schwarz) wurden über 80 Tage beobachtet. Der mittlere klinische Verlauf (A) zeigt die Progression der Behinderung über Zeit. Die auftretenden Symptome der Versuchstiere werden anhand eines Scoring-Systems bewertet; 0, keine klinischen Symptome; 1, Schwanz paralytisch; 2, ein Hinterbein gelähmt; 3 beide Hinterbeine gelähmt; 4; beide Hinterbeine und beide Vorderbeine sind gelähmt, 5; Tod. Tiere ab einem Score von 4 wurden entsprechend der Tierschutzrichtlinien umgehend aus dem Versuch entfernt. Das Gewicht verhielt sich umgekehrt proportional zum Score der Tiere (B). Die Inzidenz zeigt die Gesamtzahl der Erkrankungen in OSE, Smad7^{CD2}-OSE und Smad7^{CD4/-}-OSE-Gruppen (C). Das Überleben der Mäuse wurde über die Observationszeit betrachtet (D). Für die Versuche wurden männliche und weibliche Mäuse verwendet. Die Anzahl pro Gruppe ist: OSE, n=57; Smad7^{CD2}-OSE, n=46; Smad7^{CD4/-}-OSE, n=34. Die statistischen Unterschiede wurden zuerst über eine *Area Under the Curve (AUC)* und anschließend über *Receiver Operating Characteristic (ROC)*-Analyse bestimmt. ** p<0.01, *** p<0.001.

	Inzidenz der spontanen EAE in OSE, Smad7 ^{CD2} -OSE und Smad7 ^{CD4/-} -OSE		
Maus	OSE	Smad7 ^{CD2} -OSE	Smad7 ^{CD4/-} -OSE
Inzidenz(%)	28/57 (47%),	38/46 (83%) p=0,0001	3/34 (8%) p=0,0001
Tag des Erkrankungsbeginn	28,4±2,6	23,7±2,2 p=0,0001	35,2±5,7 p=0,0001
Max. Score	1,7±1,9	3,1±0,8 p=0,001	0,3±0,2 p=0,004
OSE bedingte Tode	0/57 (0%)	8/46 (17%)	0/34 (0%)

Tabelle 1: Klinische Statistik zu der Erkrankung von OSE- und OSE-Mäusen mit Smad7-Deletion oder Smad7-Überexpression. Es wurden die Inzidenz (%), der durchschnittliche Tag der ersten Erkrankung, der maximale Score und OSE abhängige Tode 80 Tage nach der Geburt erfasst. Dabei wurden Smad7^{CD2}- und Smad7^{CD4/-}-OSE-Tiere jeweils mit OSE-Tieren (Kontrolle) verglichen. Tiere mit einem Score von >3.5 wurden laut tierexperimentellen Richtlinien euthanasiert und weiter mit einem Score von 5.0 geführt. Die Anzahl pro Gruppe ist: OSE, n=57; Smad7^{CD2}-OSE, n=46; Smad7^{CD4/-}-OSE, n=34. Die Signifikanz wurde mittels 2-seitigem ANOVA und Tukey post-hoc Analyse bestimmt. ** p<0.01, *** p<0.001

Der mittlere klinische Score wurde für OSE-Mäuse über 80 Tage nach Geburt beobachtet (Abb. 5A). OSE-Mäuse zeigten einen durchschnittlichen klinischen Score von 1,7±0,19 (MW±SEM), wohingegen die Überexpression von Smad7 in T-Zellen zu einer Verdopplung des klinischen Scores (3,1±0,8) und bei acht erkrankten Mäusen vorzeitig zum Tod führte (Tabelle 1). Dagegen zeigten Mäuse mit einer Smad7-Deletion nur geringe Krankheitssymptome (Score 0,5±0,2) (Tabelle 1). Auch der

Erkrankungsbeginn wurde durch die Expressionstärke von Smad7 in T-Zellen beeinflusst: So führte die Smad7-Expression zu einem rund fünf Tage früheren Auftreten der Erkrankung (Smad7^{CD2}-OSE; Mittelwert Tag 23,7) und die Smad7-Deletion zu einem sieben Tage späteren Erkrankungsbeginn (Smad7^{CD4/-}-OSE; Tag 35,2) im Vergleich zu OSE-Mäusen (Tag 28,4). Die Inzidenz wurde maßgeblich durch die Expression von Smad7 in T-Zellen bestimmt. 47% (28/57) der OSE-Mäuse wurden im Durchschnitt krank. Die Smad7-Überexpression führte zu einer Steigerung erkrankter Tiere auf 83% (38/46). Übereinstimmend mit dem schwachen klinischen Score in Smad7^{CD4/-}-OSE-Tieren, traten bei nur etwa 14 % (3/34) der Mäuse klinische Erkrankungszeichen auf (Tabelle. 1; Abb. 5C). Im Vergleich mit der OSE- und Smad7^{CD4/-}-OSE-Gruppe zeigte sich in der Smad7^{CD2}-OSE-Gruppe eine krankheitsbedingte Sterblichkeitsrate von 17% (8/46 Tieren; Tabelle 1; Abb. 5).

Einhergehend mit der entstehenden Störung des Bewegungsablaufs bei den Versuchstieren war eine Demyelinisierung des Rückenmarks anzunehmen. Aufgrund der Vorarbeiten konnte eine Entzündungsreaktion im Gehirn ausgeschlossen werden (Krishnamoorthy et al., 2009), da sich im OSE-Modell, ähnlich wie in der Neuromyelitis optica (NMO), die Entmarkung auf Rückenmark und Sehnerv beschränkt (Kim et al., 2015a).

Die Fläche der infiltrierten weißen Substanz wurde anhand einer Hämatoxylin-Eosin-Färbung (H&E) untersucht (Abb. 6). Die Demyelinisierung wurde durch die Färbung des Myelins mittels Fluoromyelin F (FMF) sichtbar gemacht (Abb. 6). Dabei wurden die Bereiche des lumbalen, thorakalen und zervikalen Rückenmarks analysiert.

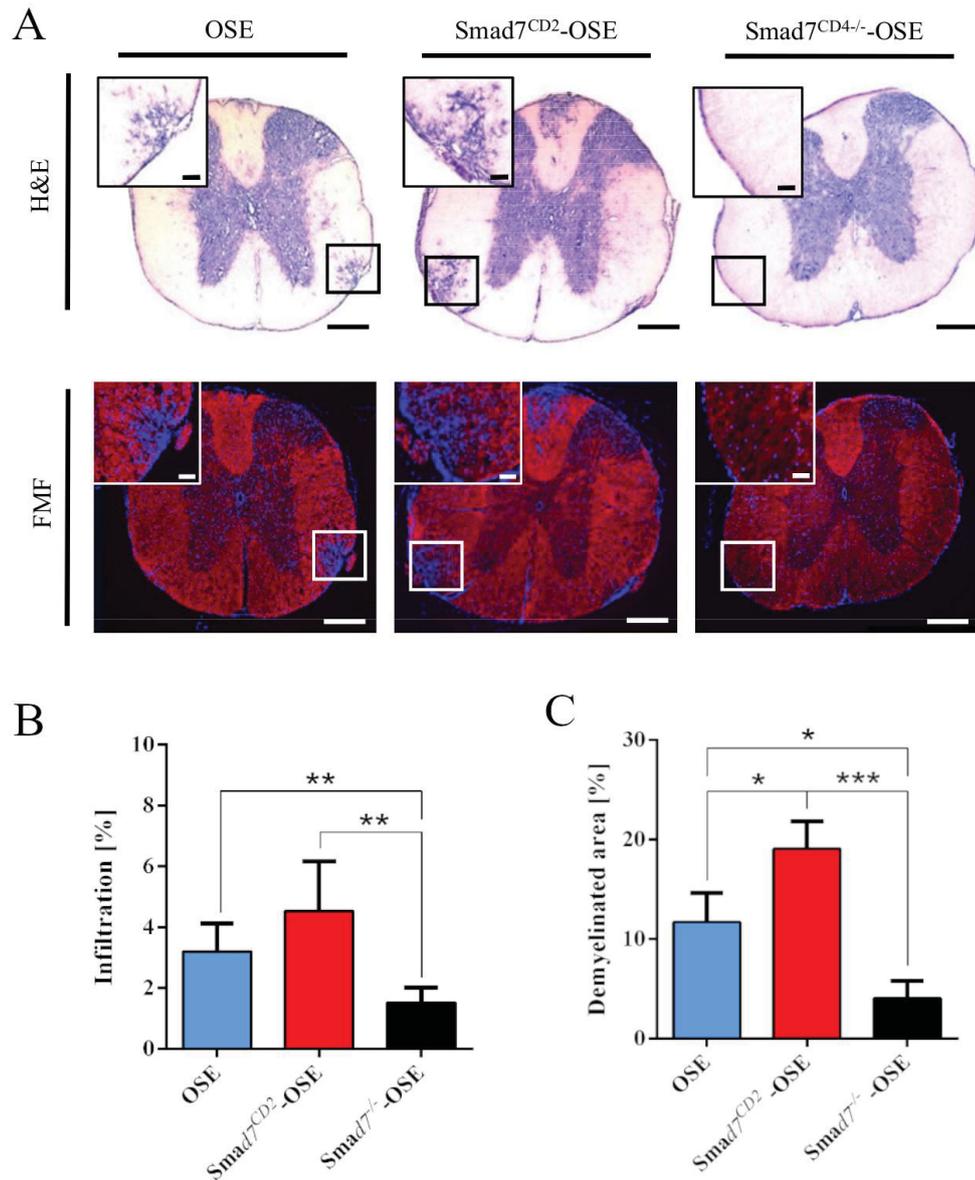


Abbildung 6 Infiltration und Demyelinisierung des Rückenmarks während der OSE. Gezeigt sind repräsentative histologische Bilder des thorakalen Bereichs des Rückenmarks von OSE (blau), Smad7^{CD2}-OSE (rot), Smad7^{CD4}-OSE-Mäusen (schwarz) (A). Die Quantifizierung der strukturellen Beschaffenheit des Rückenmarks wurde mittels H&E-Färbung bestimmt (B); die Entmarkung der weißen Substanz wurde durch die Fluoromyelin F (FMF) Färbung dargestellt (C). Die Färbungen zwischen H&E und FMF wurde mit angrenzenden Schnitten durchgeführt (Maßstab = 250µm). Die Inlays zeigen eine Vergrößerung der infiltrierten Bereiche (Maßstab = 100µm). Es wurden n=12 Tiere je Gruppe analysiert. Die Signifikanz wurde mittels 2-seitigem ANOVA und Šidák post-hoc Analyse bestimmt. * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001.

Übereinstimmend mit dem schlechteren Krankheitsverlauf bei Tieren mit T-Zell-spezifischer Smad7-Expression war auch die Infiltration von Immunzellen abhängig

von der Smad7-Expression in T-Zellen. Hier korrelierte die höhere Expression von Smad7 mit der Infiltration von Immunzellen ins Rückenmark. So zeigte sich tendenziell eine Steigerung der Infiltration in Smad7^{CD2}-OSE-Tieren ($4,5 \pm 0,66$, MW \pm SEM) im Vergleich zu OSE-Tieren ($3,2 \pm 0,37$). Eine signifikant reduzierte Entmarkung konnte bei Smad7^{CD4}-OSE-Tieren festgestellt werden ($1,5 \pm 0,19$, Smad7^{CD4}-OSE vs OSE, $p=0,0025$; Smad7^{CD4}-OSE vs Smad7^{CD2}-OSE; $p=0,0014$). Zudem konnte eine Smad7 bedingte Steigerung der Demyelinisierung im ZNS gezeigt werden (Abb. 6B). So wiesen Smad7^{CD2}-OSE-Tiere ($19,03 \pm 1,6$) eine signifikant stärkere Demyelinisierung im Vergleich zu OSE-Tieren ($11,69 \pm 1,7$, $p=0,0292$) und Smad7^{CD4}-OSE-Tieren ($4,0 \pm 1,02$, $p=0,0242$) auf (Abb. 6C).

4.3 Veränderungen der intestinalen Architektur und der Immunzellinfiltration während der OSE

Da die OSE spontan über den Darm induziert wird, wurden im nächsten Schritt potentielle Veränderungen der Darmarchitektur untersucht. Aus Vorarbeiten wurde deutlich, dass die OSE-Maus keinen auffälligen Phänotyp im Bereich des Darms oder der Immunzellen innerhalb des Darms aufwies (Krishnamoorthy et al., 2006). Veröffentlichungen aus der Bereich der induzierbaren EAE legen hingegen nahe, dass der Zeitpunkt nach EAE-Induktion ausschlaggebend für das Auftreten struktureller Veränderungen des Darms ist (Nouri et al., 2014).

Um nun festzustellen, ob in nativen OSE-Tieren bereits eine strukturelle und auch zelluläre Veränderung vorlag, welche schließlich Hinweise auf einen Initiationsmechanismus geben könnte, wurden an Darmschnitten Messungen der Kryptentiefe, Lamina Propria, Submukosa und der beiden den Darm umspannenden Muskelschichten (Stratum circulare, Stratum longitudinale) durchgeführt (Abb. 7). Bei der Untersuchung wurden Duodenum, Jejunum und Ileum (Dünndarms), sowie Kolon (Dickdarm) unterschieden (Abb.7).

80 Tage nach der Geburt konnten keine Unterschiede in den Strukturen der Lamina propria, dem Stratum circulare und dem Stratum longitudinale zwischen OSE-, Smad7^{CD2}-OSE- und Smad7^{CD4}-OSE-Tieren mittels H&E-Färbung festgestellt werden (Abb. 7). Die Submukosa war bei OSE- und Smad7^{CD2}-OSE-Tiere gegenüber der wildtypischen Kontrolle signifikant dicker (Abb 7B). Die Smad7-Expression hatte

keinen Einfluss. Smad7^{CD2}-OSE-Tiere wiesen eine größere Kryptentiefe im Vergleich zu Kontroll, OSE - und Smad7^{CD4/-}-OSE-Tieren auf (Abb. 7C). Trotz dieser Veränderungen konnten keine Infiltrate oder entzündlichen Konglomerate nachgewiesen werden.

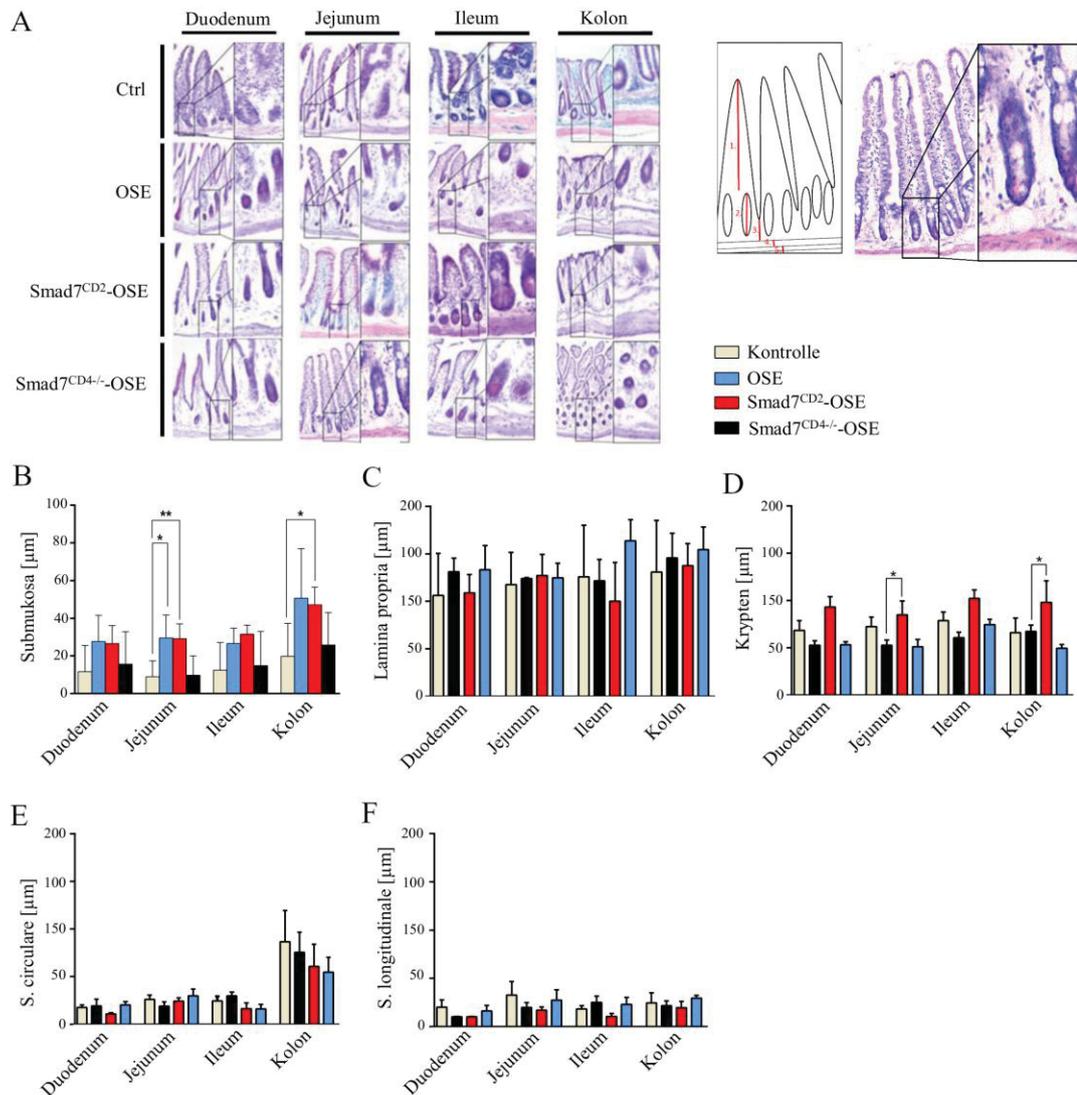


Abbildung 7: Histologische Untersuchungen des Darms während der OSE. Histologische Analyse des Darms aus den Bereichen Duodenum, Jejunum, Ileum und Kolon (A) aus OSE (blau), Smad7^{CD2}-OSE (rot), Smad7^{CD4/-}-OSE-Mäusen (schwarz). Die Schnitte wurden H&E gefärbt (Maßstab = 250µm; Inlays = 100µm). Gemessen wurden die Submukosa (B), Lamina propria (C) die Krypten (D), Stratum circulare (E) und Stratum longitudinale (F). Resultate sind als Mittelwert ± SEM dargestellt. Die Signifikanz wurde mittels 2-seitigem ANOVA und Tukey post-hoc Analyse bestimmt. * P<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001.

Das Immunsystem des Darms ist darauf ausgerichtet, eine möglichst engmaschige Kontrolle zwischen inflammatorischen und suppressiven Prozesse zu schaffen (Lozupone et al., 2012). Kleiter und Kollegen haben gezeigt, dass Smad7 die Polarisierung von T-Zellen durch Hemmung des TGF-beta-Signalwegs beeinflusst. Ob nun eine gesteigerte Pathogenität intestinaler T-Zellen durch die Expression von Smad7 auftritt und ob diese Zellen den strengen Kontrollmechanismen z.B. der Suppression durch dendritische Zellen entgehen können, wurde nun mittels zellulärer Analyse untersucht (Abb. 8). Intestinale T-Zellen stehen im Verdacht, an der Pathogenese der MS beteiligt zu sein (Lee et al., 2011). So ist bekannt, dass intestinal konservierte T-Zell-Rezeptoren (TCR) im Gehirn von MS-Patienten vorhanden sind (Held et al., 2015). Jedoch ist bis heute weder die Migrationsroute dieser Zellen noch deren immunologischer Phänotyp hinreichend ergründet.

Mittels Analyse isolierter T-Zellen aus dem Dick- und Dünndarm konnte gezeigt werden, dass die Zahl von T-Helfer-Zellen in der Lamina propria zwischen den OSE-Tieren ($55,63 \pm 3,4$; $MW \pm SEM$), Smad7^{CD2}-OSE ($47,5 \pm 2,08$) und Smad7^{CD4^{-/-}}-OSE ($43,7 \pm 2,88$) nicht variiert (Abb. 8). Die erhöhte Expression von Smad7 in T-Zellen bewirkt durch die Inhibition des TGF-beta-Signalwegs eine bevorzugte Differenzierung naiver T-Zellen in inflammatorische Th1-Zellen (Hasan et al., 2015). Ungehemmt, fördert der TGF-beta-Signalweg vorwiegend die Entstehung von Th17 und regulatorischen T-Zellen (Treg) (Kleiter et al., 2007). In der Lamina propria von Smad7^{CD2}-OSE-Tieren ($37,1 \pm 2,71$) wurde im Vergleich zu OSE-Tieren ($28,6 \pm 3,08$) eine erhöhte Anzahl von Th1-Zellen gefunden ($p=0,0164$). Die Deletion von Smad7 in T-Zellen ($14,7 \pm 1,86$) bewirkte hingegen eine starke Reduktion von Th1-Zellen ($p=0,0002$) (Abb. 8A+C). In OSE-Tieren ($12,5 \pm 1$) waren Th17-Zellen gegen über Smad7^{CD2}-OSE-Tieren ($1,4 \pm 0,12$; $p=0,0018$) und Smad7^{CD4^{-/-}}-OSE ($4,8 \pm 1,27$; $p=0,032$) in der Lamina propria mehr als verdoppelt (Abb. 8). Regulatorische T-Zellen werden im Smad7^{CD4^{-/-}}-OSE-Tier bevorzugt differenziert. So zeigte sich eine Steigerung detektierter Tregs in Smad7^{CD4^{-/-}}-OSE-Tieren ($22,4 \pm 1,7$; $p=0,045$) im Vergleich zur OSE- ($14,5 \pm 0,7$) und Smad7^{CD2}-OSE- ($8,9 \pm 3,3$) Gruppe (Abb. 8).

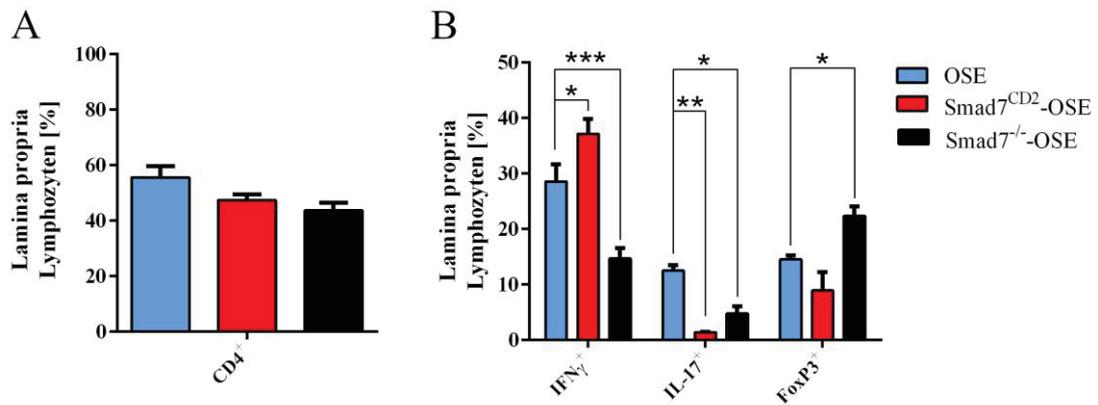


Abbildung 8: T-Zell-Analyse aus der Lamina propria. Frequenzanalyse der Darmständigen CD4⁺ T-Zellen aus OSE (blau), Smad7^{CD2}-OSE (rot), Smad7^{CD4^{-/-}}-OSE-Mäusen (schwarz). Es wurden CD4⁺ T-Zellen der gesamten Lamina propria (LP) isoliert und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Gemessen wurde der Unterschied in der Gesamtpopulation von CD4⁺ T-Zellen aus der LP (A). Zusätzlich wurde eine Subgruppen-Analyse für Th1 (CD4⁺IFN γ ⁺), Th17 (CD4⁺IFN γ ⁺) und regulatorische T-Zellen (CD4⁺FoxP3⁺CD25⁺) durchgeführt (B). In den Gruppen wurden n=12 Tiere vermessen. Resultate sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt. Die Signifikanz wurde mittels 2-seitigem ANOVA und Tukey post-hoc Analyse bestimmt. * P<0.05, ** p<0.01.

Da eine Smad7-abhängige Polarisierung der CD4⁺ T-Zellen im Darm gefunden wurde, sollte im nächsten Versuch die Akkumulation von Th1, Th17 und regulatorischen T-Zellen untersucht werden (Abb.9).

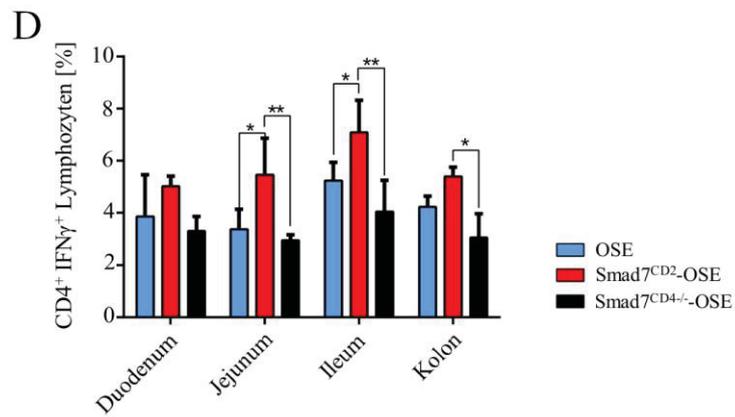
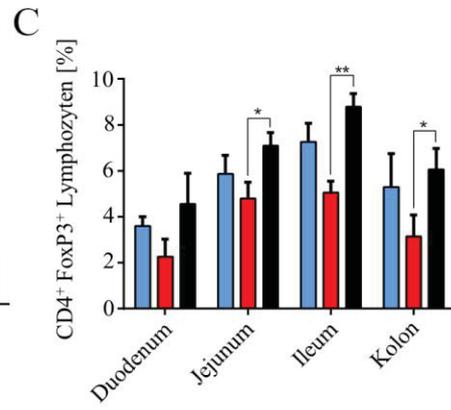
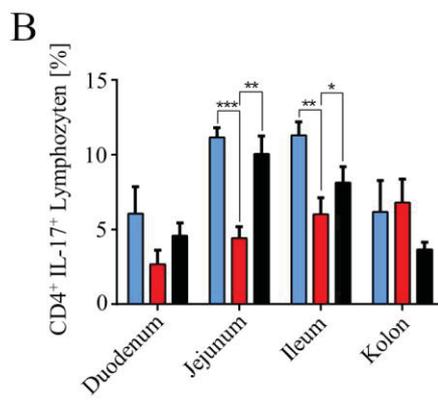
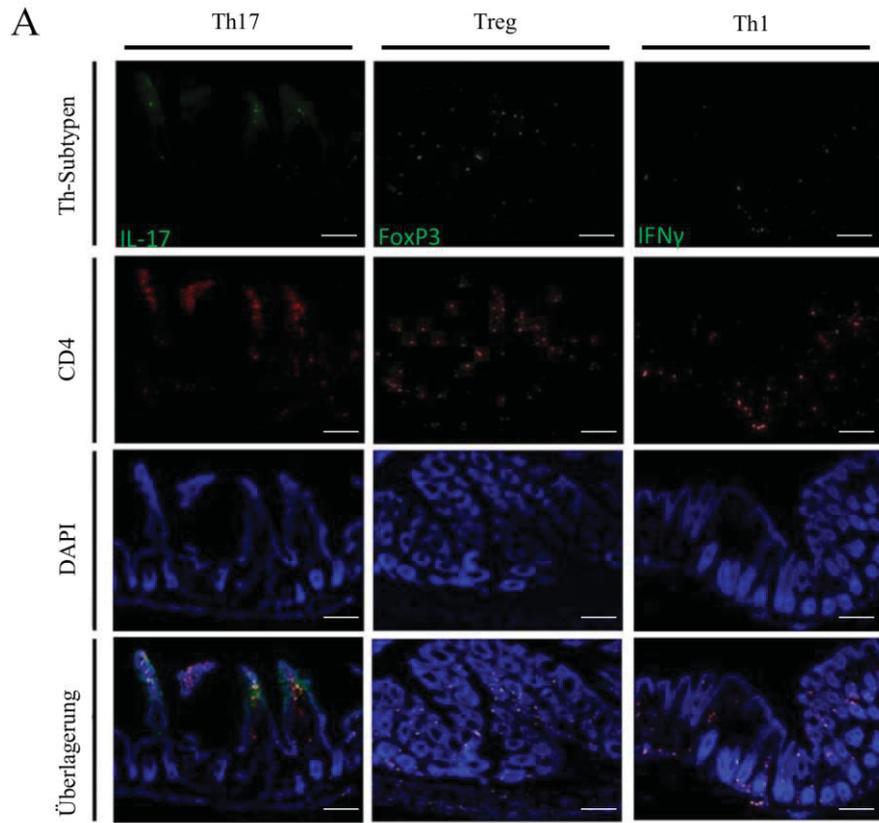


Abbildung 9: Histologische Untersuchung von T-Zell-Subtypen in der Lamina propria. Zellzählung der CD4⁺ T-Zellen von OSE (blau), Smad7^{CD2}-OSE (rot), Smad7^{CD4/-}-OSE-Mäusen (schwarz) (A). Analysiert wurden Th17 (CD4⁺IL-17⁺) (B), regulatorische T-Zellen (CD4⁺FoxP3⁺) (C) und Th1 (CD4⁺IFN γ ⁺) (D) aus den Darmabschnitten des Duodenums, Jejunums, Ileums und Colons. Die Zellen wurden mittels Immunfluoreszenz markiert und anschließend ausgezählt. In den Gruppen wurden n=6 Tiere vermessen. Resultate sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt. Die Signifikanz wurde mittels 2-seitigem ANOVA und Tukey post-hoc Analyse bestimmt. * P<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001.

Im Jejunum (JJ), Ileum (IL) und Kolon (KL) der Lamina propria von Smad7^{CD2}-OSE-Tieren (JJ, 5.7 \pm 1.3; IL, 7.1 \pm 0.7; KL, 5.9 \pm 0.2) wurden im Vergleich zu OSE-Tieren (JJ, 3.3 \pm 0.8; IL, 5.2 \pm 0.7; KL, 4.0 \pm 0.5) mehr Th1-Zellen gefunden. Die Deletion von Smad7 bewirkte hingegen eine starke Reduktion von Th1-Zellen (JJ, 3.0 \pm 0.6; IL, 4.2 \pm 0.4; KL, 3.5 \pm 0.4, Abb. 9). In OSE-Tieren (JJ, 11.7 \pm 2.5; IL, 12.1 \pm 3.7) waren Th17-Zellen gegen über Smad7^{CD2}-OSE-Tieren (JJ, 4.6 \pm 1.15; IL, 6.1 \pm 0.4) und Smad7^{CD4/-}-OSE (MW \pm SEM; JJ, 10.7 \pm 2.1; IL, 7.0 \pm 2.5) in der Lamina propria des JJ und des IL mehr als verdoppelt (Abb. 9). Regulatorische T-Zellen traten in der LP des Jejunum, Ileum und Colon von Smad7^{CD4/-}-OSE-Tieren häufiger auf. So zeigte sich eine Verdopplung von Tregs in der Darmmukosa von Smad7^{CD4/-}-OSE-Tieren (JJ, 7.4 \pm 0.8; IL, 8.4 \pm 0.5, KL, 37.1 \pm 0.7) im Vergleich zur OSE- (JJ, 5.9 \pm 0.3; IL, 7 \pm 0.4, KL, 5.6 \pm 0.7) und Smad7^{CD2}-OSE-Gruppe (JJ, 5.5 \pm 0.6; IL, 5.8 \pm 0.6; KL, 3.2 \pm 0.9) (Abb. 9).

4.4 Proliferation autoreaktiver T-Zellen

T-Zellen sind ein entscheidender Faktor für die Pathogenese der MS (Fletcher et al., 2010). Es stellt sich die Frage, ob und wie pathogene T-Zellen aus dem Darm eine autoreaktive Inflammation im ZNS verursachen können (Campbell, 2014). Ins ZNS einwandernde T-Zellen vollziehen nach der Erkennung des MOG-Antigens eine klonale Expansion und sorgen für die Fortführung des inflammatorischen Prozesses im ZNS (Gold and Rieckmann, 2007).

Um die immunologische Aktivität von autoreaktiven intestinalen T-Zellen zu untersuchen, wurden diese aus der Lamina propria erkrankter Mäuse isoliert und *ex vivo* mit MOG₃₅₋₅₅ restimuliert. In 2D2-Tieren ist die β -Kette des T-Zell-Rezeptors (TCR) genetisch verändert und für MOG₃₅₋₅₅ (V α 3.2, V β 11⁺) spezifisch. Um Unterschiede in der MOG₃₅₋₅₅-Restimulation aufgrund differenzieller Expression des

TCR^{MOG} auszuschließen, wurden Lamina propria-ständige CD4⁺T-Zellen für V α 3.2⁺, V β 11⁺ analysiert (Abb. 10). Zwischen OSE- (85,3 \pm 1,7, MW \pm SEM), Smad7^{CD2}-OSE- (89,1 \pm 0,7) und Smad7^{CD4}^{-/-}-OSE-Tieren (84,0 \pm 1,6) wurden vergleichbare hohe Frequenzen von V β 11⁺-T-Zellen gefunden (Abb.10). In Wildtyp-Tieren konnten keine CD4⁺ V α 3.2⁺V β 11⁺ T-Zellen identifiziert werden.

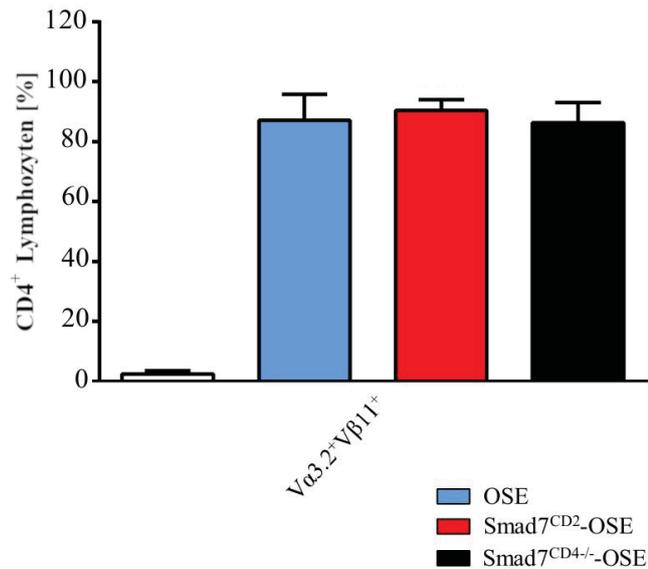


Abbildung 10: Analyse der MOG₃₅₋₅₅ spezifischen CD4⁺ V α 3.2⁺V β 11⁺ T-Zellen aus der Lamina propria. Die untersuchten Genotypen waren OSE (blau), Smad7^{CD2}-OSE (rot), Smad7^{CD4}^{-/-}-OSE-Mäusen (schwarz). Die Daten wurden mittels Durchflusszytometrie erhoben. Resultate sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt. Statistische Unterschiede wurden mittels Analyse durch 2-seitigen ANOVA mit anschließendem Tukey post-hoc Test ermittelt. *** p<0.001.

Zur Beurteilung der Proliferation intestinaler 2D2-T-Zellen wurde eine Färbung mit Carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE) durchgeführt, um die Zellteilung mittels interkalierendem Farbstoff sichtbar zu machen. Anschließend wurden die T-Zellen mit dem MOGMOG₃₅₋₅₅-Peptid oder dem Volllängenprotein von MOG (rekombinantes MOG-Protein) in aufsteigender Konzentration (1 μ g/ml; 10 μ g/ml) restimuliert. Da sich Dünn- und Dickdarm in immunologischer Hinsicht unterscheiden, wurden T-Zellen dieser Gewebe separat analysiert (Abb. 11). MOG-spezifische T-Zellen wurden mit den für die Antigen-Präsentation wichtigen dendritischen Zellen co-kultiviert. Aufgrund der bekannt starken Suppressionsmechanismen wie der hohen Konzentration von TGF- β , der Sekretion

von IL-10 und der PD-1 bedingten Toleranzmechanismen durch dendritische Zellen im Darm (Tran, 2012, Kole and Maloy, 2014, Coombes and Powrie, 2008) wurde eine entsprechende Reaktivität *ex vivo* nicht erwartet. Bekannt ist, dass MOG₃₅₋₅₅ eine der wenigen immundominanten Domänen des MOG-Proteins während der MHCII vermittelten Antigen-Präsentation ist (Weissert et al., 2001).

2D2-T-Zellen aus der Lamina propria des Dünndarms von erkrankten OSE-Tiere zeigten eine gesteigerte Proliferation in allen MOG-Konditionen im Vergleich zu 2D2- und 2D2-Smad7^{CD4^{-/-}}-T-Zellen. (MOG₃₅₋₅₅ 1µg/ml, 23,1±1,3, MW±SEM; MOG₃₅₋₅₅ 10µg/ml, 32,7±1,1; rMOG 1µg/ml, 24,4±2,6; rMOG 10µg/ml, 32,9±1,5) (Abb. 11A). 2D2-T-Zellen aus Smad7^{CD2}-OSE-Tieren zeigten eine signifikante Steigerung der Proliferation auf bis zu 50% in allen MOG-Konditionen (MOG₃₅₋₅₅ 1µg/ml, 41,5±5; MOG₃₅₋₅₅ 10µg/ml, 49±2,2; rMOG 1µg/ml, 38,9±2,5; rMOG 10µg/ml, 41,8±0,3) (Abb. 11A). 2D2-T-Zellen aus Smad7^{CD4^{-/-}}-OSE zeigten hingegen eine verringerte Proliferation in allen MOG-Konditionen (MOG₃₅₋₅₅ 1µg/ml, 13,1±1,3; MOG₃₅₋₅₅ 10µg/ml, 18,1±3,1; rMOG 1µg/ml, 14,4±2,6; rMOG 10µg/ml, 12,2±1,6) (Abb. 11A). Sowohl die gesteigerte T-Zell-Proliferation von Smad7^{CD2}-OSE T-Zellen als auch die reduzierte T-Zell-Proliferation von Smad7^{CD4^{-/-}}-OSE T-Zellen war gegenüber der OSE-Gruppe signifikant (1µg/ml MOG₃₅₋₅₅ OSE vs Smad7^{CD2}-OSE, p=0,042; OSE vs Smad7^{CD4^{-/-}}-OSE, p=0,037), (10µg/ml MOG₃₅₋₅₅ OSE vs Smad7^{CD2}-OSE, p=0,0058; OSE vs Smad7^{CD4^{-/-}}-OSE, p=0,024), (1µg/ml rMOG OSE vs Smad7^{CD2}-OSE, p=0,037; OSE vs Smad7^{CD4^{-/-}}-OSE, p=0,045), (10µg/ml rMOG OSE vs Smad7^{CD2}-OSE, p=0,011; OSE vs Smad7^{CD4^{-/-}}-OSE, p=0,0002).

Weiter konnte gezeigt werden, dass 2D2-T-Zellen aus der Lamina propria des Dickdarms ebenfalls durch die Expression von Smad7 auf die MOG₃₅₋₅₅-bedingte Restimulation unterschiedlich reagieren. T-Zellen des Dickdarms waren weniger responsiv gegenüber den dargereichten MOG-Stimuli (Abb. 11B). 2D2-T-Zellen aus Smad7^{CD2}-OSE-Tieren (MOG₃₅₋₅₅ 1µg/ml, 6,4±0,45; MOG₃₅₋₅₅ 10µg/ml, 7,5±0,35; rMOG 1µg/ml, 7,2±0,61; rMOG 10µg/ml, 9,2±1,3) zeigten eine signifikante Steigerung der Proliferation gegenüber T-Zellen aus OSE-Tieren (MOG₃₅₋₅₅ 1µg/ml, 3,27±0,43; MOG₃₅₋₅₅ 10µg/ml, 6±0,64; rMOG 1µg/ml, 4,1±0,29; rMOG 10µg/ml, 5,2±0,87). 2D2-T-Zellen aus Smad7^{CD4^{-/-}}-OSE-Tieren zeigten eine signifikante Reduktion in allen MOG-Konditionen. Dabei konnte gezeigt werden, dass in 1 µg/ml

MOG ($0,7\pm 0,43$) und rMOG ($1,57\pm 0,29$) stimulierten T-Zellen jeweils nur eine schwache Proliferation auftrat. Ebenfalls signifikant reduziert, jedoch deutlich responsiver gegenüber dem MOG-Stimulus war mit rMOG stimulierte T-Zellen ($2,7\pm 0,87$). 2D2-Zellen der $10\mu\text{g/ml}$ MOG₃₅₋₅₅ zeigten eine Tendenz zu einer Smad7-abhängig veränderten Proliferation, die jedoch nicht signifikant war (OSE, $0,6\pm 0,64$; Smad7^{CD2}-OSE $7,5\pm 0,35$; Smad7^{CD4-/-}-OSE $3,5\pm 0,65$), ($1\mu\text{g/ml}$ MOG₃₅₋₅₅ OSE vs Smad7^{CD2}-OSE, $p=0,0023$; OSE vs Smad7^{CD4-/-}-OSE, $p=0,014$), (1g/ml rMOG OSE vs Smad7^{CD2}-OSE, $p=0,0042$; OSE vs Smad7^{CD4-/-}-OSE, $p=0,017$), (10g/ml rMOG OSE vs Smad7^{CD2}-OSE, $p=0,021$; OSE vs Smad7^{CD4-/-}-OSE, $p=0,0032$).

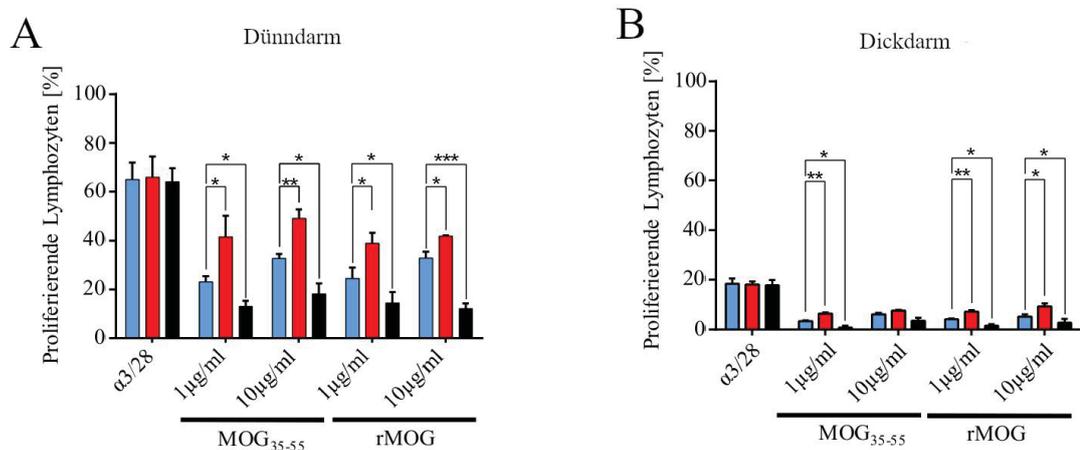


Abbildung 11: MOG₃₅₋₅₅-spezifische Proliferation von Vα3.2⁺Vβ11⁺CD4⁺ T-Zellen. Die 2D2-T-Zellen wurden von OSE (blau), Smad7^{CD2}-OSE (rot), Smad7^{CD4-/-}-OSE-Mäusen (schwarz) an Tag 80 nach Geburt gewonnen. Es wurden intestinalständige CD4⁺ T-Zellen aus dem Dünndarm (A) oder dem Dickdarm (B) isoliert. Zur Evaluation der Proliferation wurden die Zellen mit CFSE gefärbt und mit MOG-Peptid ($1\mu\text{g}$, $10\mu\text{g}$), rekombinanten Vollängen-MOG ($1\mu\text{g}$, $10\mu\text{g}$) oder $\alpha 3/28$ ($1\mu\text{g/ml}$, 10ng/ml) *ex vivo* restimuliert. Nach 5 Tagen wurden die Zellen mittels Durchflusszytometrie analysiert. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM der Gruppen mit $n=12$ Tieren je Gruppe. Die Signifikanz wurde mittels 2-seitigem ANOVA und Tukey post-hoc Analyse bestimmt. * $P<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$.

Eine erhöhte Expression von Smad7 in T-Zellen steigert die immunologische Proliferation von T-Zellen im Darm *ex vivo*. *In vitro* ist das Zytokin-Milieu entscheidend für die Funktionalität der T-Zellen und hat Einfluss auf den potenziellen Fortbestand von Zelltyp-Entitäten wie Th1, Th17 oder Treg und deren Integration in den Zellverbund (Flaherty and Reynolds, 2015).

Zu diesem Zweck wurden Immunzellen mit suppressiver Kapazität, d.h. dendritische Zellen oder regulatorische T-Zellen aus dem intestinalen Gewebe von Wildtypen isoliert und zusammen mit $V\alpha 3.2^+V\beta 11^+$ T-Zellen aus 2D2-Tieren kultiviert. Dabei wurden die MOG₃₅₋₅₅ spezifischen T-Zellen aus den axillären Lymphknoten und der Milz entnommen. In aufsteigendem Verhältnis von Effektor-T-Zellen zu Suppressor-Immunzellen (1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64 und Kontrolle) wurde die Suppression von T-Zellen aus OSE, Smad7^{CD2}-OSE Smad7^{CD4-/-}-OSE untersucht. Aus Vorarbeiten ging hervor, dass eine vergleichbare Proliferation aus 2D2-T-Zellen der Lamina propria und der sekundären lymphatischen Organe induziert werden konnte, sodass auf die Entnahme aus der LP verzichtet werden konnte.

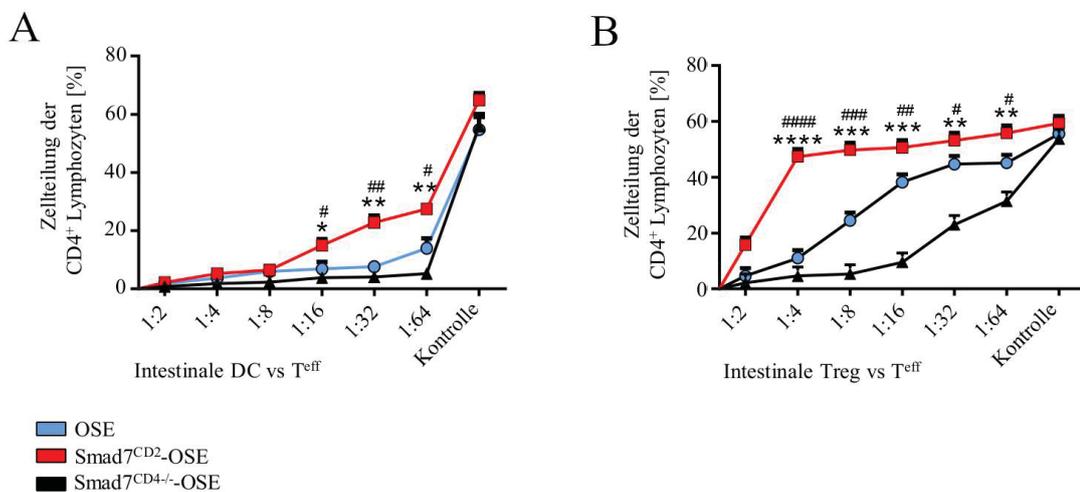


Abbildung 12: Suppressions-Assay reaktiver Smad7-manipulierter T-Lymphozyten ex vivo. Es wurden intestinale dendritische Zellen und intestinale regulatorische T-Zellen aus dem Darm isoliert und zusammen mit MOG₃₅₋₅₅-spezifischen T-Zellen kultiviert. Die dendritischen Zellen und regulatorischen T-Zellen wurden mittels Antikörper vermittelter magnetischer Separation (MACS) aufgereinigt. Die T-Effektor-Zellen wurden jeweils aus den Lymphknoten von OSE (blau), Smad7^{CD2}-OSE (rot) oder Smad7^{CD4-/-}-OSE-Mäusen (schwarz) entnommen und mit CFSE gefärbt. Die suppressiven Zellen wurden dann in einer aufsteigenden Verdünnung von 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 und 1:32 den Effektor-T-Zellen hinzugegeben. Als Kontrolle wurde eine Stimulationskontrolle ausschließlich mit Effektor-T-Zellen durchgeführt. In jeder Gruppe wurden n=4 Tiere untersucht. Die Daten sind als Mittelwert ± SEM gezeigt. Die Signifikanz wurde mittels 2-seitigem ANOVA und Tukey post-hoc Analyse bestimmt. * P<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001, **** p<0.001

Im Restimulations-Versuch konnte gezeigt werden, dass 2D2-T-Zellen aus OSE, Smad7^{CD2}-OSE und Smad7^{CD4-/-}-OSE bis zu einer Verdünnung von 1:8 nur wenig proliferierten, wenn sie zusammen mit intestinalen dendritischen Zellen kultiviert

wurden (MW \pm SEM; OSE; 1:2-Verdünnung; 1.8 \pm 0.1, 1:4-Verdünnung, 3.6 \pm 0.3; 1:8, 5.9 \pm 1.0 - Smad7^{CD2}-OSE; 1:2, 2.1 \pm 0.32; 1:4, 5.1 \pm 0.1; 1:8, 6.4 \pm 1.1 - Smad7^{CD4^{-/-}}-OSE; 1:2, 0.6 \pm 0.34; 1:4, 1.8 \pm 0.3; 1:8, 2.4 \pm 0.3). Ab einer Verdünnung von 1:16 konnte eine sukzessiv gesteigerte Proliferation der Smad7^{CD2}-T-Zellen (1:16, 14.9 \pm 1.2 p=0,0423; 1:32, 22.7 \pm 1.3 p=0,022; 1:64, 27.5 \pm 0.5 p=0,016) gezeigt werden. Die Befunde waren gegenüber der weiterhin geringen Proliferation von OSE (1:16, 6.8 \pm 1.4; 1:32, 7.5 \pm 0.8; 1:64, 13.9 \pm 1.9) und Smad^{CD4^{-/-}}-OSE-T-Zellen (1:16, 3.7 \pm 0.3; 1:32, 4.1 \pm 0.3; 1:64, 5.2 \pm 1) signifikant (Abb. 12A).

Im Vergleich dazu zeigten die Analysen für 2D2-Zellen derselben Genotypen mit intestinalen regulatorischen T-Zellen, dass eine gesteigerte Smad7-Expression in Smad^{CD2}-OSE T-Zellen zu einer geminderten Empfänglichkeit für Treg-abhängige Suppressionsmechanismen führt (Abb. 12B). Bereits bei einer Verdünnung von 1:4 zeigen T-Zellen aus Smad^{CD2}-OSE-Tieren eine signifikant erhöhte Proliferation (1:2, 15.8 \pm 1.5; 1:4, 47.4 \pm 1.4) gegenüber OSE- (1:2, 4.6 \pm 0.6, p<0,0001; 1:4, 11 \pm 0.6, p<0,0001) und Smad^{CD4^{-/-}}-OSE-T-Zellen (1:2, 2.1 \pm 0.8, p<0,0001; 1:4, 4.6 \pm 0.6, p<0,0001). Ab einem Verhältnis von 1:8 war die Proliferation der Smad^{CD2}-OSE-T-Zellen vergleichbar mit der nicht supprimierten Kontrolle (1:8, 49.7 \pm 0.6; 1:16, 50.6 \pm 0.3; 1:32, 53.2 \pm 0.7; 1:64, 55.8 \pm 1.5 vs. Kontrolle, 59.5 \pm 3) (Abb. 12B). 2D2-T-Zellen aus OSE-Tieren zeigten ab einem Verhältnis von 1:8 einen sukzessiven Anstieg bis hin zu Proliferation der Kontrolle (1:8, 24.5 \pm 0.6; 1:8, 38.2 \pm 0.6; 1:16, 44.7 \pm 0.7; 1:64, 45.1 \pm 0.8 vs. Kontrolle, 55.5 \pm 1.3). Dagegen zeigte sich bei Smad^{CD4^{-/-}}-T-Zellen bis zu einer Verdünnung von 1:16 (1:2, 2.1 \pm 0.5; 1:4, 4.6 \pm 0.7; 1:8, 5.4 \pm 0.8; 1:16, 9.6 \pm 0.7) nur eine geringe Proliferation, sodass eine gesteigerte Inaktivität der T-Zellen oder die gesteigerte Sensibilität gegenüber Suppressionsmechanismen angenommen werden kann (Abb. 12B). Aus dem Intestinum isolierte dendritische Zellen waren hinsichtlich der Suppression autoreaktiver T-Zellen um ein Vielfaches potenter als regulatorische T-Zellen. Gleichzeitig ist die Expression von Smad7 in T-Zellen ausschlaggebend für die Sensitivität gegenüber Suppressionsmechanismen.

Da die *in vitro*-Bedingungen nicht die Komplexität des intestinalen Milieus abbilden können, wurde die Proliferation der CD4⁺ T-Zellen analog zur *in vitro*-Bedingungen im Darm überprüft. Hierzu wurden erkrankte OSE-Mäuse mit Bromodesoxyuridin (BrdU) an Tag 79 24 h vor Terminierung des Versuchs injiziert. Ähnlich wie in den

Zellkultur-Experimenten konnte dokumentiert werden, dass die Proliferation von CD4⁺ T-Zellen im Darm gesteigert war, wenn Smad7 in diesen Zellen überexprimiert ist. OSE (53.4±3.9) und Smad7^{CD2}-OSE-Tiere (61.4±2.4) zeigten eine erhöhte Proliferation in der Lamina propria (Abb. 13). In Smad7^{CD4}^{-/-}-OSE-Tieren (17.3±3.7; p=0.0018) hingegen konnte eine deutliche geminderte Proliferation festgestellt werden (Abb. 13).

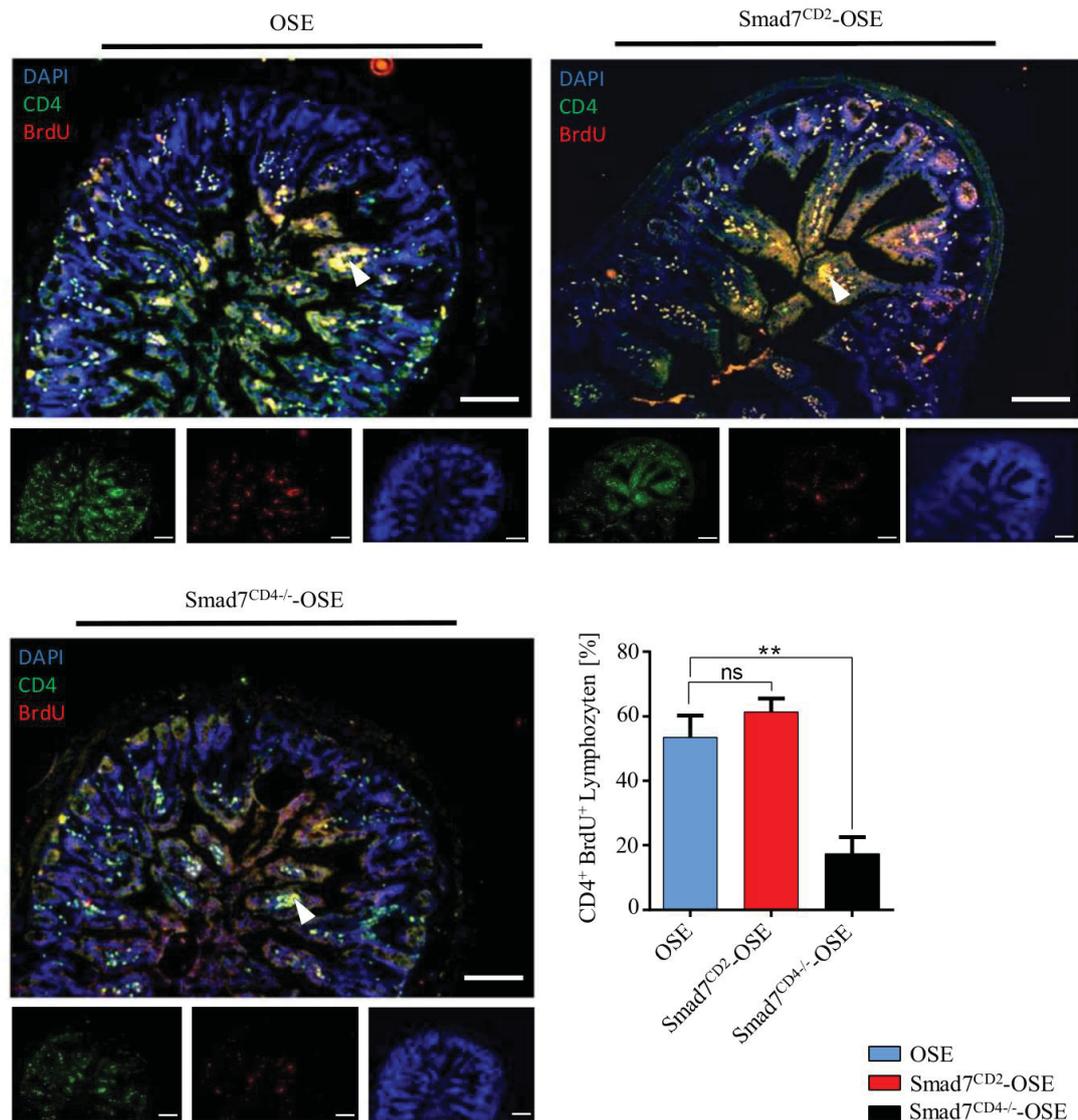


Abbildung 13: Proliferationsanalyse von T-Zellen in der Lamina propria *in vivo*. Es wurden OSE (blau), Smad7^{CD2}-OSE (rot) oder Smad7^{CD4}^{-/-}-OSE-Mäuse (schwarz) über 80 Tage klinisch untersucht. An Tag 79 wurde den Tieren BrdU i.p. injiziert, um proliferierende Zellen darzustellen. An Tag 80 wurden histologische Färbungen für CD4⁺ BrdU⁺ und DAPI⁺ Zellen im Darm durchgeführt (Messbalken = 250 µm; Pfeil zeigt exemplarisch proliferierende T-Zellen). In jeder Gruppe wurden n=10 Tiere untersucht. Die Signifikanz wurde mittels 2-seitigem ANOVA und Tukey post-hoc Analyse bestimmt. ** p<0.01.

Eine weitere wichtige Unterkategorisierung von CD4⁺T-Zellen, ist die Unterscheidung in Effektor-Gedächtnis-Zellen (*engl.*: effector memory T cells; T_{EM}) und Zentrale-Gedächtnis-Zellen (*engl.* central memory T cells; T_{CM}). Effektor-Gedächtnis-Zellen sind bereits voraktiviert und können durch Antigenkontakt expandieren und neue funktionsfähige Effektor-Zellen bilden (Sallusto et al., 2004). Die zentralen Gedächtnis-T-Zellen kommen dagegen besonders in sekundär lymphatischen Organen vor und besitzen im Vergleich zu Effektor-Gedächtnis-Zellen vorher keine Effektor-Funktion (Sallusto et al., 2004). Solche Zellen können sich jedoch bei Antigenkontakt zu Effektor T-Zellen entwickeln (Sallusto et al., 2004). Im weiteren Verlauf sollte die Entwicklung solcher Gedächtnis-Zellen unter dem Aspekt der Smad7-Expression im Model der OSE untersucht werden.

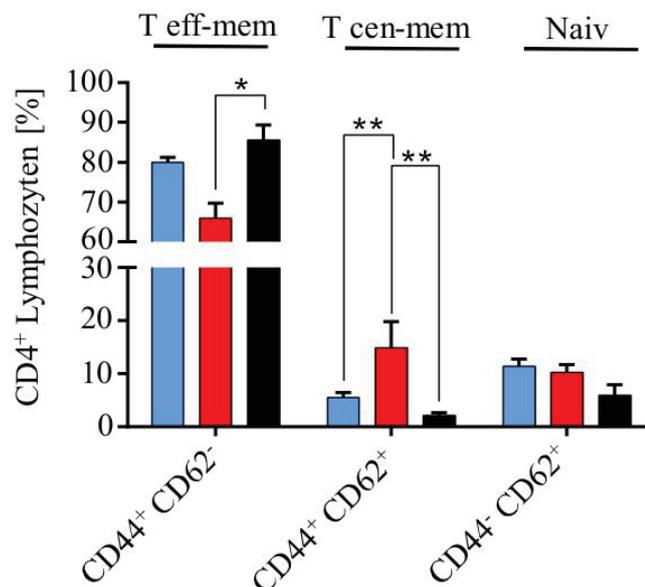


Abbildung 14: Frequenz der Gedächtnis-T-Zellen unter Smad7-Expression. Es wurden OSE (blau), Smad7^{CD2}-OSE (rot) oder Smad7^{CD4/-}-OSE-Mäusen (schwarz) über 80 Tage klinisch untersucht. CD4⁺T-Zellen wurden anschließend über magnetische Separation aus der Lamina propria gewonnen und mittels Durchflusszytometrie auf T-Effektor-Gedächtnis- (CD4⁺CD44⁺CD62⁻;T_{EM}), T-Zentrale-Gedächtnis- (CD4⁺CD44⁺CD62⁺;T_{CM}) und naive T-Zellen (CD4⁺CD44⁻CD62⁺) hin untersucht. In jeder Gruppe wurden n=4 Tiere untersucht. Die Signifikanz wurde mittels 2-seitigem ANOVA und Tukey post-hoc Analyse bestimmt. * P<0.05, ** p<0.01.

In der Lamina propria des Darms konnte 80 Tage nach Geburt in erkrankten OSE-Mäusen eine Smad7-abhängige Veränderung der CD4⁺CD44⁺CD62⁻ T-Gedächtniszellen festgestellt werden (Abb. 14). In der Lamina propria von Smad7^{CD2}-OSE-Tieren (MW±SEM; 65.9±1.5) konnten reduzierte Frequenzen (p=0,043) und in

Smad7^{CD4^{-/-}}-OSE-Tieren (85.6±1.2) erhöhte Frequenzen der T-Effektor-Gedächtniszellen für T-Effektor-Gedächtniszellen im Vergleich zu OSE-Tieren gemessen werden (79.9±0.4) (p=0,043) (Abb.14).

Die Ergebnisse für die CD4⁺CD44⁺CD62⁺ T-Zentrale-Gedächtniszellen verhielten sich hingegen umgekehrt reziprok zwischen den Gruppen. So wurden in Smad7^{CD2}-OSE-Tieren (5.5±0.2) signifikant erhöhte Zahlen von T-Zentral-Gedächtniszellen (p=0,033) im Vergleich zu OSE-Tieren (14.9±1.4) und Smad7^{CD4^{-/-}}-OSE-Tieren (2.1±0.2) (p=0,029) gefunden. Naive CD4⁺CD44⁻CD62⁺ T-Zellen waren unverändert zwischen den Gruppen (OSE, 11.4±0.7, Smad7^{CD2}, 10.2±0.6; Smad7^{CD4^{-/-}}, 5.9±0.5) (Abb. 14).

Um nun herauszufinden, welche zellulären T-Zell-Stadien zu einer Protektion neben der Apoptose gegenüber einer demyelinisierenden Erkrankung führen, wurden Anergie und T-Zellen mit regulatorischen Eigenschaften untersucht (z. B. Treg- oder FoxP3⁻Tr1-Zellen). Anergie beschreibt den Status einer inkompletten Aktivierung von T-Zellen nach Erkennung eines TCR-spezifischen Antigens (Fathman and Lineberry, 2007). Dieser Mechanismus sorgt u.a. für die Toleranzinduktion gegenüber Selbst-Antigenen und kann so Autoimmunität verhindern. Gleichzeitig ist jedoch auch die kompetitive Bindung des zu tolerierenden Antigens ein weiterer permanent induzierter Schutzmechanismus (Lechler et al., 2001). Als regulatorische Variante untersuchter Zellen sind hier u.a. T regulatorische 1 (Tr1)-Zellen von Bedeutung, da diese sowohl pro- als auch FoxP3-exprimierende anti-inflammatorische Phänotypen annehmen können (Yu et al., 2017).

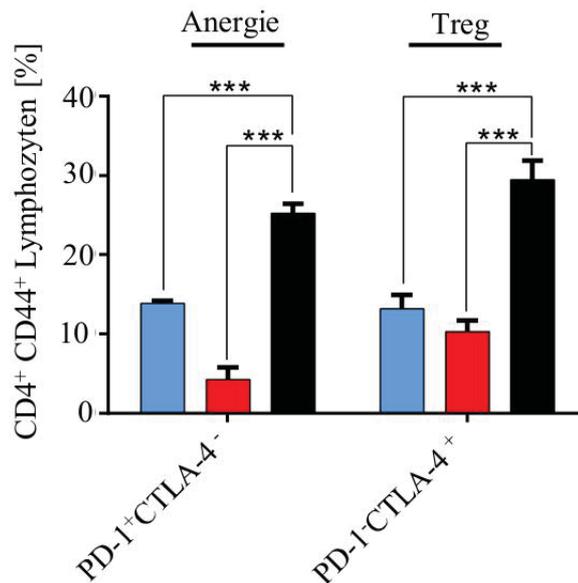


Abbildung 15: Frequenz der anergischen und regulatorischen T-Zellen unter Smad7-Expression. Es wurden OSE (blau), Smad7^{CD2}-OSE (rot) oder Smad7^{CD4}-/- OSE-Mäusen (schwarz) über 80 Tage klinisch untersucht. CD4⁺ T-Zellen wurden anschließend über magnetische Separation aus der Lamina propria gewonnen und mittels Durchflusszytometrie auf Anergie (CD4⁺CD44⁺PD-1⁺CTLA-4⁻) und regulatorische T-Zellen (CD4⁺CD44⁺PD-1⁻CTLA-4⁺) hin untersucht. In jeder Gruppe wurden n=6 Tiere untersucht. Die Signifikanz wurde mittels 2-seitigem ANOVA und Tukey post-hoc Analyse bestimmt. *** p<0.001

In der Lamina propria führte die Überexpression von Smad7 in T-Zellen zu einer geminderten Anzahl CD4⁺CD44⁺PD-1⁺CTLA-4⁻ anergischer T-Zellen (MW±SEM; 4.2±0.6) im Vergleich zu nicht manipulierten T-Zellen (MW±SEM; 13.9±0.1) (p<0,001). Die Deletion von Smad7 in T-Zellen führte zu einer signifikanten Steigerung (MW±SEM; 25.2±0.5) anergischer T-Zellen gegenüber der OSE- und Smad7^{CD2}-OSE-Gruppe (p<0,001) (Abb. 15).

Die Smad7-Deletion in T-Zellen führt zu einer Verdopplung anergischer T-Zellen. Dies spricht insgesamt für eine gesteigerte Toleranzentwicklung zusammen mit einer gemindertem Aktivierungsvermögen MOG₃₅₋₅₅ spezifischer T-Zellen in der Lamina propria. Ebenso zeigte sich ein signifikanter Anstieg in der Frequenz von CD4⁺CD44⁺PD-1⁻CTLA-4⁺ regulatorischen T-Zellen in Smad7 deletierten OSE-Tieren (MW±SEM; 29.5±1) (p<0,0001). In OSE- (MW±SEM; 13.2±1.9) und Smad7^{CD2}-OSE-Tieren (MW±SEM; 10.3±0.5) (p<0,001) zeigten sich vergleichbare Werte (Abb. 15). Ein bedeutender protektiver Faktor bezüglich des Verlaufs der OSE scheint demnach die Frequenz anergischer T-Zellen und FoxP3⁻ regulatorischer T-Zellen zu sein.

4.5 Autoreaktive intestinale T-Zellen induzieren ZNS-Autoimmunität

Zur Analyse der Gewebe-spezifischen Funktion im Kontext der Darm/Mikrobiom-gestützten Induktion wurde das Modell des adoptiven Transfers (AT) verwendet (Miller and Karpus, 2007). Dazu wurden im AT-Modell mehrere Untersuchungen zum Migrationsverhalten von isolierten CD4⁺ T-Zellen vorgenommen. In einem ersten Versuch wurden explantierte CD4⁺ T-Zellen mit dem Farbstoff Carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE) gefärbt und in Rezipiententiere injiziert. Anschließend wurde überprüft, ob die markierten CD4⁺ T-Zellen im Darm des Rezipienten wiedergefunden werden konnten. Nach 10 Tagen konnten die markierten CD4⁺T-Zellen nur in den Rezipienten (R)-Organen des jeweiligen Donor (D)-Entnahmeorgans gefunden werden, d.h. aus dem Lymphknoten-stammende T-Zellen des Donors, sind in dasselbe Organ des Rezipienten eingewandert. Ebenso konnten Darm-ständige CD4⁺ T-Zellen (D) in den Darm (R) migrieren, wenn sie aus dem Darm isoliert wurden. Dieser Befund wies auf die Expression Gewebe-spezifischer Rezeptoren hin (Brinkman et al., 2013). Ein Beispiel ist Retinsäure, ein Vorläufer-Molekül von Vitamin A, welches im Kontext des Darm-Immunsystems auf der Oberfläche von Dendritischen Zellen exprimiert wird (Bakdash et al., 2015). CD4⁺ T-Zellen exprimieren nach dem Kontakt mit Retinsäure Darm-spezifische Oberflächenrezeptoren wie CCR (*engl.*, chemokine receptor type) 9 und das Integrin $\alpha 4\beta 7$ (*engl.* alpha 4 beta 7 integrin) (Cassani et al., 2011) und werden so permanent im betreffenden Gewebe gehalten (Kim et al., 2015b). So sorgen dendritische Zellen beispielsweise dafür, dass sich die stetige Immunzell-Fluktuation des Darms speziell auf die sich ändernden tolerogenen Ansprüche der Umwelt anpassen kann (Kim et al., 2015b).

Um zu prüfen ob die Aufregulation der Gewebe-spezifischen Homing-Rezeptoren CCR9 und $\alpha 4\beta 7$ durch Retinsäure *ex vivo* induziert werden kann, wurden CD4⁺ T-Zellen aus axillären Lymphknoten entnommen, mit MOG₃₅₋₅₅ restimuliert und mit Retinsäure behandelt (Abb.16A). Es konnte gezeigt werden, dass CCR9 und $\alpha 4\beta 7$ unter Retinsäure-Behandlung auf CD4⁺ T-Zellen exprimiert und aufreguliert wird (MW \pm SEM; Kontrolle; $\alpha 4\beta 7^+$, 1.8 \pm 0.5; CCR9⁺, 1.7 \pm 0.3; $\alpha 4\beta 7^+$ CCR9⁺, 1.9 \pm 0.4) (p<0,001), (MW \pm SEM; Retinsäure; $\alpha 4\beta 7^+$, 72.8 \pm 6.7; CCR9⁺, 69.1 \pm 2.8; $\alpha 4\beta 7^+$ CCR9⁺, 57.5 \pm 4.9), (p<0,001) (Abb. 16). Th1-Zellen sind gegenüber der Behandlung mit Retinsäure wenig responsiv (Abb. 16B). Hingegen zeigen Th17 und Tregs eine erhöhte

Sensibilität durch die Aufregulation von $\alpha 4\beta 7$ und CCR9 (Abb. 16C+D). Tregs regulieren dabei v.a. $\alpha 4\beta 7$ und weniger CCR9 auf.

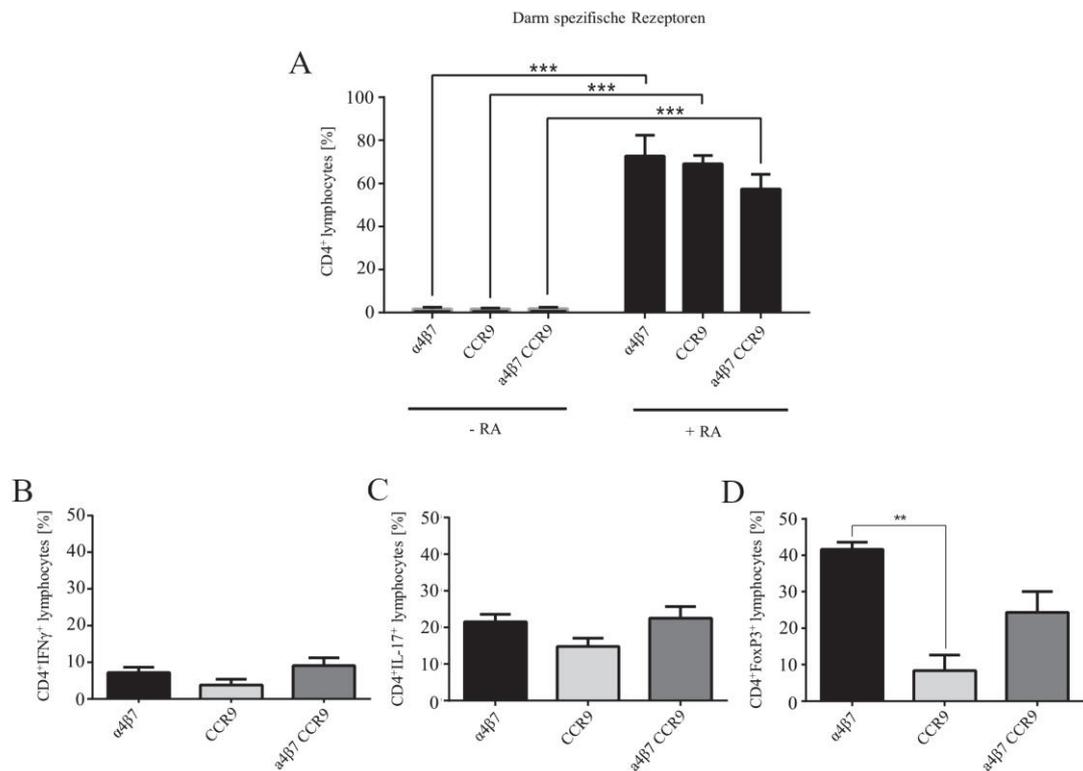


Abbildung 16: Retinsäure abhängige Expression von intestinalen Homing Rezeptoren. CD4⁺T-Zellen wurden aus der Milz oder den axillären Lymphozyten von 2D2, 2D2xSmad7^{CD2} oder 2D2xSmad7^{CD4-/-} isoliert. Diese Zellen wurden in der Zellkultur mit MOG₃₅₋₅₅ in Anwesenheit von Retinsäure kultiviert um die intestinalen Homing-Rezeptoren CCR9 und $\alpha 4\beta 7$ aufzuregulieren (A). Anschließend wurden die Expression besagter Rezeptoren mittels Durchflusszytometrie untersucht und zusätzlich eine Analyse der Th1 (B), Th17 (C) und Tregs (D) durchgeführt. Die Gruppengröße war n=6 Tiere. Die Signifikanz wurde mittels 2-seitigem ANOVA und Tukey post-hoc Analyse bestimmt. *** p<0.001.

Die Induktion der ZNS-Entzündung im OSE-Modell, wird durch die Besiedelung des Darms spontan induziert. Das OSE-Modell setzt sich dabei aus der Kreuzung von 2D2 (MOG₃₅₋₅₅ spezifische T-Zellen) und TH-Tieren (MOG₃₅₋₅₅ spezifische B-Zellen) zusammen (Krishnamoorthy et al., 2006). Um nun zu identifizieren welche Rolle die T-Zellen des Darms bei der Induktion der Erkrankung in OSE-Tieren spielen, wurde versucht das OSE-Modell in einem AT-EAE-Modell zu imitieren um dabei gezielt Einzelkomponenten des Modells auf ihre Partizipation zu untersuchen. Mikrobiom-

freie Tiere erkranken nicht, wodurch eine obligate Beteiligung des Darms angenommen werden kann (Krishnamoorthy et al., 2006). Für die Induktion der spontanen AT-EAE wurde die zu applizierende Zellzahl zuvor in einem Vorversuch mit 1×10^7 , 1×10^6 , 1×10^5 und 1×10^4 Zellen bestimmt (Anhang 1) (McCarthy et al., 2012). Die applizierte Zellzahl auf 1×10^6 Zellen festgelegt und damit das Minimum autoreaktiver T-Zellen für PTX gestützte AT-EAE-Versuche festgestellt. In einem Pilot-Versuch sollte deshalb geklärt werden, ob das OSE-Modell durch den Transfer von autoreaktiven 2D2-T-Zellen aus Lymphknoten und Milz in TH-Rezipienten zu einer spontanen EAE, wie im OSE-Modell, führt (Anhang 2). Die Experimente ergaben, dass der Transfer von T-Zellen aus erkrankten Wildtyp-EAE-Tieren mit Hilfe von PTX sowohl in TH-Tieren als auch in Wildtypen eine AT-EAE auslösten (Anhang 2, Zeile 1 + 2). Für 2D2-T-Zellen erkrankter EAE-Tiere konnten vergleichbare Ergebnisse gezeigt werden (Anhang 2, Zeile 3 + 4). Wurde während des Transfers kein PTX verabreicht, konnte keine AT-EAE ausgelöst werden. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass eine geringe Zahl autoreaktiver T-Zellen bei intakter Blut-Hirn-Schranke keine AT-EAE auslösen kann (Anhang 2, Zeile 1 - 4). Auch der Rezipient (TH oder WT) scheint für die Induktion der AT-EAE keine Rolle zu spielen.

Da die Induktion der OSE durch die Besiedelung des Darms entsteht, wurde eine obligate Aktivierung autoreaktiver T-Zellen an der Darm-Mukosa postuliert. Um dies zu testen, wurden 2D2-T-Zellen aus EAE-Tieren entnommen und während der MOG₃₅₋₅₅-Restimulation zusätzlich mit Retinsäure behandelt. Hierdurch sollte die Migration applizierter T-Zellen in den Darm gefördert werden, wo sie dann spezifisch aktiviert werden. Um die Vergleichbarkeit zum OSE-Modell zu erhalten, wurde auf die Gabe von PTX während des Transfers verzichtet. Die Applikation von 2D2-T-Zellen in wildtypische Rezipienten induzierte keine AT-EAE (Anhang 2, Zeile 1 - 4). Fand die Applikation in TH-Tiere statt, konnte klinische Symptome induziert werden (Anhang 2, Zeile 1 - 4). Zusammenfassend kann das Modell der OSE durch den Transfer von Retinsäure behandelten 2D2-T-Zellen in TH-Tiere abgebildet werden (Anhang 2, Zeile 1 - 6).

Als Kontrolle sollte geklärt werden, ob Darm-ständige autoreaktive CD4⁺ T-Zellen aus erkrankten OSE-Tieren ebenfalls eine Inflammation des ZNS induzieren können und welchen Einfluss Retinsäure in diesem Kontext hat. Dazu wurden CD4⁺ T-Zellen aus der Lamina propria (LP) von 80 Tagen alten, erkrankten OSE-Tieren isoliert und in

nicht erkrankte OSE-Rezipienten gegeben (Abb.17, Anhang 2). In einem weiterführenden Experiment wurde zusätzlich die Bedeutung von Smad7^{CD2} und Smad7^{CD4-/-} T-Zellen für die Auswanderung aus dem Darm untersucht (Abb.17, Anhang 2).

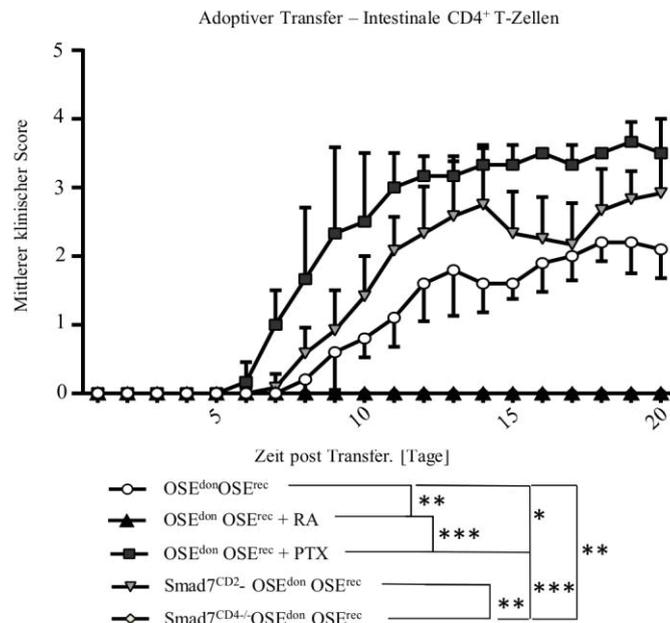


Abbildung 17: Induktion klinischer Symptome durch darmständige CD4⁺ T-Zellen nach adoptivem Transfer. MOG₃₅₋₅₅ erkennende CD4⁺ T-Zellen wurden aus dem Darm von erkrankten OSE, Smad7^{CD2}-OSE oder Smad7^{CD4-/-}-Mäusen an Tag 80 isoliert. Die isolierten T-Zellen wurden für 24 Std mit MOG₃₅₋₅₅ und für die Aufregulation der Darm-Rezeptoren unter verschiedenen Konditionen mit Retinsäure behandelt. 1x10⁶ CD4⁺T-Zellen der angegebenen Genotypen wurden i.p. in gesunde OSE-Mäuse (Rezipienten) injiziert um eine AT-EAE zu induzieren (Anhang 2, Zeilen 3-7; OSE^{don}OSE^{rec}, n=5; OSE^{don} OSE^{rec} + RA, n=3; OSE^{don} OSE^{rec} + PTX, n=3; Smad7^{CD2}- OSE^{don} OSE^{rec}, n=6; Smad7^{CD4-/-}OSE^{don} OSE^{rec}, n=3). OSE^{don} und/oder OSE^{rec} -Tiere wurden unter bestimmten Konditionen zusätzlich mit Pertussis Toxin (PTX) behandelt, um die Blut-Hin-Schranke zu permeabilisieren. Die Daten sind als Mittelwert ± SEM angegeben. Die Signifikanz wurde mittels 2-seitigem ANOVA und Tukey post-hoc Analyse bestimmt. * P<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001

Als Kontrolle wurden zuerst CD4⁺ T-Zellen der axillären Lymphnoten und der Milz aus erkrankten OSE-Tieren entnommen und in gesunde OSE-Tiere appliziert. Diese Tiere entwickelten keine AT-EAE (Anhang 3, Zeile 1). Hingegen war die Induktion klinischer Symptome durch die zusätzliche Gabe von PTX möglich (Anhang 3, Zeile 2). Um anschließend den Darm als Auslöser von ZNS-Inflammation zu identifizieren, wurden CD4⁺ T-Zellen aus dem Darm erkrankter OSE-Tiere entnommen und in

gesunde OSE-Tiere transferiert. Zur Kontrolle wurde dieser Versuch zuerst mit PTX durchgeführt und zeigte eine Induktion klinischer Symptome (Anhang 3, Zeile 3). Ein Transfer der LP-T-Zellen erkrankter OSE-Donor-Tiere in gesunde OSE-Tiere, führte nach 7 Tagen zu einer Induktion der AT-EAE mit moderaten klinischen Zeichen (MW \pm SEM; Mittlerer klinischer Score; 2.1 \pm 0,4, Anhang 3, Zeile 4). Wurden die isolierten LP-T-Zellen *in vitro* neben MOG₃₅₋₅₅-Restimulation auch mit Retinsäure behandelt konnte keine EAE induziert werden (Abb. 17, Anhang 3, Zeile 5). Diese Befunde weisen darauf hin, dass die Expression von CCR9 und α 4 β 7 zu einem verstärkten Homing-Verhalten der isolierten CD4⁺ T-Zellen in den Darm führt, wodurch vermutlich eine Migration in die Peripherie verhindert wird (genannt engl. *capturing*).

Um die Integrität der Blut-Hirn Schranke im Kontext der Darm-ständigen CD4⁺ T-Zellen (LP-T-Zellen) zu untersuchen, wurde PTX in Rezipienten-Tiere während des Transfers injiziert. Daraus resultierte ein rund zwei Tage früherer Beginn erster klinischer Zeichen und eine signifikante Verstärkung der Krankheitssymptome (MW \pm SEM; Mittlerer klinischer Score; 3.2 \pm 0.3). Dieser Befund weist darauf hin, dass mit der Permeabilisierung der Blut-Hirn-Schranke auch die Invasion von in die Peripherie gelangten autoreaktiven LP-T-Zellen ins ZNS erleichtert wird (Abb.17, Anhang 3).

Smad7 reguliert die TGF- β -Signaltransduktion innerhalb der Zelle und reguliert die Differenzierung und Effektor-Funktionen von T-Zellen (Kleiter et al., 2007). Um weiter zu überprüfen, ob durch Smad7 in T-Zellen die Suszeptibilität einerseits gegenüber des *Capturing*-Mechanismus des Darms eingeschränkt wird und andererseits dies auf die Entstehung einer AT-EAE einen Einfluss hat, wurden LP-T-Zellen aus Smad7^{CD2}-OSE und Smad7^{CD4/-}-OSE-Tieren als Donoren verwendet (Abb.17, Anhang 2).

LP-T-Zellen aus Smad7^{CD4/-}-OSE-Tieren konnten keine AT-EAE induzieren, wohingegen LP-T-Zellen aus Smad7^{CD2}-OSE-Tieren eine EAE induzierten (Anhang 2, Zeile 6 – 7, MW \pm SEM; mittlerer klinischer Score; 2.6 \pm 0.2). Die Überexpression von Smad7 in T-Zellen führt demnach zu einem schwereren Krankheitsverlauf im Vergleich zu wildtypischen T-Zellen (OSE). Eine Smad7-Deletion in T-Zellen führt zu einer Protektion gegenüber der AT-EAE (Abb.17, Anhang 2).

Da intestinale LP-T-Zellen aus Smad7^{CD2}-OSE-Tieren effektiv in der Induktion einer AT-EAE waren, wurde überprüft, ob autoreaktive T-Zellen aus axillären Lymphknoten und der Milz ebenfalls zu einer Induktion der AT-EAE führen können, ohne dass PTX verabreicht wurde oder eine Migration in den Darm verursacht worden war. Diese Tiere zeigten keinerlei klinische Symptome (Anhang 2, Zeile 8). Wurden die T-Zellen jedoch zuvor mit Retinsäure behandelt, um in den Darm zu migrieren, entwickelten Rezipienten eine AT-EAE (Anhang 2, Zeile 9). Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass die Migration isolierter T-Zellen in den Darm, unabhängig von deren Ursprungsorgan, von Bedeutung für die Induktion von ZNS-Autoimmunität ist.

Um die Verbindung zwischen Darm-ständigen autoreaktiven CD4⁺ T-Zellen genauer zu untersuchen, wurden isolierte T-Zellen nach der Restimulation mit MOG₃₅₋₅₅ mit CFSE gefärbt. Die applizierten T-Zellen waren hierdurch im Rezipienten verfolgbar. Da die Halbwertszeit von CFSE jedoch begrenzt ist und sich die Fluoreszenz mit jeder Zellteilung halbiert, wurde zusätzlich ein das grün-fluoreszierende Protein (GFP)-exprimierende Reporter-Modell (Nur77^{GFP}) verwendet. Nur77^{GFP}-Tiere exprimieren in CD4⁺ T-Zellen unter der Aktivierung von CD69 das Fluoreszenzprotein GFP. Es wurden 2D2-, 2D2-Smad7^{CD2} und 2D2-Smad7^{CD4-/-} mit Nur77^{GFP}-Tieren gekreuzt. Anschließend wurde erneut AT-EAE-Versuche durchgeführt (Abb. 18, Anhang 3).

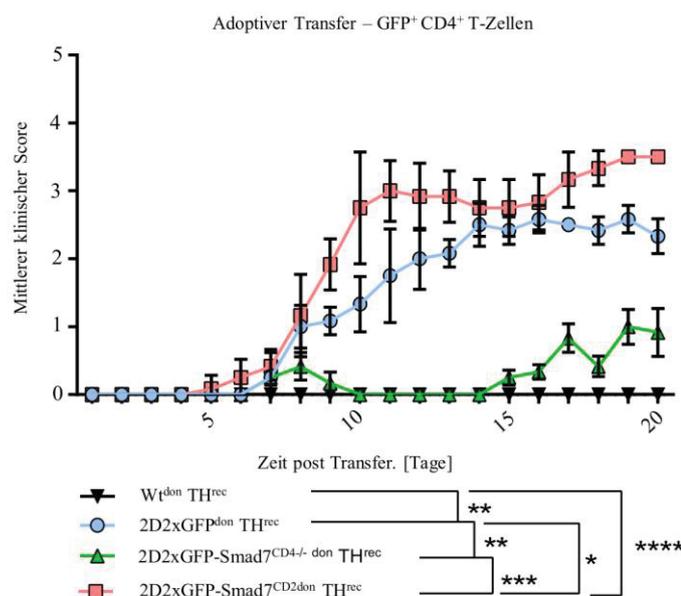


Abbildung 18: GFP-gestützte Nachverfolgung der Migration von T-Zellen nach adoptivem Transfer. 2D2 CD4⁺ T-Zellen wurden aus den Lymphknoten 28 Tage nach der Induktion der EAE aus Donor-Wildtypen (Kontrolle), 2D2xGFP-, 2D2xGFP-

Smad7^{CD2-}- oder 2D2xGFP-Smad7^{CD4-/-}-Mäusen isoliert. CD4⁺ T-Zellen wurden *in vitro* MOG₃₅₋₅₅-restimuliert und mit Retinsäure behandelt. 1x10⁶ restimulierte CD4⁺ T-Zellen des angegebenen Donor-Genotyps wurden adaptiv in TH-Mäuse (Rezipient) transferiert, um eine AT-EAE zu induzieren (Details siehe Anhang 3; WT^{don} in TH^{rec}, n=6; 2D2xNur77^{don} in TH^{rec}, n=12; 2D2xNur77- Smad7^{CD4-/-don} in TH^{rec}, n=12; 2D2xNur77-Smad7^{CD2don} in TH^{rec}, n=12). Die Daten sind als Mittelwert±SEM dargestellt. Statistische Analysen wurden durch eine AUC-Analyse durchgeführt. * P <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001, **** p <0.0001.

Als Kontrolle wurden wildtypische EAE-CD4⁺ T-Zellen aus Lymphknoten und Milz in TH-Rezipienten appliziert und dabei auf die Gabe von PTX und Retinsäure verzichtet. Es konnte keine AT-EAE induziert werden (Abb. 18, Linie 10). Die Applikation von Retinsäure-behandelten 2D2-CD4⁺ T-Zellen in TH-Mäuse führte zu klinischen Symptomen (MW±SEM; mittlerer klinischer Score; 2.4±0.3, Abb. 18, Anhang 4, Linie 11). Das Experiment wurde vergleichend mit 2D2-GFP⁺CD4⁺ T-Zellen durchgeführt und konnte ebenfalls eine AT-EAE mit ähnlichem Verlauf induzieren (MW±SEM; mittlerer klinischer Score; 2.3±0.5 (blau), Abb. 18, Anhang 4, Linie 12). Die Applikation von Smad7^{CD2}GFP⁺CD4⁺ T-Zellen (MW±SEM; mittlerer klinischer Score; 3.2±0.1 (rot), Abb. 18, Anhang 4, Linie 13) in TH-Tiere führte zu einem initial schwereren klinischen Verlauf gegenüber dem Transfer von 2D2xGFP⁺CD4⁺ T-Zellen. Der Transfer von Smad7^{CD4-/-}GFP⁺CD4⁺ T-Zellen (MW±SEM; mittlerer klinischer Score; 0.8±0.5 (grün), Abb. 18, Anhang 4, Linie 14) führte nur zu milden klinischen Zeichen.

4.6 Migration von Darm-ständigen T-Zellen in das ZNS

Um die Beteiligung transferierter 2D2xGFP⁺CD4⁺ T-Zellen aus dem Darm an ZNS-Inflammation zu beweisen, wurden an Tag 5 und Tag 10 nach dem adoptiven Transfer histologische und durchflusszytometrische Untersuchungen der Lamina propria durchgeführt (Abb. 19).

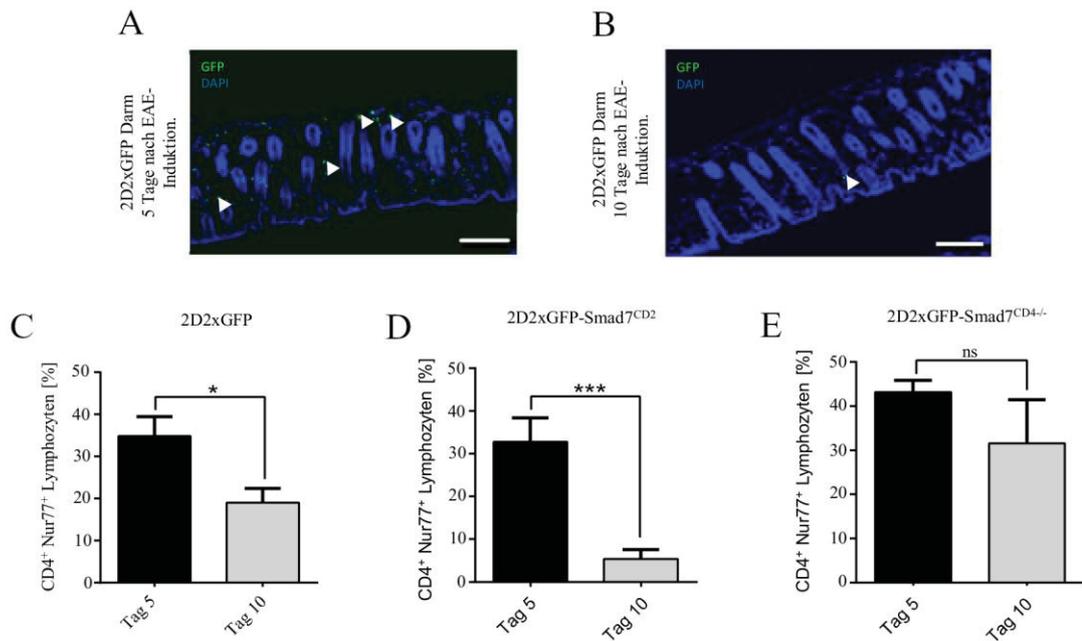


Abbildung 19: Histologische Analyse der Lamina propria zur Darstellung GFP-markierter T-Zellen nach adoptivem Transfer. GFP⁺CD4⁺ T-Zellen wurden nach dem adoptiven Transfer an Tag 5 in der Lamina propria gefunden (A, repräsentatives Bild aus 2D2xGFP-Ileum). GFP⁺CD4⁺ T-Zellen waren an Tag 10 fast vollständig verschwunden (B). Statistische Analyse der GFP⁺CD4⁺ T-Zellen, die aus dem LP 5 und 10 Tage nach der Übertragung isoliert wurden (C-E). Die Daten sind als Mittelwert ± SD dargestellt. Die Signifikanz wurde mittels 2-seitigem ANOVA und Tukey post-hoc Analyse bestimmt. * P < 0,05, *** p < 0,001

An Tag 5 waren vergleichbare Zellzahlen von transferierten 2D2xGFP (MW±SEM; 34.8±2.6), 2D2xGFP-Smad7^{CD2} (MW±SEM; 32.4±3.2) und 2D2xGFP-Smad7^{CD4-/-} T-Zellen (MW±SEM; 43.2±1.6) in der Lamina propria von Rezeptieren zu finden. An Tag 10 zeigten sich für 2D2xGFP (MW±SEM; 19.2.±1.9, p=0,018) und 2D2xGFP-Smad7^{CD2} T-Zellen (MW±SEM; 5,3±1., p=0,00013) eine signifikant reduzierte GFP-Zellzahl in der Lamina propria von Rezeptieren. Für 2D2xGFP-Smad7^{CD4-/-} T-Zellen konnte hingegen keine Veränderung der GFP-Zellzahl festgestellt werden (MW±SEM; 31.5.±5.7, Abb.19).

Um herauszufinden, warum 2D2xGFP-Smad7^{CD4-/-} T-Zellen einen toleranten Phänotyp zeigen und eine Protektion gegenüber klinischen Symptomen bewirken, wurden 2D2xGFP⁺CD4⁺ T-Zellen auf Apoptose, Anergie oder einen T-Zell-Typ mit regulatorischen Eigenschaften hin untersucht (Abb. 20).

Für die Untersuchung der Apoptose wurden Lamina propria-ständige 2D2xGFP⁺CD4⁺ T-Zellen aus dem Darm isoliert und mittels Propidiumiodid (PI) angefärbt. Es konnte gezeigt werden, dass das Ausmaß an Apoptose von isolierten T-Lymphozyten zwischen 2D2xGFP⁺- (MW±SEM; 7.7±0.4), 2D2xGFP-Smad7^{CD2}- (MW±SEM; 8.5±0.2) und 2D2xGFP-Smad7^{CD4^{-/-}} T-Zellen (MW±SEM; 8.2±0.4) nicht unterschiedlich war.

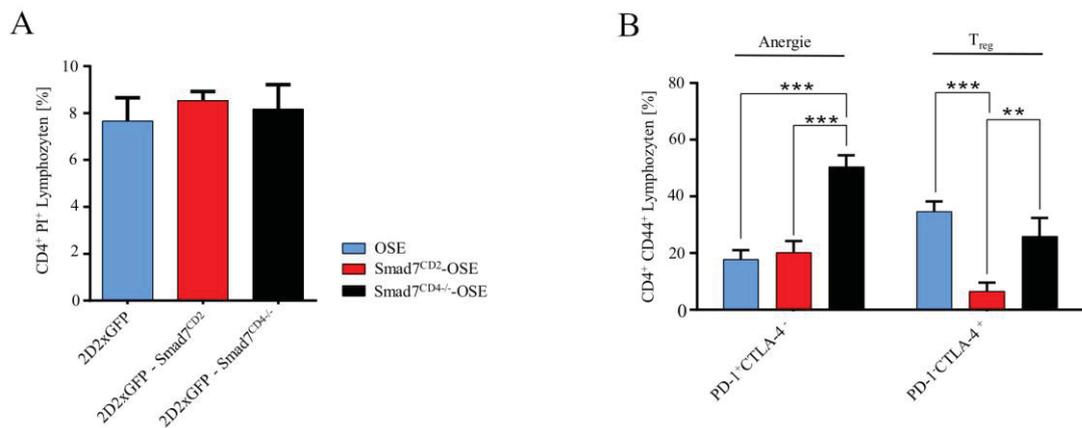


Abbildung 20: Smad7-abhängige Suppressionsmechanismen von T-Zellen in der Lamina propria. Häufigkeiten apoptotischer Lymphozyten aus der LP 10 d nach Transfer von 2D2xNur77-, 2D2xNur77-Smad7^{CD2}-, 2D2xNur77-Smad7^{CD4^{-/-}} CD4⁺ T-Zellen in TH-Mäuse (A). Intestinale GFP⁺CD4⁺ T-Zellen wurden auf CD44⁺ und PD-1⁺ (anergisch) oder CTLA-4⁺ (Treg) gefärbt (B). Die Daten sind als Mittelwert ± SEM dargestellt. Die Signifikanz wurde mittels 2-seitigem ANOVA und Tukey post-hoc Analyse bestimmt. ** p < 0,01, *** p < 0,001

Aus den transferierten 2D2xGFP⁺CD4⁺ T-Zellen wurden die CD4⁺CD44⁺ Lymphozyten-Population untersucht und auf anergische (PD-1⁺CTLA-4⁻) und regulatorische T-Zellen (PD-1⁻CTLA-4⁺) Marker hin unterschieden (Abb. 20).

CD4⁺CD44⁺PD-1⁺CTLA-4⁻ anergische T-Zellen aus der Lamina propria waren zwischen 2D2xGFP⁺- (MW±SEM; 17.7±1.5) und 2D2xGFP-Smad7^{CD2}CD4⁺ T-Zellen (MW±SEM; 20 ±1.5) unverändert. Für 2D2xGFP-Smad7^{CD4^{-/-}} T-Zellen wurde eine signifikante Steigerung anergischer T-Zellen detektiert (MW±SEM; 50.3 ±1.6, p=0,0003). Die Zellzahl CD4⁺CD44⁺PD-1⁻CTLA-4⁺ regulatorischer T-Zellen aus der Lamina propria war in 2D2xGFP⁺- (MW±SEM; 34.6±1.6) und 2D2xGFP-Smad7^{CD4^{-/-}} CD4⁺ T-Zellen (MW±SEM; 25.8±1.9) ähnlich, wogegen in 2D2xGFP-Smad7^{CD2}CD4⁺

T-Zellen (MW±SEM; 6.4±1.1,vs OSE, p=0,002; vs. Smad7^{CD4^{-/-}}-OSE; p=0,0007) signifikant weniger Tregs detektiert werden konnten.

Das Mikrobiom beeinflusst das Darm-Immunsystem, beispielsweise durch den Funktionserhalt und die Differenzierung von Immunzellen sowie Aufrechterhaltung der Homöostase und Toleranz (Belkaid and Hand, 2014). Der in dieser Arbeit gezeigte Ansatz der AT-EAE ist ebenfalls abhängig von einer Aktivierung von Immunzellen im Darm. Ob tatsächlich das Mikrobiom über die initiale Aktivierung autoreaktiver CD4⁺ T-Zellen im Darm entscheidet, wurde anhand einer Eradikation mittels Antibiotika-Behandlung zu verschiedenen Zeitpunkten des Experiments untersucht. Für den Versuch wurde eine präventiver Ansatz (-5 Tage) vor AT-EAE-Induktion (Tag 0) und ein therapeutischer Ansatz (+5 Tage) gewählt. Jeweils an Tag 5 und Tag 10 nach AT-EAE-Induktion wurde die Lamina propria auf eingewanderte GFP-markierte CD4⁺ T-Zellen hin untersucht (Abb. 21).

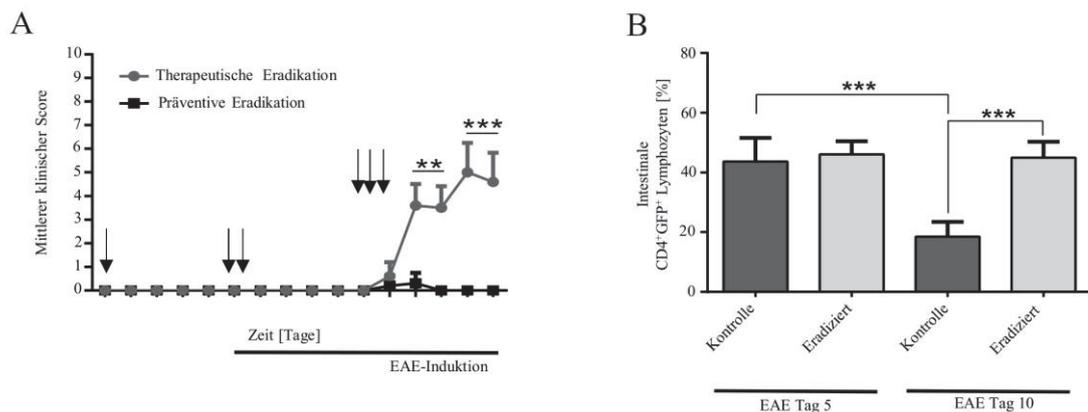


Abbildung 21: Eradikation des Darm-Mikrobioms während der AT-EAE. Das Mikrobiom von TH-Rezipienten wurde 5 Tage vor (↓) dem adoptiven Transfer von 2D2xGFP⁺CD4⁺ T-Zellen (↓↓) eradiziert. Die EAE wurde über 15 Tage analysiert. Eine therapeutische Eradikation wurde durchgeführt, als erste klinische Anzeichen auftraten (↓↓↓) (n = 10 in jeder Gruppe) (A). Häufigkeiten übertragener 2D2xGFP⁺CD4⁺ T-Zellen im Darm von TH-Rezipienten an Tag 5 und 10 (B). Die Daten sind als Mittelwert ± SD dargestellt. Die Signifikanz wurde mittels 2-seitigem ANOVA und Tukey post-hoc Analyse bestimmt. ** p < 0,01, *** p < 0,001

An Tag 5 der Analyse wurden vergleichbare Zellzahlen in der Lamina Propria von 2D2xGFP⁺CD4⁺ T-Zellen in der therapeutischen (MW±SEM; 42.5±6.9) und präventiven Gruppe (MW±SEM; 43.7±5.7) gefunden. An Tag 10 zeigte die präventiv

behandelte Gruppe eine reduzierte Zahl von $2D2xGFP^{+}CD4^{+}$ T-Zellen (MW \pm SEM; 19.5 ± 3.4) in der Lamina propria. Einhergehend mit der geminderten Zellzahl wurde auch eine Induktion klinischer Zeichen beobachtet. Für therapeutisch behandelte Tiere konnte interessanterweise keine Veränderung der $2D2xGFP^{+}CD4^{+}$ T-Zellzahl (MW \pm SEM; 42.1 ± 4.4) gezeigt werden. Einhergehend mit der stabilen Zellzahl, konnte in dieser Gruppe keine EAE induziert werden (Abb. 21). Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die Progression der AT-EAE, mit Beteiligung Darm-induzierter T-Zellen Mikrobiom-vermittelt ist.

Ob Darm-ständige $2D2xGFP^{+}CD4^{+}$ T-Zellen an den Entzündungsprozessen im ZNS beteiligt sind, wurde anhand des Rückenmarks injizierter Tiere überprüft. Diese wurden histologisch für Infiltrationen von $2D2xGFP^{+}CD4^{+}$ T-Zellen und Demyelinisierung (FMF) hin untersucht (Abb. 22).

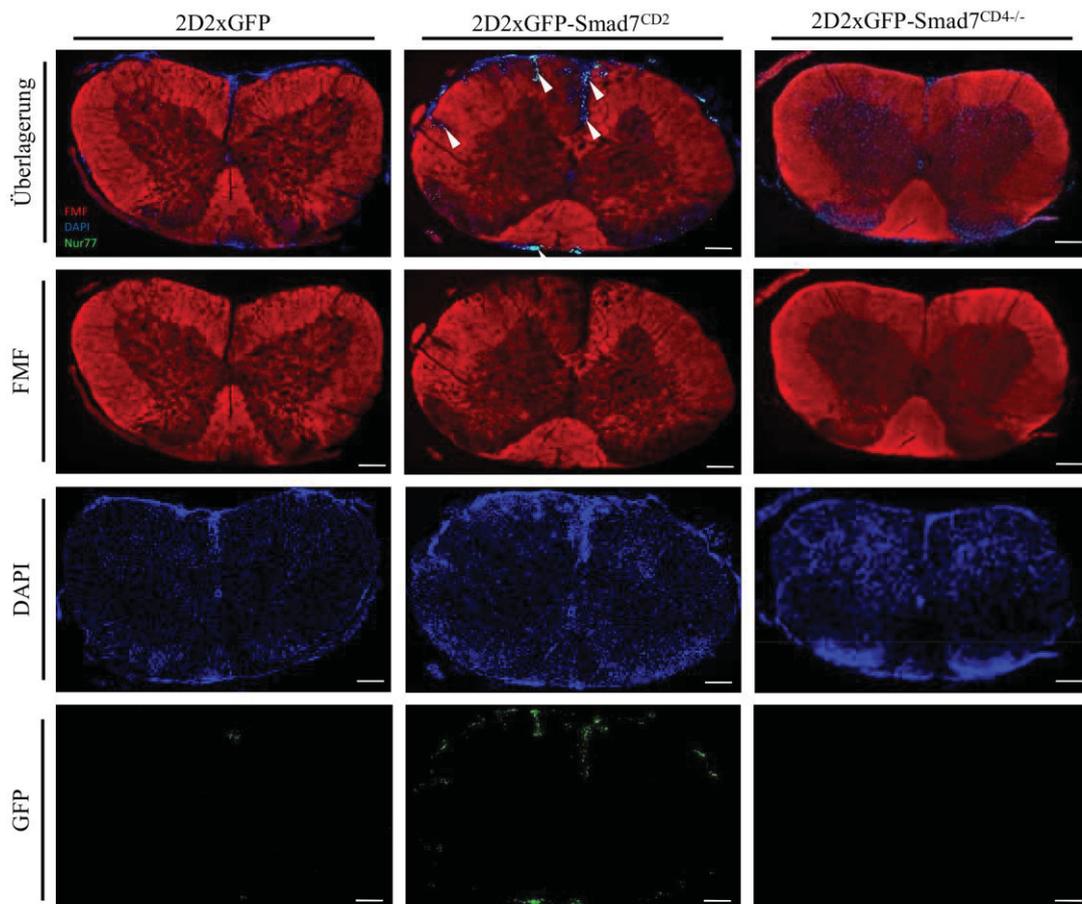


Abbildung 22: Infiltration adoptiv transferierter $2D2xGFP^{+}CD4^{+}$ T-Zellen in das Rückenmark. Repräsentative Rückenmarkschnitte von erkrankten Mäusen nach adoptivem Transfer von $2D2xGFP^{+}CD4^{+}$ T-Zellen verschiedener Genotypen. Die Schnitte wurden für Fluoromyelin F (rot, Myelin)-, DAPI (blau, Zellkerne)- und GFP

(grün, injizierte Darm-ständige 2D2xGFP⁺CD4⁺T-Zellen (n = 6 pro Gruppe) gefärbt. Die Pfeile zeigen GFP-, DAPI-doppelt-positive 2D2xGFP⁺CD4⁺ T-Zellen an.

Wie bereits gezeigt werden konnte, waren Rezipienten-Mäuse durch einen schwereren Krankheitsverlauf gekennzeichnet, wenn sie 2D2xGFP- oder 2D2xGFP-Smad7^{CD2}CD4⁺ T-Zellen injiziert bekamen (Abb.18). Passend dazu wurden 20 Tage nach AT-EAE-Induktion, 2D2xGFP⁺CD4⁺ T-Zellen von 2D2xGFP- und 2D2xGFP-Smad7^{CD2}-Tieren im Rückenmark von TH-Rezipienten gefunden. Für 2D2xGFP⁺ T-Zellen konnte eine geringe Beteiligung an ohnehin schon wenigen Läsionen des ZNS gezeigt werden (Abb. 22). Eine deutlich erhöhte 2D2xGFP⁺CD4⁺ T-Zellzahl wurde stattdessen mit 2D2xGFP-Smad7^{CD2}CD4⁺ injizierten T-Zellen in TH- Rezipienten gefunden. Eine Injektion von Smad7^{CD4-/-}CD4⁺ T-Zellen führte zu keinerlei Progression im Verlauf der AT-EAE (Abb.18). Damit übereinstimmend, wurden deshalb weder Läsionen noch infiltrierende 2D2xGFP⁺CD4⁺ T-Zellen im Rückenmark detektiert (Abb.22).

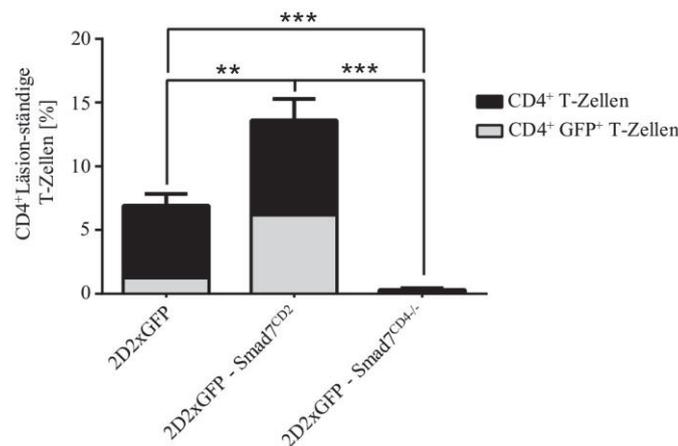


Abbildung 23: Analyse von adoptiv-transferierten 2D2xGFP⁺CD4⁺ T-Zellen in Läsionen des Rückenmarks. Statistische Analyse isolierter Lymphozyten aus den Läsionen des Rückenmarks von TH-Rezipienten. Anteil der 2D2xGFP⁺, 2D2xGFP-Smad7^{CD2}- oder 2D2xGFP-Smad7^{CD4-/-}CD4⁺T-Zellen im Rückenmark (grau) aus isolierten Lymphozyten des Rückenmarks (schwarz) (n = 6 pro Gruppe). Die Daten sind als Mittelwert ± SEM dargestellt. Die Signifikanz wurde mittels 2-seitigem ANOVA und Tukey post-hoc Analyse bestimmt. * p < 0.05, ** P < 0.01, *** p < 0.001.

Es konnte gezeigt werden, dass 2D2xGFP⁺CD4⁺ T-Zellen (MW±SEM; 1.3±0.4) einen geringen Anteil der insgesamt einwandernden T-Zellen ausmachen (MW±SEM; 6.8±0.6). Eine signifikante Steigerung Darm-abgeleitete CD4⁺ T-Zellen im Rückenmark konnte nach dem Transfer von 2D2xGFP-Smad7^{CD2}CD4⁺ T-Zellen

(MW±SEM; 6.3±0.5) im Vergleich zur gesamt eingewanderten T-Zellzahl (MW±SEM; 14.1±1.1) festgestellt werden (** p=0,031, *** p=0,0002). Wenige 2D2xGFP-Smad7^{CD2}CD4⁺ injizierte T-Zellen konnten im Rückenmark detektiert werden. Die Ergebnisse deuten auf eine Smad7-abhängige Einwanderung Darm-abgeleitete 2D2xGFP-CD4⁺ T-Zellen ins Rückenmark hin. Auch scheint die Pathogenität autoreaktiver T-Zellen, gekennzeichnet durch die erhöhte Partizipation in Läsionen, durch Smad7 gesteigert zu sein (Abb. 23).

Als nächstes wurde ermittelt, welcher T-Zell-Subtyp (Th1, Th17, Treg) die Entzündungsreaktion im Rückenmark vermittelt. Dafür wurden die einwandernden 2D2xGFP⁺CD4⁺ T-Zellen aus dem Rückenmark analysiert (Abb.24). Diese CD4⁺ T-Zellen stammen aus 2D2xGFP, 2D2xGFP-Smad7^{CD2} oder 2D2xGFP-Smad7^{CD4/-} Genotypen.

Th1-Zellen konnten v.a. in Rezipienten nach Transfer von 2D2xGFP-Smad7^{CD2} (MW±SEM; 20.5±1.7) im Vergleich zum Transfer von 2D2xGFP⁺CD4⁺ T-Zellen (MW±SEM; 6.3±0.8) oder Smad7^{CD4/-} CD4⁺ T-Zellen in Rückenmarksläsionen gefunden werden (MW±SEM; 2.9±0.4).

Th17-Zellen wurden im Vergleich dazu als dominanter T-Zell-Subtyp in Läsionen der 2D2xGFP⁺ (MW±SEM; 22.3±1.5) applizierten CD4⁺ T-Zellen gefunden. 2D2xGFP-Smad7^{CD2} (MW±SEM; 11.6±0.7) und Smad7^{CD4/-}CD4⁺ T-Zellen (MW±SEM; 13.5±0.8) wurden nach Transfer in ähnlicher Frequenz in den Läsionen des Rückenmarks gefunden (Abb. 24).

Regulatorische T-Zellen konnten in 2D2xGFP⁺ (MW±SEM; 13.1±0.9) und Smad7^{CD4/-} (MW±SEM; 16.4±1.9) applizierten Tieren in ähnlicher Frequenz detektiert werden. Im Vergleich dazu zeigten Smad7^{CD2} applizierte Tiere eine reduzierte T-Zellzahl (MW±SEM; 8.1±0.7).

Da die Entstehung von T-Zellen und deren Effektorfunktionen über das umgebende Milieu bestimmt wird, ist die Anzahl von CD4⁺CD62L⁺ T-Zellen für die Regulation von Entzündungen von Bedeutung. Ähnlich der regulatorischen T-Zellen in 2D2xGFP (MW±SEM; 4.2±0.5) und 2D2xGFP-Smad7^{CD4/-} (MW±SEM; 7.9±1) Tieren, zeigt sich in 2D2xGFP-Smad7^{CD2} (MW±SEM; 2.3±0.1) eine Reduktion naiver T-Zellen (Abb.24).

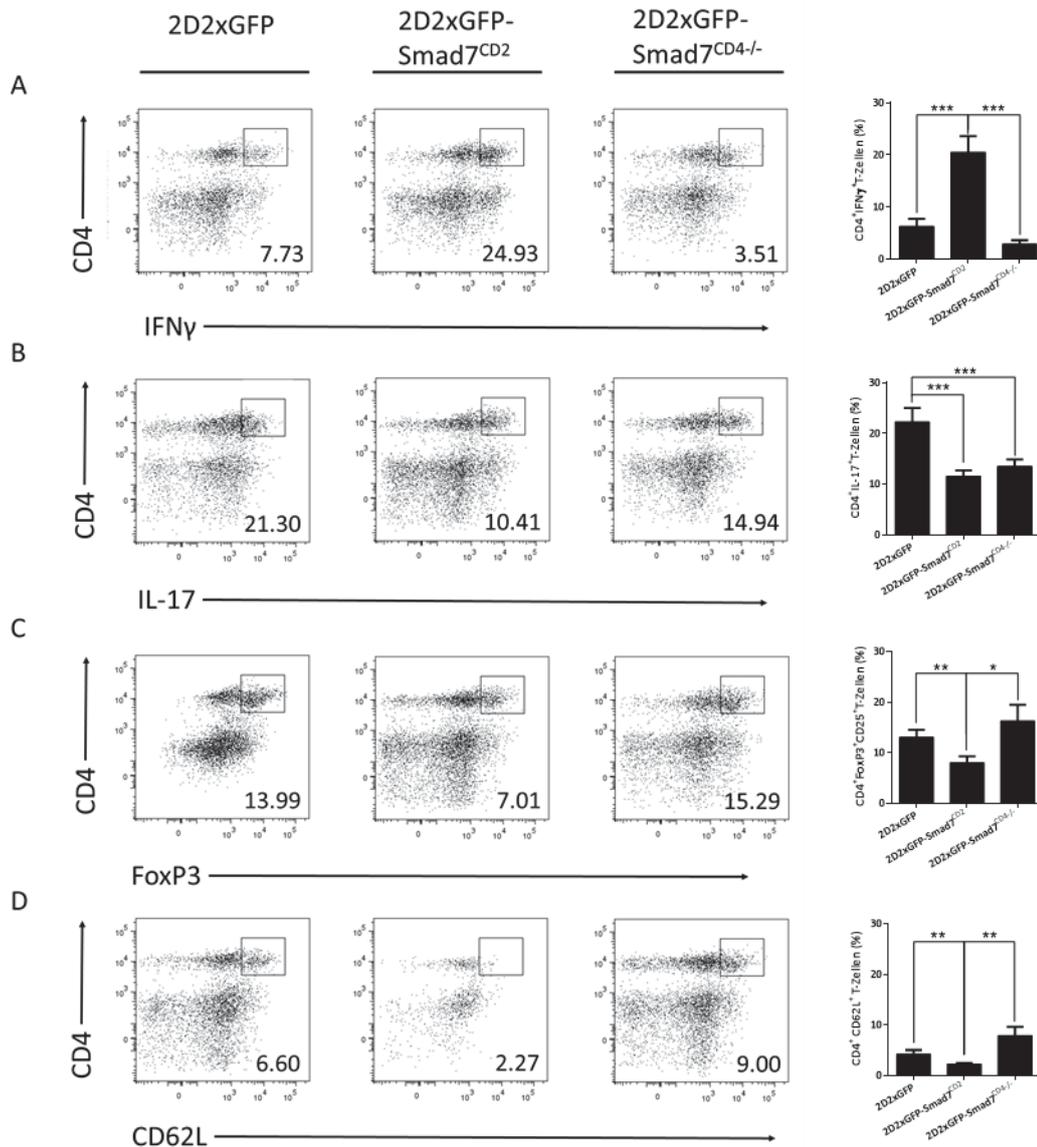


Abbildung 24: Der T-Zelltyp in Rückenmarks-Läsionen wird von deren Smad7-Expression bestimmt. FACS-Plots und die Frequenz infiltrierender Zellen ins Rückenmark. Analyse der Th1 (CD4⁺IFN γ ⁺), Th17 (CD4⁺IL-17⁺), Treg (CD4⁺FoxP3⁺CD25⁺) und naiven T-Zellen (CD4⁺CD62L⁺). Die Daten sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt (n = 6 pro Gruppe). Die Signifikanz wurde mittels 2-seitigem ANOVA und Tukey post-hoc Analyse bestimmt. * p < 0,05, ** P < 0,01, *** p < 0,001.

Es konnte gezeigt werden, dass die Frequenz der Effektor- und der zentralen T-Gedächtniszellen durch Smad7 (Smad7^{CD4}-, Smad7^{CD2}) im intestinalen Kompartiment verändert ist (Abb.14). Um nun herauszufinden, ob die resultierende Anfälligkeit bzw. Resistenz gegenüber der EAE durch einen Phänotyp-Wechsel der

Gedächtniszellen zu begründen ist, wurden Läsions-ständige 2D2xGFP⁺CD4⁺ T-Zellen an Tag 20 nach adoptivem Transfer basierend auf der Expression von CD44 und CD62 untersucht (Abb. 25). 2D2xGFP (MW±SEM; 89.1±3.2) und 2D2xGFP-Smad7^{CD2} (MW±SEM; 91.7±5) zeigten vergleichbare Werte eingewanderter T-Effektor-Gedächtniszellen, wohingegen in 2D2xGFP-Smad7^{CD4/-} transferierte Th-Rezipienten aufgrund fehlender Entzündungsreaktionen im Rückenmark nahezu keine inflammatorischen Zellen zu finden waren. Die Frequenzen von zentralen T-Gedächtniszellen und naiven T-Zellen zeigten keinen Unterschied (Abb. 25). Dieser Befund zeigt, dass die veränderte Frequenz der Gedächtniszellen keinen Einfluss auf die einwandernden Zellen hat.

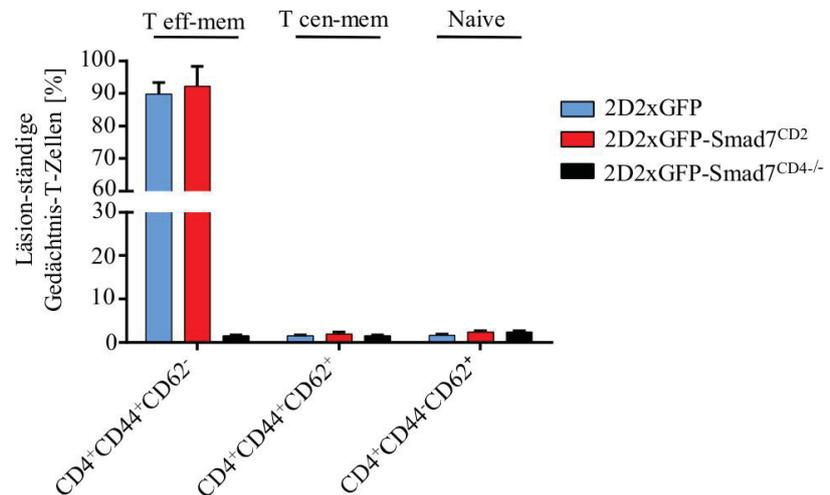


Abbildung 25: Der Läsion-vermittelnde Phänotyp von T-Gedächtniszellen in der AT-EAE ist unabhängig von der Smad7-Expression. T-Zellanalyse von zentralen (T_{CM}) oder Effektor-Gedächtnisphänotypen (T_{EM}) und naiven T-Zellen aus Läsionen im Rückenmark von adoptiv transferierten Mäusen (n = 6 pro Gruppe). Die Daten sind als Mittelwert ± SEM dargestellt. Die Signifikanz wurde mittels 2-seitigem ANOVA und Tukey post-hoc Analyse bestimmt.

Als nächstes wurde beurteilt, welchen Einfluss die MOG-spezifischen B-Zellen im Kontext spontaner ZNS-Entzündung spielen. Die spontane Entstehung der AT-EAE konnte nur durch den Transfer von 2D2-CD4⁺ T-Zellen in TH-Tiere erzielt werden (Abb.18). Zu Beginn der ersten OSE-Experimente wurden die Titer der Immunglobuline an den Tagen 20, 40, 60 und 80 bestimmt (Abb. 26, Tabelle 2). Interessanterweise konnte durch die veränderte Expression von Smad7 in T-Zellen ein Unterschied im Titer verschiedener Isotyp-Antikörper festgestellt werden.

Immunglobulin (Ig) G1 ist die größte Untergruppe der IgG-Immunglobuline. Sie vermitteln Immunreaktionen gegen Protein- und Polypeptidantigene (Vidarsson et al., 2014). Diese wurden in hoher Konzentration im Blut von Wildtyp-Mäusen (MW±SEM; 2.6±0.1mg/ml, Tag 80, Tabelle 2) und in einer noch höheren Konzentration in Smad7^{CD4^{-/-}}-OSE-Mäusen (MW±SEM; 3.0±0.1mg/ml, Tag 80) detektiert. OSE-Tiere (MW±SEM; 1.7±0.2mg/ml, Tag 80) zeigten einen unveränderten Titer, Smad7^{CD2}-OSE-Tiere zeigten eine Reduktion der Titer (MW±SEM; 0.6±0.2mg/ml, Tag 80). IgG2 hingegen bindet spezifisch an Polysaccharidantigene und kommt deutlich seltener im Blut vor (Vidarsson et al., 2014). Hier wurde eine doppelt so hohe Konzentration in Smad7^{CD2}-OSE-Mäusen (MW±SEM; 1.6±0.2mg/ml, Tag 80) im Vergleich zu WT-(MW±SEM; 0.5±0.1mg/ml, Tag 80), OSE-(MW±SEM; 0.8±0.3mg/ml, Tag 80) und Smad7^{CD4^{-/-}}-OSE (MW±SEM; 0.5±0.1 mg/ml, Tag 80)-Tieren gefunden. IgM bindet charakteristische Antigene von Krankheitserregern und erhöht die Affinität für eine immunologische Reaktion durch Immunzellen. Außerdem sind die IgM der stärkste Aktivator für das Komplementsystem (Vidarsson et al., 2014). Interessanterweise konnte gerade in den von Paralyse betroffenen Gruppen wie OSE (MW±SEM; 4.6±0,3mg/ml, Tag 80) und Smad7^{CD2}-OSE (MW±SEM; 2.9±0.1 mg/ml, Tag 80) eine reduzierte Menge an IgM detektiert werden. Smad7^{CD4^{-/-}}-OSE (MW±SEM; 0.9±0.1 mg/ml, Tag 80), WT-Tiere (MW±SEM; 1.6±0.3 mg/ml, Tag 80) zeigten hingegen einen unveränderten Titer. Ausgenommen für IgG2a, zeigt sich bei IgG1 eine Steigerung der Konzentration im Blut und eine Reduktion des IgM-Titers mit fortschreitender Progression der optikospinalen Enzephalomyelitis.

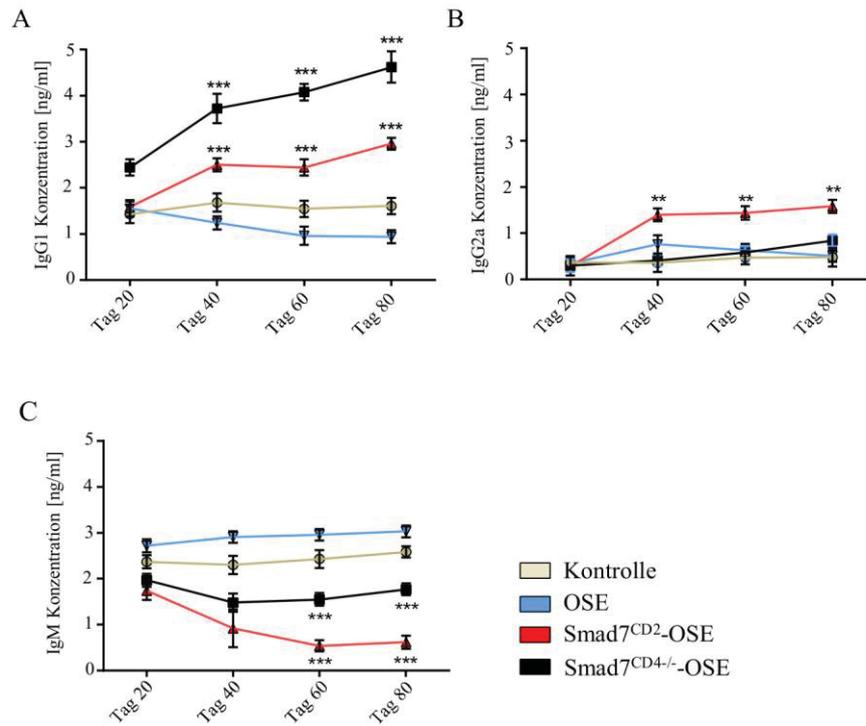


Abbildung 26: Immunglobulin-Titer im Verlauf der OSE. Analyse der aus dem Blut am Tag 20, 40, 60 und 80 nach der Geburt erhaltenen Immunglobuline IgG1 (A), IgG2a (B) und IgM (C) (n = 24 für jede Gruppe). Die Signifikanz wurde mittels 2-seitigem ANOVA und Tukey post-hoc Analyse bestimmt. ** p < 0,01, *** p < 0,001

Um weiter herauszufinden, ob die Smad7 bedingte inflammatorische Polarisierung von CD4⁺ T-Zellen die Integrität der Blut-Hirn-Schranke signifikant schädigt, wurde eine Analyse der Permeabilität der BHS durchgeführt. Dazu wurden erkrankten AT-EAE-Tieren während der Perfusion der Farbstoff Evans Blue injiziert. Dieser dringt bei nicht adhäsiver Blut-Hirn-Schranke in das ZNS ein und fluoresziert bei der mikroskopischen Analyse rot (Abb. 27).

	Tag 20	Tag 40	Tag 60	Tag 80
IgG1				
Kontrolle	1,43±0,19	1,68±0,19	1,54±0,17	1,60±0,16
OSE	2,44±0,17	3,72±0,31	4,07±0,18	4,62±0,33
Smad7 ^{CD2} -OSE	1,58±0,12	2,50±0,14	2,44±0,17	2,96±0,12
Smad7 ^{CD4^{-/-}} -OSE	1,55±0,17	1,24±0,14	0,96±0,19	0,93±0,14
IgG2a				
Kontrolle	0,36±0,14	0,36±0,19	0,47±0,14	0,48±0,19
OSE	0,3±0,11	0,41±0,12	0,58±0,4	0,84±0,17
Smad7 ^{CD2} -OSE	0,28±0,19	1,4±0,1	1,44±0,3	1,58±0,3
Smad7 ^{CD4^{-/-}} -OSE	0,35±0,12	0,76±0,19	0,63±0,11	0,51±0,22
IgM				
Kontrolle	2,72±0,14	2,34±0,17	2,46±0,18	2,58±0,12
OSE	1,99±0,11	1,44±0,19	1,57±0,13	1,75±0,12
Smad7 ^{CD2} -OSE	1,73±0,19	0,92±0,41	0,53±0,12	0,62±0,14
Smad7 ^{CD4^{-/-}} -OSE	2,72±0,11	2,91±0,12	2,96±0,17	3,03±0,19

Tabelle 2: Klinische Statistik zum Immunglobulin-Titer aus dem Blut erkrankter OSE-Mäuse und von Tieren mit Smad7-Deletion oder Smad7-Überexpression. Es wurden die Titer von IgG1, IgG2a und IgM an den Tagen 20,40,60 und 80 nach der Geburt erfasst. Dabei wurden Smad7^{CD2}- und Smad7^{CD4^{-/-}}-OSE-Tiere jeweils mit OSE-Tieren (Kontrolle) verglichen. Es wurden 20 Tiere pro Gruppe gemessen. Die Signifikanz wurde mittels 2-seitigem ANOVA und Tukey post-hoc Analyse bestimmt. ** p<0.01, *** p<0.001

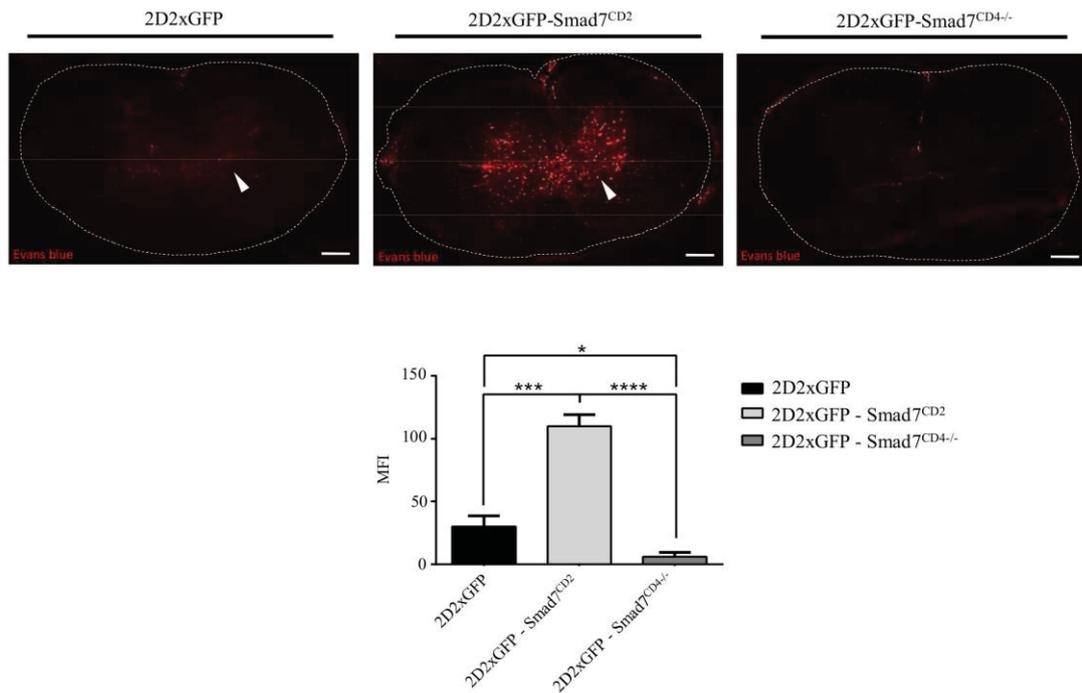


Abbildung 27: Permeabilisierung der Blut-Hirn-Schranke während der AT-EAE. Gezeigt sind weitere Analysen von Rückenmark-infiltrierenden 2D2xGFP⁺CD4⁺T-Zellen. Die Färbung des Rückenmarks mit Evans Blue (rot) wurde zur Untersuchung der Integrität der Blut-Hirn-Barriere verwendet und quantifiziert (n = 5 pro Gruppe). Die Signifikanz wurde mittels 2-seitigem ANOVA und Tukey post-hoc Analyse bestimmt. * P < 0,05, ***P < 0,001, ****P < 0,0001

Passend zum Erkrankungsverlauf der AT-EAE-Tiere (Abb. 17+18), zeigte sich eine deutlich verstärkte Permeabilisierung bei adoptivem Transfer von Smad^{CD2}-2D2xGFP⁺CD4⁺T-Zellen (MW±SEM; 119.5±6.1). Wenig Evans blue wurde in Tieren gefunden, denen wildtypische 2D2xGFP⁺CD4⁺T-Zellen appliziert wurden (MW±SEM; 37.8±9.5). Nach adoptivem Transfer von Smad^{CD4-/-}-2D2xGFP⁺CD4⁺T-Zellen konnte keine Permeabilisierung festgestellt werden (MW±SEM; 14.6±4.9). Im Rückenmark drang Evans Blue vor allem in die Bereiche der Zellkörper-starken grauen Substanz und nur wenig in die weiße Substanz ein (Abb. 27).

4.6 Die Expression von Smad7 und T-Zell-Differenzierungsmarkern in der intestinalen Mukosa von Patienten mit Multipler Sklerose

Für den translationalen Ansatz wurden die Befunde der fehlregulierten Smad7-Expression und dem veränderten Auftreten von T-Zellen in der Lamina propria des Darms in humanem Gewebe untersucht (Abb. 28-30). In Kooperation mit Teresa

Leichsenring aus der AG Kleiter wurden Messungen zu den Markern CD4, Smad7, pSmad2/3, IL-17 & FoxP3 durchgeführt (Dissertation Leichsenring, urn:nbn:de:hbz:294-58206). Von Frau Leichsenring wurden Darmbiopsien von 27 MS-Patienten mit denen von 27 gesunden Kontrollbiopsaten miteinander verglichen. In einer gemeinsam durchgeführten Analyse wurde festgestellt, dass die Zellzahl der CD4⁺T-Zellen pro 0.1mm² Lamina propria zwischen den Gruppen (MW±SEM; HC, 59.5±6.2; MS, 55.5±6.6) nicht variiert.

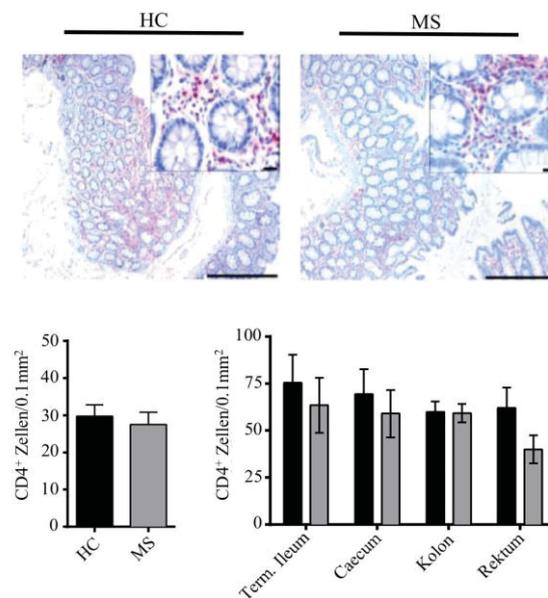


Abbildung 28: T-Helfer Zellen in der Lamina Propria von MS- und HC-Darmbiopsien. Vergleich von Markern für TGF- β -Signalgebung und T-Zell-Differenzierung in Darmbiopsien von Patienten mit rezidivierender oder progredienter MS (n = 27) und gesunden Kontrollen (HC; n = 27). Gezeigt ist das Auftreten der CD4⁺T-Zellen in MS- oder HC-Proben. Die Daten sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt. Die Signifikanz wurde mittels 2-seitigem ANOVA und Tukey post-hoc Analyse bestimmt. (Färbung, Analyse, T.L., urn:nbn:de:hbz:294-58206; Detail-Analyse des Darms S.H.)

Als weitere Analysen wurde in der vorliegenden Arbeit die ermittelte Zellzahl retrospektiv auf die verschiedenen Abschnitte der Biopsie-Entnahme (terminales Ileum, Cecum, Colon, Rektum) aufgeteilt. CD4⁺T-Zellen waren im terminalen Ileum, Cecum und dem Rektum tendenziell weniger jedoch nicht signifikant reduziert (Abb.28).

Um eine MS abhängige Fehlregulation des TGF-beta-Signalwegs in der Darmmukosa aufzudecken, wurden zusätzlich die Downstream-Moleküle phospho-Smad2/3 (pSmad2/3) untersucht (Abb. 29). Es wurde eine tendenziell verstärkte Expression von Smad7 in der Lamina propria gefunden, die jedoch nicht signifikant war (MW±SEM; HC, 26.4±4.2; MS, 34.7±5.9). Durch die TGF-beta bedingte Threonin/Serin-Kinase-Aktivität wird die Phosphorylierung von Smad2/3 und damit ein regulatorischer T-Zell-Phänotyp induziert. Die Untersuchungen zeigen, dass die Aktivierung von Smad2/3 in Biopsien der MS-Patienten signifikant reduziert war (MW±SEM; HC, 37.4±6.0; MS, 20.7±3.1, Abb.29).

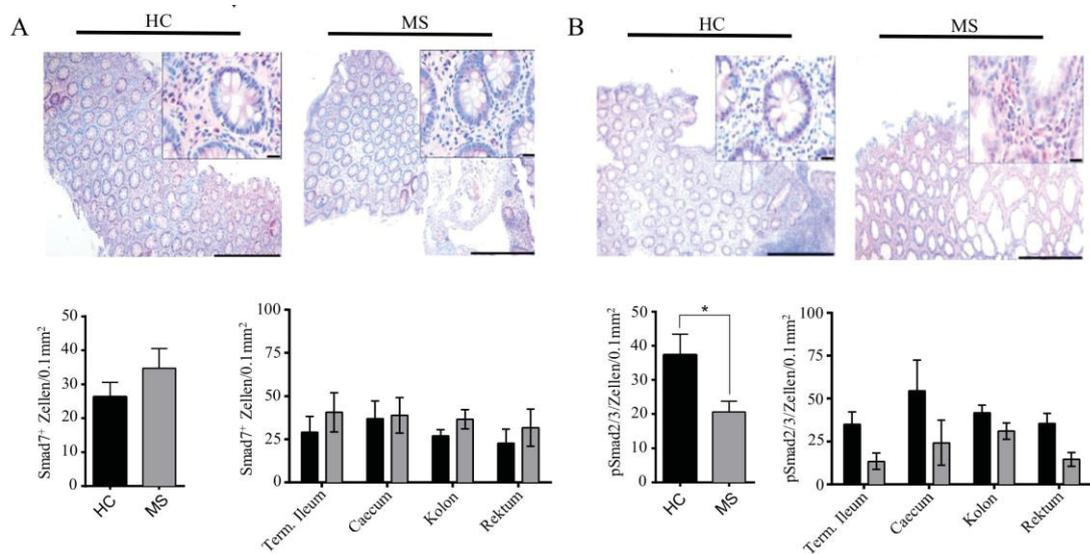


Abbildung 29: Differenzielle Aktivierung des TGF-β-Signalwegs in der Darmmukosa von MS-Patienten. Analyse des TGF-β-Inhibitors Smad7 (A) und des TGF-β-Signalwegmoleküls pSmad2/3 (B). Die Daten sind als Mittelwert ± SEM dargestellt. Die Signifikanz wurde mittels 2-seitigem ANOVA und Tukey post-hoc Analyse bestimmt. * P < 0,05. (Färbung, Analyse, T.L., urn:nbn:de:hbz:294-58206; Detail-Analyse des Darms S.H.)

Die Aufteilung der Smad7-Expression war in jedem Teilabschnitt der MS-Biopsien gegenüber der gesunden Kontrollen tendenziell erhöht. Aktives pSmad2/3 wurde in stark reduzierter aber nicht signifikanter Menge in den Teilabschnitten des Darms in MS-Biopsien gefunden (p=0,016). Auch unterschieden sich Expressionsmaxima der Abschnitte zwischen gesunder Kontrolle und MS-Patienten. Dabei zeigte sich, im Cecum die höchste Expression von pSmad2/3, in MS-Patienten hingegen zeigte sich dieser Trend im Kolon (Abb.29).

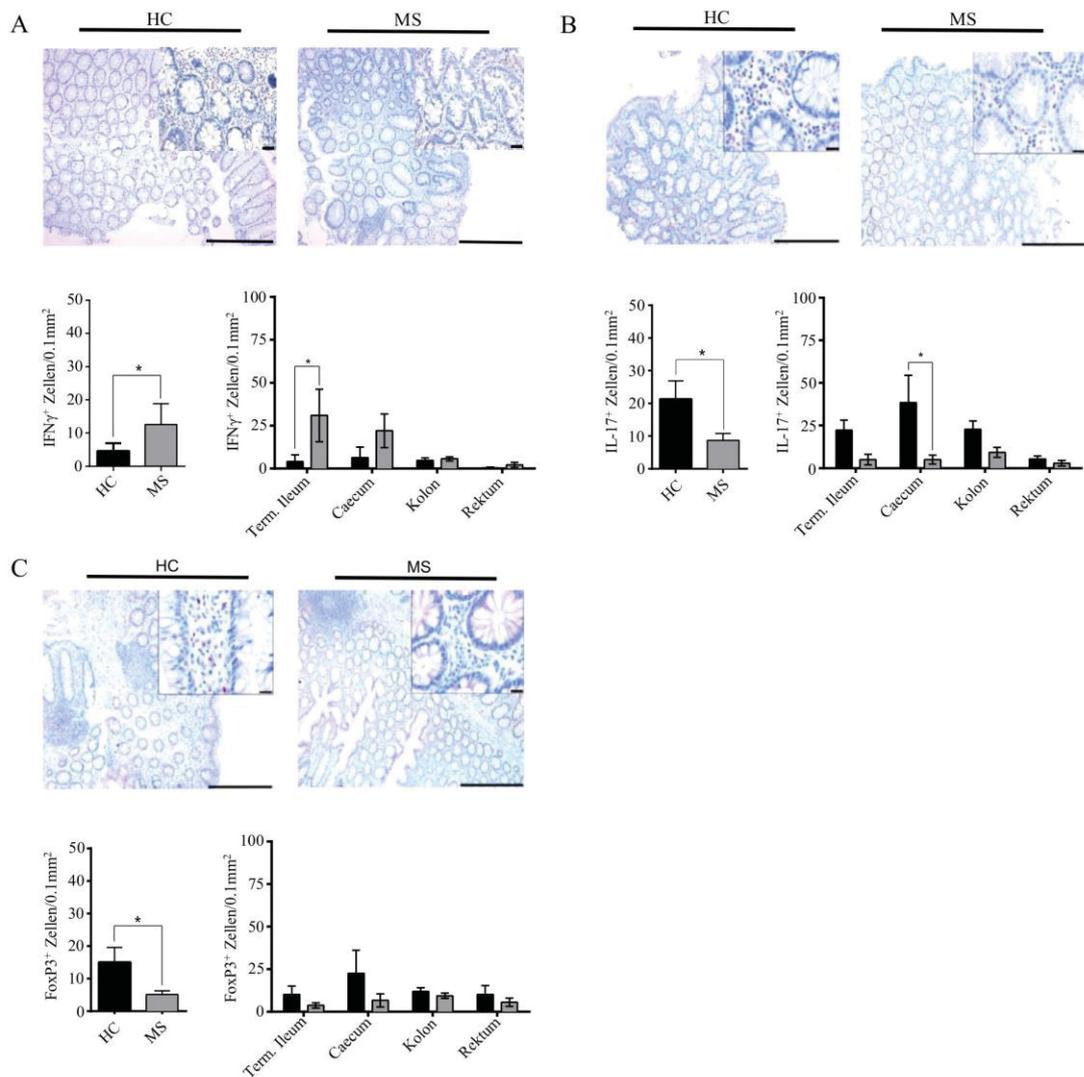


Abbildung 30: TGF- β abhängige Veränderung der T-Zell-Polarisation im Darm von MS-Patienten. Zytokin-Analyse von IFN γ (A), IL-17 (B) und FoxP3 (C). Die Daten sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt. Die Signifikanz wurde mittels 2-seitigem ANOVA und Tukey post-hoc Analyse bestimmt. * P <0,05. (IL-17- und FoxP3-Färbung, Analyse, T.L., urn:nbn:de:hbz:294-58206; Detail-Analyse des Darms S.H.; IFN γ -Färbung, Analyse, Detail-Analyse des Darms S.H)

Nachfolgend wurde die Expression von IFN γ (Abb. 30A), IL-17 (Abb. 30B) und FoxP3 (Abb. 30C) aus MS und HC-Patienten untersucht. Teresa Leichsenring fand heraus, dass IL-17 in Biopsien von MS-Patienten signifikant reduziert war (MW \pm SEM; HC, 21.3 \pm 3.2; MS, 8.6 \pm 1.2)(p=0,02). FoxP3 wurde ebenfalls in signifikant reduzierter Expression festgestellt (MW \pm SEM; HC, 15.1 \pm 4.5; MS, 5.2 \pm 1.1) (p=0,037).

Weiter konnte herausgefunden werden, dass IFN γ im Gewebe von MS-Patienten signifikant erhöht war (MW \pm SEM; HC, 6.9 \pm 1.2; MS, 11.7 \pm 1.4). Bezogen auf die T-Zell-Polarisation, verdeutlicht die verringerte Expression von pSmad2/3 und die daraus resultierende Minderung der TGF- β abhängigen Th17- und Treg-Zellzahl, dass der TGF- β -Signalweg gehemmt ist. Auch wird durch die erhöhte IFN- γ -Expression ein reduziertes TGF- β Signal vermutet, das zur Polarisierung von Th1-Zellen führt.

IL-17 und FoxP3 war in allen Teilabschnitten der MS-Biopsien reduziert war (Abb. 30). Für IL-17 konnte im Cecum eine signifikante Reduktion festgestellt werden (p=0,036). Trotz signifikant weniger auftretendem FoxP3 in der Zusammenfassung aller Werte, konnte die tendenzielle Reduktion in den Teilabschnitten nicht bestätigt werden. Für IFN γ wurde eine erhöhte Expression festgestellt je näher die Biopsie am Dünndarm entnommen wurde. So wurden signifikant erhöhte IFN γ -Werte im terminalen Ileum von MS-Patienten festgestellt (p=0,013).

Da für Smad7 kein signifikanter Unterschied in humanen Proben festgestellt werden konnte (Abb. 27), sollte zum Vergleich die Expression von Smad7 mit Explantaten aus der Maus verglichen werden (Abb. 31) Dazu wurde das terminale Ileum von OSE, Smad7^{CD2}-OSE und Smad7^{CD4^{-/-}}-OSE-Mäusen histologisch auf Smad7⁺ positive Zellen hin untersucht.

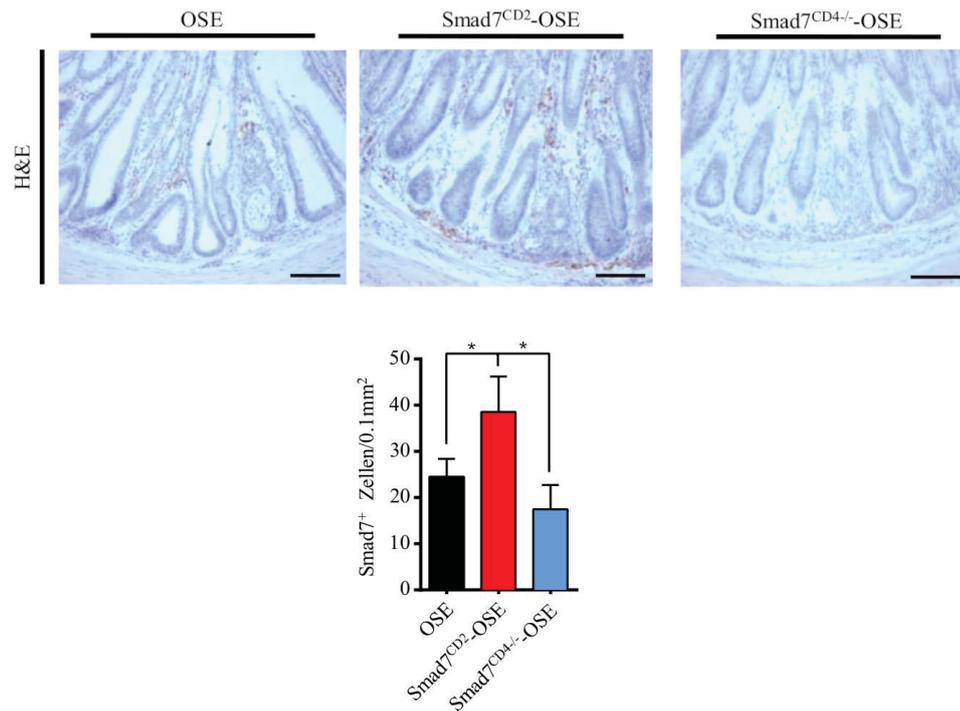


Abbildung 31: Erhöhte Expression von Smad7 in der murinen Lamina propria bildet Befunde der MS-Biopsien ab. Färbung des Dünndarms mittels H&E und Quantifizierung der Smad7⁺-Zellen. Es wurden OSE-, Smad7^{CD2}- und Smad7^{CD4}-/- Tiere miteinander verglichen. Die Daten sind als Mittelwert ± SEM angegeben. Die Signifikanz wurde mittels 2-seitigem ANOVA und Tukey post-hoc Analyse bestimmt. * P < 0,05

Die Smad7-Überexpression in T-Zellen von Smad7^{CD2}-OSE-Mäusen war signifikant erhöht (MW±SEM; 38.6±8.2) (p=0,011) gegenüber den anderen OSE-Genotypen. Dahingegen zeigen Smad7^{CD4}-/-OSE-Mäuse (MW±SEM; 16.6±5.9) (p=0,012) zwar eine leicht reduzierte Smad7 Expression gegenüber dem Wildtyp. Interessanterweise, ähnelt die Expression von Smad7, die Polarisierung der T-Zellen und der Krankheitsverlauf in Smad7^{CD2}-OSE-Mäusen den Befunden, die in MS-Biopsien gefunden wurden.

5. Diskussion

Autoreaktive CD4⁺ und zytotoxische CD8⁺ T-Zellen sind in der MS hauptverantwortlich für die Entstehung entzündlicher Entmarkungsherde des ZNS (Fletcher et al., 2010). Der Ursprung dieser Selbst-Antigen erkennenden CD4⁺ T-Zellen ist bisher weder hinreichend verstanden noch ist erklärt, wie solche Zellen die körpereigenen Toleranzmechanismen überwinden können. Das Darm-Immunsystem und das Mikrobiom wurden in der letzten Dekade als Modulatoren und Initiatoren für Autoimmunerkrankungen beschrieben (van den Hoogen et al., 2017, Fleck et al., 2017). Die Entstehung autoreaktiver CD4⁺ T-Zellen in diesen immunologisch streng kontrollierten Grenzflächen ist bisher nicht ausreichend untersucht worden und stellt einen neuen Ansatz für eine therapeutische Intervention dar.

In dieser Arbeit wurde daher postuliert, dass der für die T-Zell-Differenzierung wichtige Determinierungsfaktor TGF- β durch Smad7 in der Darmmukosa bei MS fehlreguliert ist. Daher wurde die Rolle von intestinalem Smad7 in CD4⁺ T-Zellen bei der Pathogenese der durch das Darmmikrobiom induzierten und spontan entstehenden Optikospatialen Enzephalomyelitis (OSE), einem murinen Modell autoimmuner ZNS-Demyelinisierung, untersucht. CD4⁺ T-Zellen modifizieren den immunologischen Status des Gewebes und orchestrieren die Entzündungsreaktion der residierenden und einwandernden Immunzellen. In MS-Patienten konnte eine erhöhte Expression von Smad7 im Blut während Schubereignissen beobachtet werden und auch die Manipulation von Smad7 in T-Zellen zeigte einen Einfluss auf den Prozess der schubformigen EAE (Kleiter et al., 2010).

Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen ergaben, dass Smad7 eine entscheidende Rolle bei der Überwindung der intestinalen Toleranz bei CD4⁺T-Zellen spielt und deren Beteiligung an Entzündungen im ZNS begünstigt. Im Detail führt die erhöhte Expression von Smad7 in CD4⁺ T-Zellen zu einer ausgeprägten Form der OSE, wohingegen die Deletion von Smad7 in CD4⁺ T-Zellen eine Protektion gegenüber der Entwicklung der Erkrankung zeigt. Die Proliferation von T-Zellen unter Smad7-Überexpression führte zu einer Polarisierung naiver T-Zellen zu inflammatorischen T-Zellen und steigerte die MOG-spezifische Proliferation. Im Gegensatz dazu führte eine Deletion von Smad7 zur Protektion von OSE-Tieren durch eine gesteigerte Frequenz regulatorischer T-Zellen und einem nicht-proliferativen, anergischen Phänotyp. Weiterhin führte die Smad7-Überexpression zu einer geminderten Gewebeständigkeit

von T-Zellen im Darm und der Entstehung von Zellinfiltraten im Rückenmark einschließlich einer gesteigerten Entzündungsreaktion im ZNS..

Unter Verwendung des Adoptiven Transfer-Modells konnte die Aktivierung autoreaktiver CD4⁺ T-Zellen an der mukosalen Barriere und die darauf folgende Migration in das ZNS demonstriert werden. Die Eradikation des Darmmikrobioms führte zu einem Ausbleiben klinischer Symptome im OSE-Modell. Aufgrund eines anti-inflammatorischen und anergischen Phänotyps der CD4⁺ T-Zellen führte die Deletion von Smad7 zu einer Protektion gegenüber der Entwicklung der OSE. Diese Ergebnisse wurden mittels Untersuchungen von humanen Darmbiopsien von MS-Patienten bekräftigt. Dort konnte zwar nur eine tendenziell gesteigerte Expression von Smad7 in der Darmmukosa von MS-Patienten gezeigt werden, jedoch waren pSmad2/3, ein Downstream-Molekül des TGF- β -Rezeptor-Signalwegs, und alle durch die Expression von Smad7 modulierten T-Zell-Subtypen (Th1, Th17, Tregs) ebenfalls verändert. Daraus folgt, dass Smad7 in T-Zellen ein wichtiger Faktor für die Kontrolle der Immunantwort und die Überwindung intestinaler Toleranzmechanismen ist.

5.1 Charakterisierung des Smad7-OSE-Mausmodells

Die genetische Manipulation von Smad7 in T-Zellen ändert die Differenzierung von T-Zellen generell. Angewendet im Mausmodell der EAE konnten Kleiter und Kollegen zeigen, dass Tiere mit einer Smad7-Überexpression in T-Zellen einen deutlich stärkeren Verlauf der EAE im Vergleich mit Wildtyp induzierten EAE-Tieren aufweisen. Die Deletion hingegen führte in diesen Experimenten zu einer geringeren Belastung (Kleiter et al., 2010). Die Übertragung der Smad7 Manipulation auf das Darmmikrobiom-induzierte OSE-Modell zeigte einen ähnlichen Verlauf wie zuvor in der EAE beschrieben. Anders als bei Kleiter et al., führten die Smad7 deletierten T-Zellen zu einer nahezu vollständigen Protektion vor der Entstehung von klinischen Symptomen. Eine Ursache dafür könnte die unterschiedlichen Induktionsprozesse sein. EAE-Tiere werden mit einer Kombination aus MOG₃₅₋₅₅-Peptid, Freund'schem Adjuvant und Pertussis Toxin immunisiert, wobei eine Inzidenz von meist 100% erreicht wird (Miller and Karpus, 2007). Das Modell der OSE hingegen erreicht unter normalen Haltungsbedingungen eine Inzidenz von ca. 50% (Krishnamoorthy et al., 2006). Im Gegensatz zu der EAE in wiltypischen Mäusen sind im OSE-Modell 2D2 T-Zellen und Th B-Zellen miteinander kombiniert, wodurch diese Immunzellen einer

zusätzliche Kontrolle suppressiver Mechanismen unterliegen (O'Garra and Vieira, 2004).

Da die mikrobielle Besiedelung des Dams für die Induktion der OSE verantwortlich ist, waren ähnlich der EAE, Veränderungen der Darmarchitektur und Schwellungen einzelner Darmkompartimente, z.B. der Lamina propria, zu erwarten (Nouri et al., 2014). Zusätzlich war durch die Überexpression von Smad7 im OSE-Modell eine erhöhte Frequenz von inflammatorischen Th1-Zellen und damit einhergehend auch eine Inflammation des Darms wahrscheinlich (Strober and Fuss, 2011). Trotz des deutlich stärkeren OSE-Verlaufs in Smad7-überexprimierten Tieren, bestätigte sich keine dieser Erwartungen. Die erhöhte Anzahl Lamina propria ständiger Th1-Zellen und ausbleibender Inflammation lässt einerseits den Schluss eines stark suppressiven Milieus oder andererseits einer differenziellen Form des Th1 Subtyps zu (Tau et al., 2000). Tau und Kollegen haben gezeigt, dass die Expression von IFN γ R2 die Th1-Differenzierung verhindert, die Funktion von Th1-Zellen inhibiert und damit einen nicht funktionellen Th1-Phänotyp forcieren (Tau et al., 2000). Auch ist ein Unterschied im Sekretionsverhalten von IFN γ der Th1-Population zu vermuten. So konnte gezeigt werden, dass eine aktivierte Th1-Linie existiert, die kein IFN γ produziert, jedoch für mehrere Monate im Organismus persistieren kann (Wu et al., 2002). Ein bisher unbeachteter Punkt dieser Arbeit sind CD8⁺ T-Zellen, die durch die Überexpression von Smad7 unter dem CD2-Promotor ebenfalls beeinflusst sind und in der Pathogenese der MS eine tragende Rolle spielen. Die Charakterisierung inflammatorischer CD4⁺ oder CD8⁺ T-Zellen und einer möglichen Smad7-vermittelten Plastizität sollte daher in weiteren Experimenten untersucht werden.

Vermutlich weisen Smad7-deletierte Mäuse eine höhere Frequenz an tolerogenen Zellen auf. Tolerogene Zellen sind z.B. IL-10 oder TGF- β sekretierende Zellen ebenso wie anergische T-Zellen. So können anergische Zellen die Suppression entzündlicher Prozesse unterstützen, u.a. durch die kompetitive Bindung von Antigenen (Zheng et al., 2009). Im Gegenzug sind die beobachteten Zentralen-Gedächtnis-Zellen in Smad7-überexprimierten Tieren ein Hinweis auf ein formbares T-Zell-Milieu mit Zugang zu unterschiedlichen Effektorfunktionen (Wan and Flavell, 2009). Möglicherweise wird hierdurch und durch die zusätzlich hohe Dichte von MOG₃₅₋₅₅ T-Zell-Rezeptoren die Entstehung einer möglichen Fehlerkennung und die Progression der Erkrankung begünstigt.

Zwar führt die Deletion von Smad7 in T-Zellen zu einer Protektion gegenüber der OSE, jedoch konnten Lukas und Kollegen zeigen, dass die Deletion von Smad7 in dendritischen Zellen ebenfalls in einer Resistenz gegenüber der EAE resultiert (Lukas et al., 2017). Hierdurch wird klar, dass Smad7 nicht nur isoliert, sondern auch im Netzwerk immunologischer Interaktion untersucht werden sollte.

5.1.1 TGF- β in der Darmmukosa

Epithelzellen, myeloide Zellen und Lymphozyten der intestinalen Mukosa sekretieren TGF- β . Dieses Zytokin kann sowohl parakrin als auch autokrin wirken und erhält so die intestinale Integrität und immunologische Homöostase in der Mikrobiom- und Antigen-reichen Umgebung des Darms (Malhotra and Kang, 2013). Beispiele dafür sind die Regulation der IgA-Sekretion von B-Zellen, der Erhalt der mukosalen Barriere und die Kontrolle der T-Zell-Differenzierung in einem inflammatorischen oder suppressiven Phänotyp. Interessanterweise führt die Aktivierung des TGF- β -Signalwegs und die Synergie mit anderen immunmodulatorischen Faktoren wie z.B. Retinsäure zu einer verstärkten Suppression gegenüber dem Mikrobiom oder Nahrungs-Antigenen. Die immunsuppressiven Eigenschaften des TGF- β -Signalwegs sind im Darm engmaschig durch die Smad-Signalkaskade, dominante Transkriptionsfaktoren und akzessorische Chromatinmodifikatoren reguliert (Malhotra and Kang, 2013) (Kalekar et al., 2016). Obwohl viele Immunzellen responsiv auf TGF- β sind, hat sich gezeigt, dass der Funktionsverlust von TGF- β in CD4⁺ T-Zellen zu einem Verlust der Toleranz und damit zur Autoimmunität führt. Paradoxe Weise wurde gezeigt, dass eine chronische Inflammation bestehen bleiben kann, trotz lokaler Expression von TGF- β . (Monteleone et al., 2004). Grund ist eine verstärkte Expression von Smad7. Die Smad7-Expression wird durch proinflammatorische Zytokine wie IFN γ , INF α und IL-1 β induziert. (Ulloa et al., 1999)

5.2 Einfluss des Mikrobioms auf die T-Zell-Differenzierung

Die Ätiologie der MS wirft bis heute immer noch weitreichende Fragen auf. Hauptsächlich stellt sich die Frage nach den Umweltfaktoren, welche eine Erkrankung in genetisch prädisponierten Individuen auslösen kann (Inglese, 2006). Ein möglicher Umweltfaktor, der an der Pathogenese der MS beteiligt sein könnte, ist das Mikrobiom des Darms (Chen and Ten Dijke, 2016). In RRMS-Patienten finden sich weniger

Bacteroidetes- (Chen and Ten Dijke, 2016) und weniger *Clostridiales*-Stämme im Vergleich mit gesunden Kontrollpatienten (Miyake and Yamamura, 2018). Interessanterweise unterstützen *Chlostridium*-Stämme die Sekretion von TGF- β und sorgen für die Expansion von CD4⁺FoxP3⁺ regulatorischen T-Zellen. Die Differenzierung naiver T-Zellen durch TGF- β fördert hauptsächlich die Entwicklung von regulatorischen T-Zellen (Chen et al., 2003). Zusammen mit IL-6 oder IL-1 β werden bevorzugt Th17-Zellen gebildet (Mangan et al., 2006). Inhibiert Smad7 den TGF- β -Signalweg kommt es zur Entstehung inflammatorischer Th1-Zellen (Kleiter et al., 2010). Werden *Chlostridium*-Stämme oral verabreicht, kann einer Verbesserung klinischer Symptome im Mausmodell der Colitis erreicht werden (Atarashi et al., 2011). Im Umkehrschluss geht die Minderung der FoxP3⁺ und IL-17⁺-Zellen in MS-Patienten und die Inhibition des TGF- β -Signalwegs einher mit einer gesteigerten Smad7-Expression (Ando et al., 2007).

Im Mausmodell konnten Lee und Kollegen erhöhte Mengen regulatorischer T-Zellen und eine reduzierte IL-17-Sekretion in keimfrei gezüchteten EAE-Mäusen feststellen. Diese Mäuse zeigten eine weniger starke EAE und weniger ZNS-Infiltrationen im Vergleich zu Mäusen, welche unter spezifisch pathogenfreien Bedingungen (SPF) gezüchtet wurden (Lee et al., 2011). Beide Studien zuvor nutzen Mäuse unter kontrollierten Bedingungen und eingeschränkten Mikrobiom-Konditionen. Im adoptiven Transfer von MOG autoreaktiven T-Zellen konnte in dieser Arbeit ebenfalls eine Protektion durch die Eradikation des nicht-restringiertes Mikrobioms im Darm gezeigt werden.

Im OSE-Modell mit Smad7-Überexpression wurde eine gesteigerte Frequenz regulatorischer T-Zellen und Th17-Zellen beobachtet. Das daraus resultierende Ausbleiben der Rückenmarksinfiltrationen führt zur Protektion gegenüber der OSE. Einhergehend war die Expression von FoxP3 und IL-17 in der intestinalen Mukosa von MS-Patienten im Vergleich zu den Kontrollen signifikant reduziert. Unsere Untersuchung hat sich auf retrospektive Patientenproben erstreckt, einige davon wiesen eine Reihe von gastrointestinalen Symptomen auf, wodurch die Biopsie überhaupt ermöglicht wurde. Aufgrund der zurückliegenden Entnahme der Biopsien konnten keine Informationen bezüglich der Zusammensetzung des Mikrobiom erhoben werden, Stuhlproben standen nicht zur Verfügung.

Obwohl keine Informationen über das Mikrobiom unserer Patienten vorlag, konnten wir trotzdem eine reduzierte Expression von FoxP3 im intestinalen Gewebe der MS-Patienten im Vergleich zu den Kontrollen nachweisen. Der Einfluss des Mikrobioms auf die T-Zell-Differenzierung und insbesondere regulatorische T-Zellen konnte zuvor in vielen Arbeiten gezeigt werden (Atarashi et al., 2011, Ivanov et al., 2009, Ivanov et al., 2008, Lee et al., 2011, Ochoa-Reparaz et al., 2009).

Die Eradikation des Mikrobioms mit Antibiotikum als prophylaktische Behandlung vor der Induktion einer AT-EAE führte zur Protektion gegenüber Krankheitssymptomen. Das Mikrobiom wird bei der Eradikation nur temporär reduziert und nicht entfernt, sodass hier eine vergleichende Untersuchung hinsichtlich der eradizierten gegen nicht-eradizierten Tiere Aufschluss über einen möglichen mikrobiellen Induktor geben kann. So zeigt sich beispielweise eine direkte anti-proliferative Wirkung von Medikationen wie z.B. Minozyklin auf T-Zellen *in vitro* (Faissner et al., 2018). Unvermittelter jedoch ist die Modulation des Darm-Immunsystems durch das Mikrobiom und dessen Stoffwechselprodukte wie etwa Propionsäure und folgend die Aufregulation von Tregs (Haghikia et al., 2015). Problematisch ist jedoch nach wie vor die konkrete Aufschlüsselung der Phylogenie des Mikrobioms (Weinstock, 2012). So ist es besonders schwer anaerobe Bakterien zu identifizieren und zu kultivieren, da der Kontakt mit Luftsauerstoff bereits zu deren Tod führt (Browne et al., 2016). Anaerobe Bakterien machen etwa 50% des Mikrobioms aus (Guarner and Malagelada, 2003). Interessanterweise konnte vor kurzem gezeigt werden, dass die Antibiotikabehandlung während der EAE zu einer verminderten Frequenz von CCR9⁺CD4⁺ Gedächtnis-T-Zellen im Blut und einer Verbesserung des klinischen Scores führt. Darüber hinaus konnten CCR9⁺CD4⁺ Gedächtnis-T-Zellen im Liquor von Patienten mit SPMS gefunden werden. Diese T-Zellen wiesen einen inflammatorischen, IFN γ and IL-17-sekretierenden Phänotyp auf. Gesunde Kontrollen zeigen hingegen einen anti-inflammatorischen LAG-3⁺ T-Zelltyp (Kadowaki et al., 2019).

5.3 Smad7 und Adoptiver Transfer

Ein weiterer wichtiger Faktor dieser Arbeit stellt der Adoptive Transfer dar. Mit Retinsäure wurden die Rezeptoren $\alpha 4\beta 7$ und CCR9 in T-Zellen aufreguliert, um nach Applikation in den Darm zu migrieren (Bono et al., 2016). Dieses Experiment konnte sowohl mit Darm-ständigen Zellen als auch mit sekundären lymphatischen Organen

gezeigt werden. Th1, Th17 und Tregs reagieren unterschiedlich mit der Expression von $\alpha 4\beta 7$ und CCR9 auf die Stimulation mit Retinsäure. In dieser Arbeit wurde jedoch nicht die für Retinsäure anfällige Treg/Th17-Balance berücksichtigt (Abdelhamid and Luo, 2018, Oliveira et al., 2018).

Die Fluoreszenz-basierte Markierung der T-Zellen ist eine artifizielle Methode um einen Migrationsweg darzustellen. Eine effektivere und isoliertere Alternative wäre stattdessen eine Licht-basierte Aktivierung von Fluoreszenzproteinen in T-Zellen mittels Endoskopie und würde damit ebenfalls Nebeneffekte durch die Retinsäure-Behandlung ausschließen (Morton et al., 2014). Die verwendete GFP-Aktivierung in T-Zellen diente in dieser Arbeit ausschließlich als stabile Markierung für die adoptiv transferierten T-Zellen, da die Markierung mittels CFSE zwar möglich war, aber die Fluoreszenz-Intensität limitiert ist. So war dieses Modell auch nicht in der Lage, die GFP gestützte Aktivierung in T-Zellen an der Darmmukosa darzustellen, da bereits bei der ex vivo-Stimulation eine GFP-Expression induziert wurde (Ashouri and Weiss, 2017).

Die Migration aktivierter T-Zellen vom Darm in das ZNS konnte jedoch in dieser Arbeit gezeigt werden. Ob diese Zellen auch, wie in vorangegangenen Arbeiten von Odoardi beschrieben, in die Lunge migrieren und dort für die Einwanderung ins ZNS lizenziert werden, muss in weiteren Experimenten thematisiert werden (Odoardi et al., 2012). Darm-ständige T-Zellen können nach Aktivierung durch die reduzierte Expression von Darm-Homing-Rezeptoren, z.B. $\alpha 4\beta 7$, CCR6 oder CCR9, hauptsächlich über den Blutstrom in das ZNS migrieren und könnten daher durchaus auch andere Grenzflächen, wie die Lunge, erreichen (Stanisavljevic et al., 2017, Schlager et al., 2016, Birnbaum and van Ness, 1992).

Interessanterweise funktioniert die Induktion der EAE in Th-Tieren ausschließlich durch den adoptiven Transfer. OSE-Tiere zeigten während der Erkrankung eine unterschiedliche Sekretionen von IgG1, IgG2a und IgM in Abhängigkeit von der Smad7-Expression in T-Zellen. Möglicherweise beeinflussen T-Zellen einerseits in B-Zellen ein Isotyp-Wechsel und andererseits die B-Zell-abhängige Reifung (Murphy and Weaver)

Der Vergleich von OSE- und Smad7-deletierten OSE-Mäusen führte in einer Vielzahl von Untersuchungen zu vergleichbaren Frequenzen immunologischer T-Zell-Polarisierung. Da Smad7-deletierte OSE-Mäuse jedoch eine Protektion während der

AT-EAE zeigen, wird deutlich, dass weitere Mechanismen, wie z.B. schon mit der Proliferation/Suppression im Darm gezeigt, überprüft werden müssen.

5.4 Die Rolle von Smad7 in der Multiplen Sklerose

Bisherige Untersuchungen haben die Gewebeexpression von Smad7, dem intrazellulären Inhibitor des TGF- β -Signalwegs, oft mit Autoimmunerkrankungen assoziiert. Einerseits ist eine verminderte Expression von Smad7, begleitet durch eine gesteigerte Phosphorylierung von Smad2 und Smad3, in Patienten mit Sklerodermie *in vivo* und *in vitro* charakterisiert (Dong et al., 2002), andererseits konnte eine gesteigerte Expression von Smad7 im Darmgewebe von IBD-Patienten gefunden werden (Monteleone et al., 2001). Es wurde gezeigt, dass Smad7 auch in experimentellen Modellen von autoimmunen ZNS-Entzündungen beteiligt ist (Kleiter et al., 2007, Kleiter et al., 2010, Lukas et al., 2017). Mäuse mit transgener Überexpression von Smad7 in T-Zellen zeigen einen deutlich verschlechterten Verlauf der EAE (Kleiter et al., 2010), wohingegen die Deletion von Smad7 in dendritischen Zellen zur Resistenz gegenüber der EAE aufgrund der Expansion regulatorischer T-Zellen, führt (Lukas et al., 2017). Einhergehend zeigen MS-Patienten mit einem Erkrankungsschub im Vergleich zu gesunden Kontrollen eine Aufregulation von Smad7 in CD4⁺ T-Zellen aus dem Blut. (Kleiter et al., 2010).

Wir analysierten die Expression von Smad7 und andere T-Zell-Differenzierungsmarker im Darmgewebe von MS-Patienten und gesunden Kontrollen. Im Vergleich zu den Kontrollen, konnten wir trotz fehlender signifikanter Unterschiede eine erhöhte Expression von Smad7 in der Darmmukosa von MS-Patienten finden. Eine Erhöhung des Smad7-Spiegels würde in Übereinstimmung mit der beschriebenen Erhöhung von Smad7-Expression im EAE-Modell stehen (Kleiter et al., 2010).

Das Darmgewebe von IBD-Patienten ist charakterisiert durch eine signifikante Erhöhung des Smad7-Spiegels und signifikant reduzierte Phosphorylierung von Smad3. Die Inhibition von Smad7 durch orale Gabe von Antisense-Oligonukleotiden konnte diese Balance wieder hergestellt werden (Monteleone et al., 2001). Smad7 inhibiert den TGF- β Signalweg auf Rezeptorebene wodurch die Phosphorylierung und Aktivierung von Smad2/3 verhindert und die Genexpression beeinflusst wird (Nakao

et al., 2002, Nakao et al., 1997), (Zhang et al., 2007). TGF- β wiederum, ist kritisch für die Konversion naiver T-Zellen durch FoxP3-induzierte Differenzierung in regulatorische T-Zellen (Chen et al., 2003). Dagegen inhibiert die Expression von Smad7 die Entstehung von FoxP3⁺ regulatorischen T-Zellen (Dominitzki et al., 2007). Weiter konnte gezeigt werden, dass TGF- β die Differenzierung von Th17-Zellen unterstützt (Mangan et al., 2006).

In dieser Studie konnten erhöhte Frequenzen von pSmad2/3⁺, FoxP3⁺ und IL-17⁺ Lamina propria Zellen im Vergleich zu den Kontrollen festgestellt werden. Dies ist konsistent mit dem reziprok veränderten Expressionslevel von Smad7. Gleichmaßen konnten Kleiter und Kollegen eine starke, pSmad2 induzierte, Expression von FoxP3 und TGF- β 1 in Smad7 defizienten T-Zellen finden (Kleiter et al., 2010). Eine Smad7-Überexpression in T-Zellen führt in der EAE zu reduzierten Th17 spezifischen Transkripten, z.B. IL-17A und IL-17F und weniger Th17, aber mehr Th1-Zellen, im Gegensatz Smad7-deletierten CD4⁺-Zellen (Kleiter et al., 2010). Durch die gezeigten Expressionsunterschiede von pSmad2/3, FoxP3 und IL-17 können wir eine durch Smad7 mediierte Veränderung der T-Zell-Differenzierung in MS-Patienten vermuten. Damit einhergehend, zeigen unsere Studien eine Erhöhung INF- γ ⁺ T-Zellen im Darmgewebe von MS-Patienten im Vergleich mit gesunden Kontrollen.

Interessanterweise konnten wir vergleichbare CD4⁺-Zellzahlen und dabei jedoch ein erhöhtes Expressionslevel von Smad7, wenn auch nicht signifikant, finden. Kleiter und Kollegen detektierten eine erhöhte Anzahl von T-Zellen in Läsionen im ZNS während der akuten EAE (Kleiter et al., 2010). Die Deletion von Smad7 in dendritischen Zellen führt zur Resistenz gegenüber der EAE und zu einer deutlich geminderten Anzahl infiltrierender CD4⁺ T-Zellen ins ZNS im Vergleich zu Kontrolltieren mit Smad7-Deletion (Lukas et al., 2017). Die inverse Korrelation von CD4⁺ und Smad7⁺ ist möglicherweise durch die fehlende Unterscheidung in aktive und inaktive MS zu begründen und bedarf noch weiterer Untersuchung.

5.5 Limitation in Maus und Mensch

In dieser Arbeit existieren einige Limitationen. Das Modell der spontanen Enzephalomyelitis (OSE) ist eine genetische Kombination von MOG₃₅₋₅₅ erkennenden T- und B-Zellen mit hoher Dichte autoreaktiver Zellen und ist in MS-Patienten in

dieser Kombination nicht beschrieben (Krishnamoorthy et al., 2006). Zusätzlich beeinflusst die genetische Manipulation von Smad7 die Balance der T-Zell-Differenzierung per se in Richtung inflammatorischer Th1-Zellen. Verstärkt wird die Th1-Antwort außerdem noch durch den C57BL/6 Hintergrund (Sellers et al., 2012). Als Konsequenz ist es unwahrscheinlich, dass MS-Patienten exakt diese Kombination an genetischen Dysregulationen aufweist, wie dies in unserem Modell zur Induktion der Erkrankung führt, so dass sich keine unmittelbare Übertragbarkeit auf den Menschen ergibt. Weiter ist das Mikrobiom des Darms ein determinierender Faktor für das Darm-Immunsystem, das sich jedoch zwischen Maus und Mensch deutlich in der Komposition unterscheidet und (Hugenholtz and de Vos, 2018); dies sollte in weiterführenden Untersuchungen einbezogen werden (Berer et al., 2017).

Ein weiterer Nachteil ist die geringe Anzahl verfügbarer humaner Biopsien der MS-Patienten im gewählten retrospektiven Ansatz, was möglicherweise der Grund für die fehlende statistische Signifikanz der erhöhten Smad7-Expression ist. Wie wir in der Aufschlüsselung der Darmabschnitte zeigen konnten, finden sich v.a. in den Abschnitten des Dünndarms Unterschiede in den T-Zell-Markern. Aufgrund der limitierten Anzahl der Darmbiopsien konnten keine Rücksicht auf die Position der Entnahme gelegt werden, so dass hauptsächlich Biopsien des Dickdarms in die Studie aufgenommen wurden. Die Färbungen der beschriebenen Marker sind Einzelfärbungen und lassen daher nur einen ersten Eindruck des Smad7/-T-Zell abhängigen Immunsystems des Darms zu.

Für die translationalen Untersuchungen der Darmbiopsien von MS-Patienten und gesunden Kontrollen sollte zukünftig eine größere Anzahl von Geweben prospektiv untersucht werden. Bei den Einschlusskriterien sollten außerdem auf die Entnahmeposition, Stadium der MS, Geschlecht und Herkunft geachtet werden. Zusätzlich sollten Biopsien aus dem Dünndarm untersucht werden, da im OSE-Modell die größte Veränderung im Jejunum und Ileum, dem Dünndarm, gefunden wurden. Weiter sollten die vorhandenen Biopsien gegen T-Zellen und zusätzlich gegen die intrazellulären Proteine, wie Smad7 oder INF γ gefärbt werden, um die gemessenen Veränderungen tatsächlich auch T-Zellen zuzuordnen.

5.6 Zusammenfassung und Ausblick

Die Überexpression von Smad7 in T-Zellen führt zu einer fulminanten EAE und die Deletion von Smad7 in T-Zellen zu einer abgemilderten Form und weitgehenden Protektion gegenüber klinischen Symptomen (Kleiter et al., 2010). Die Expression von Smad7 in T-Zellen reguliert im Darmmikrobiom-induzierten OSE-Modell die Entzündungsreaktion des ZNS. Der Darm wurde zuvor bereits als Organ möglicher Induktion des Autoimmunprozesses bei der MS beschreiben (Berer et al., 2018, Haghikia et al., 2015). Montelone und Kollegen zeigten, dass die Inflammation in Morbus Crohn-Patienten im Darm durch eine fehlerhafte Sekretion von TGF- β und damit einhergehend eine Fehlregulation von Smad7 in T-Zellen bedingt ist (Monteleone and Pallone, 2015, Fantini et al., 2009, Dominitzki et al., 2007). Eine Modulation mit künstlich erzeugten Smad7 Antisense-Molekülen sorgte für eine vielversprechende Reduktion klinischer Symptome und zu einer Reetablierung anti-entzündlicher regulatorischer T-Zellen, wobei die primären Ziele in einer kürzlich abgeschlossenen klinischen Phase III Studien nicht erreicht wurden (Marafini et al., 2017, Sedda et al., 2015, Monteleone et al., 2012, Feagan et al., 2018).

In unserem Mausmodell haben wir gezeigt, dass die Induktion der OSE vom Mikrobiom abhängig ist und durch die Expression von Smad7 in T-Zellen reguliert wird. Die Polarisierung der T-Zellen ist durch die Expression von Smad7 beeinflusst, so dass hauptsächlich Th1-Zellen durch Smad7-Überexpression und regulatorische T-Zellen durch die Smad7-Ablation differenziert werden. Im Darm ist der Einfluss suppressiver Mechanismen durch Dendritische Zellen und regulatorische T-Zellen auf autoreaktive T-Zellen vom Smad7-Expressionslevel abhängig. Je mehr Smad7 exprimiert wird, desto weniger responsiv sind autoreaktive T-Zellen *in vitro* und *in vivo*. Der adoptive Transfer Fluoreszenz-markierter T-Zellen verifiziert einerseits die Induktion durch den Darm und andererseits zeigt dieser die Beteiligung markierter T-Zellen an der Bildung entzündlicher Infiltrate im ZNS. Die Biopsien der MS-Patienten zeigen eine veränderte TGF- β /Smad7-Achse in der Lamina propria. Die humanen Ergebnisse und die erhobenen Daten aus OSE-Tieren mit Smad7-Überexpression zeigen vergleichbare Veränderungen, wodurch die Vermutung einer Fehlregulation von Smad7 im Darm während der MS bekräftigt wird.

Da die Blut-Hirn-Schranke während des AT nur durch die Injektion in Th-Tiere überwunden werden konnte, sollte ein Versuch zur Rolle von B-Zellen im OSE-Modell durchgeführt werden. Neben der Charakterisierung der B-Zellen könnten auch erste Einblicke durch die Ablation von B-Zellen während der OSE mittels des monoklonalen α CD20-Antikörpers Rituximab gewonnen werden. Zudem wäre die Aufschlüsselung der mikrobiellen Induktoren im Darm von großem Wert für das Verständnis des autoimmunen Prozesses bei MS. Weiter sollte die Rolle von Smad7 in Darm-T-Zellen während der OSE charakterisiert werden und die differenzielle Expression von Smad7 in T-Zellen durch eine orale Gabe, z.B. von Smad7-Antisense-Molekülen moduliert werden. Für Morbus Crohn bereits getestet, könnten Smad7-Antisense-Moleküle zu einer unterstützenden Therapie bei der Behandlung von MS-Patienten werden. Der Vergleich zwischen Darmmukosa-Biopsien von MS-Patienten und der immunologischen Beschaffenheit des Darms in Smad7-überexprimierenden Tieren lässt vermuten, dass die TGF- β /Smad7-Balance in ähnlicher Weise fehlreguliert ist und stellt damit ein lohnenswertes Ziel für therapeutische Interventionen dar.

Danksagung

Zuerst möchte ich herzlich meinem Betreuer Prof. Dr. med. Ingo Kleiter für die Möglichkeit der Dissertation und die Zeit, die er aufgebracht hat um meine Fragen, Sorgen und Ideen stets in Ruhe zu beantworten, danken.

Weiter möchte ich gerne Prof. Dr. rer. nat. Charlotte Esser und Herrn Prof. Dr. rer. nat. Dieter Willbold danken, die mir immer mit gutem Rat zur Seite standen und mir die Promotion ermöglicht und begleitet haben. Außerdem möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Ralf Gold bedanken.

Ein besonderer Dank gilt außerdem Herrn Jun. Prof. Dr. Simon Faissner, der mir mit viel Vertrauen und Enthusiasmus meine Arbeit verfolgt und mich stets bestärkt hat.

Ich möchte allen Mitarbeitern des neuroimmunologischen Labors, insbesondere bei Judith, Sarah und Teresa, für die gute Arbeitsatmosphäre und Hilfe bedanken. Außerdem danke ich Frau Prof. Dr. med. Tannapfel und dem Institut für Pathologie für die nette Kooperation.

Ein Dank an die Kooperationspartner Prof. Dr. med. Luisa Klotz, Prof. Dr. rer. nat. Tobias Bopp, Dr. med. Massimo C. Fantini und Dr. rer. nat. Gurumoorthy Krishnamoorthy für die Bereitstellung der experimentellen Modelle und Methoden.

Zuletzt möchte ich meiner Familie und Freunden für die unermüdliche Unterstützung und Liebe bedanken.

Referenzen

- ABBOTT, N. J., PATABENDIGE, A. A., DOLMAN, D. E., YUSOF, S. R. & BEGLEY, D. J. 2010. Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiol Dis*, 37, 13-25.
- ABDELHAMID, L. & LUO, X. M. 2018. Retinoic Acid, Leaky Gut, and Autoimmune Diseases. *Nutrients*, 10.
- ANDO, T., HATSUSHIKA, K., WAKO, M., OHBA, T., KOYAMA, K., OHNUMA, Y., KATOH, R., OGAWA, H., OKUMURA, K., LUO, J., WYSS-CORAY, T. & NAKAO, A. 2007. Orally administered TGF-beta is biologically active in the intestinal mucosa and enhances oral tolerance. *J Allergy Clin Immunol*, 120, 916-23.
- ANNUNZIATO, F., COSMI, L., LIOTTA, F., LAZZERI, E., MANETTI, R., VANINI, V., ROMAGNANI, P., MAGGI, E. & ROMAGNANI, S. 2002. Phenotype, localization, and mechanism of suppression of CD4(+)CD25(+) human thymocytes. *J Exp Med*, 196, 379-87.
- ANTHONY, R. M., RUTITZKY, L. I., URBAN, J. F., JR., STADECKER, M. J. & GAUSE, W. C. 2007. Protective immune mechanisms in helminth infection. *Nat Rev Immunol*, 7, 975-87.
- ARDIZZONE, S. & BIANCHI PORRO, G. 2005. Biologic therapy for inflammatory bowel disease. *Drugs*, 65, 2253-86.
- ASHOURI, J. F. & WEISS, A. 2017. Endogenous Nur77 Is a Specific Indicator of Antigen Receptor Signaling in Human T and B Cells. *J Immunol*, 198, 657-668.
- ATARASHI, K., TANOUE, T., SHIMA, T., IMAOKA, A., KUWAHARA, T., MOMOSE, Y., CHENG, G., YAMASAKI, S., SAITO, T., OHBA, Y., TANIGUCHI, T., TAKEDA, K., HORI, S., IVANOV, II, UMESAKI, Y., ITOH, K. & HONDA, K. 2011. Induction of colonic regulatory T cells by indigenous Clostridium species. *Science*, 331, 337-41.
- BAKDASH, G., VOGELPOEL, L. T., VAN CAPEL, T. M., KAPSENBERG, M. L. & DE JONG, E. C. 2015. Retinoic acid primes human dendritic cells to induce gut-homing, IL-10-producing regulatory T cells. *Mucosal Immunol*, 8, 265-78.
- BANWELL, B., GHEZZI, A., BAR-OR, A., MIKAELOFF, Y. & TARDIEU, M. 2007. Multiple sclerosis in children: clinical diagnosis, therapeutic strategies, and future directions. *Lancet Neurol*, 6, 887-902.
- BELKAID, Y. & HAND, T. W. 2014. Role of the microbiota in immunity and inflammation. *Cell*, 157, 121-41.
- BENNETT, C. L., CHRISTIE, J., RAMSDELL, F., BRUNKOW, M. E., FERGUSON, P. J., WHITESSELL, L., KELLY, T. E., SAULSBURY, F. T., CHANCE, P. F. & OCHS, H. D. 2001. The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat Genet*, 27, 20-1.
- BERER, K., GERDES, L. A., CEKANAVICIUTE, E., JIA, X., XIAO, L., XIA, Z., LIU, C., KLOTZ, L., STAUFFER, U., BARANZINI, S. E., KUMPFEL, T., HOHLFELD, R., KRISHNAMOORTHY, G. & WEKERLE, H. 2017. Gut microbiota from multiple sclerosis patients enables spontaneous autoimmune encephalomyelitis in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 114, 10719-10724.
- BERER, K., MARTINEZ, I., WALKER, A., KUNKEL, B., SCHMITT-KOPPLIN, P., WALTER, J. & KRISHNAMOORTHY, G. 2018. Dietary non-fermentable fiber prevents autoimmune neurological disease by changing gut metabolic and immune status. *Sci Rep*, 8, 10431.
- BERER, K., MUES, M., KOUTROLOS, M., RASBI, Z. A., BOZIKI, M., JOHNER, C., WEKERLE, H. & KRISHNAMOORTHY, G. 2011. Commensal microbiota and myelin autoantigen cooperate to trigger autoimmune demyelination. *Nature*, 479, 538-41.
- BETTELLI, E., PAGANY, M., WEINER, H. L., LININGTON, C., SOBEL, R. A. & KUCHROO, V. K. 2003. Myelin oligodendrocyte glycoprotein-specific T cell receptor transgenic mice develop spontaneous autoimmune optic neuritis. *J Exp Med*, 197, 1073-81.

- BIANCHERI, P., GIUFFRIDA, P., DOCENA, G. H., MACDONALD, T. T., CORAZZA, G. R. & DI SABATINO, A. 2014. The role of transforming growth factor (TGF)-beta in modulating the immune response and fibrogenesis in the gut. *Cytokine Growth Factor Rev*, 25, 45-55.
- BIRNBAUM, G. & VAN NESS, B. 1992. Quantitation of T-cell receptor V beta chain expression on lymphocytes from blood, brain, and spinal fluid in patients with multiple sclerosis and other neurological diseases. *Ann Neurol*, 32, 24-30.
- BONO, M. R., TEJON, G., FLORES-SANTIBANEZ, F., FERNANDEZ, D., ROSEMBLATT, M. & SAUMA, D. 2016. Retinoic Acid as a Modulator of T Cell Immunity. *Nutrients*, 8.
- BOPP, T., JONULEIT, H. & SCHMITT, E. 2007. Regulatory T cells--the renaissance of the suppressor T cells. *Ann Med*, 39, 322-34.
- BRANISTE, V., AL-ASMAKH, M., KOWAL, C., ANUAR, F., ABBASPOUR, A., TOTH, M., KORECKA, A., BAKOCEVIC, N., NG, L. G., KUNDU, P., GULYAS, B., HALLDIN, C., HULTENBY, K., NILSSON, H., HEBERT, H., VOLPE, B. T., DIAMOND, B. & PETTERSSON, S. 2014. The gut microbiota influences blood-brain barrier permeability in mice. *Sci Transl Med*, 6, 263ra158.
- BRINKMAN, C. C., PESKE, J. D. & ENGELHARD, V. H. 2013. Peripheral tissue homing receptor control of naive, effector, and memory CD8 T cell localization in lymphoid and non-lymphoid tissues. *Front Immunol*, 4, 241.
- BRONNUM-HANSEN, H., KOCH-HENRIKSEN, N. & STENAGER, E. 2004. Trends in survival and cause of death in Danish patients with multiple sclerosis. *Brain*, 127, 844-50.
- BROWNE, H. P., FORSTER, S. C., ANONYE, B. O., KUMAR, N., NEVILLE, B. A., STARES, M. D., GOULDING, D. & LAWLEY, T. D. 2016. Culturing of 'unculturable' human microbiota reveals novel taxa and extensive sporulation. *Nature*, 533, 543-546.
- BROWNE, P., CHANDRARATNA, D., ANGOOD, C., TREMLETT, H., BAKER, C., TAYLOR, B. V. & THOMPSON, A. J. 2014. Atlas of Multiple Sclerosis 2013: A growing global problem with widespread inequity. *Neurology*, 83, 1022-4.
- BRUNKOW, M. E., JEFFERY, E. W., HJERRILD, K. A., PAEPER, B., CLARK, L. B., YASAYKO, S. A., WILKINSON, J. E., GALAS, D., ZIEGLER, S. F. & RAMSDELL, F. 2001. Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfy, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat Genet*, 27, 68-73.
- CAMPBELL, A. W. 2014. Autoimmunity and the gut. *Autoimmune Dis*, 2014, 152428.
- CANNELLA, B. & RAINE, C. S. 1995. The adhesion molecule and cytokine profile of multiple sclerosis lesions. *Ann Neurol*, 37, 424-35.
- CASSANI, B., VILLABLANCA, E. J., QUINTANA, F. J., LOVE, P. E., LACY-HULBERT, A., BLANER, W. S., SPARWASSER, T., SNAPPER, S. B., WEINER, H. L. & MORA, J. R. 2011. Gut-tropic T cells that express integrin alpha4beta7 and CCR9 are required for induction of oral immune tolerance in mice. *Gastroenterology*, 141, 2109-18.
- CHEN, J., CHIA, N., KALARI, K. R., YAO, J. Z., NOVOTNA, M., PAZ SOLDAN, M. M., LUCKEY, D. H., MARIETTA, E. V., JERALDO, P. R., CHEN, X., WEINSHENKER, B. G., RODRIGUEZ, M., KANTARCI, O. H., NELSON, H., MURRAY, J. A. & MANGALAM, A. K. 2016. Multiple sclerosis patients have a distinct gut microbiota compared to healthy controls. *Sci Rep*, 6, 28484.
- CHEN, W., JIN, W., HARDEGEN, N., LEI, K. J., LI, L., MARINOS, N., MCGRADY, G. & WAHL, S. M. 2003. Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med*, 198, 1875-86.
- CHEN, W. & TEN DIJKE, P. 2016. Immunoregulation by members of the TGFbeta superfamily. *Nat Rev Immunol*, 16, 723-740.
- CHEN, Y., LANGRISH, C. L., MCKENZIE, B., JOYCE-SHAIKH, B., STUMHOFER, J. S., MCCLANAHAN, T., BLUMENSCHNEIN, W., CHURAKOVSA, T., LOW, J., PRESTA, L., HUNTER, C. A., KASTELEIN, R. A. & CUA, D. J. 2006. Anti-IL-23 therapy inhibits

- multiple inflammatory pathways and ameliorates autoimmune encephalomyelitis. *J Clin Invest*, 116, 1317-26.
- COMPSTON, A. & COLES, A. 2008. Multiple sclerosis. *Lancet*, 372, 1502-17.
- CONFAVREUX, C., AIMARD, G. & DEVIC, M. 1980. Course and prognosis of multiple sclerosis assessed by the computerized data processing of 349 patients. *Brain*, 103, 281-300.
- CONSTANTINESCU, C. S., FAROOQI, N., O'BRIEN, K. & GRAN, B. 2011. Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) as a model for multiple sclerosis (MS). *Br J Pharmacol*, 164, 1079-106.
- CONTI, H. R., SHEN, F., NAYYAR, N., STOCUM, E., SUN, J. N., LINDEMANN, M. J., HO, A. W., HAI, J. H., YU, J. J., JUNG, J. W., FILLER, S. G., MASSO-WELCH, P., EDGERTON, M. & GAFFEN, S. L. 2009. Th17 cells and IL-17 receptor signaling are essential for mucosal host defense against oral candidiasis. *J Exp Med*, 206, 299-311.
- COOMBES, J. L. & POWRIE, F. 2008. Dendritic cells in intestinal immune regulation. *Nat Rev Immunol*, 8, 435-46.
- CORREALE, J. & FAREZ, M. 2007. Association between parasite infection and immune responses in multiple sclerosis. *Ann Neurol*, 61, 97-108.
- COUTINHO, A., CARAMALHO, I., SEIXAS, E. & DEMENGEOT, J. 2005. Thymic commitment of regulatory T cells is a pathway of TCR-dependent selection that isolates repertoires undergoing positive or negative selection. *Curr Top Microbiol Immunol*, 293, 43-71.
- DE FILIPPO, C., CAVALIERI, D., DI PAOLA, M., RAMAZZOTTI, M., POULLET, J. B., MASSART, S., COLLINI, S., PIERACCINI, G. & LIONETTI, P. 2010. Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, 14691-6.
- DENNLER, S., GOUMANS, M. J. & TEN DIJKE, P. 2002. Transforming growth factor beta signal transduction. *J Leukoc Biol*, 71, 731-40.
- DOMINITZKI, S., FANTINI, M. C., NEUFERT, C., NIKOLAEV, A., GALLE, P. R., SCHELLER, J., MONTELEONE, G., ROSE-JOHN, S., NEURATH, M. F. & BECKER, C. 2007. Cutting edge: trans-signaling via the soluble IL-6R abrogates the induction of FoxP3 in naive CD4+CD25 T cells. *J Immunol*, 179, 2041-5.
- DONG, C., ZHU, S., WANG, T., YOON, W., LI, Z., ALVAREZ, R. J., TEN DIJKE, P., WHITE, B., WIGLEY, F. M. & GOLDSCHMIDT-CLERMONT, P. J. 2002. Deficient Smad7 expression: a putative molecular defect in scleroderma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 3908-13.
- EBISAWA, T., FUKUCHI, M., MURAKAMI, G., CHIBA, T., TANAKA, K., IMAMURA, T. & MIYAZONO, K. 2001. Smurf1 interacts with transforming growth factor-beta type I receptor through Smad7 and induces receptor degradation. *J Biol Chem*, 276, 12477-80.
- ESPLUGUES, E., HUBER, S., GAGLIANI, N., HAUSER, A. E., TOWN, T., WAN, Y. Y., O'CONNOR, W., JR., RONGVAUX, A., VAN ROOIJEN, N., HABERMAN, A. M., IWAKURA, Y., KUCHROO, V. K., KOLLS, J. K., BLUESTONE, J. A., HEROLD, K. C. & FLAVELL, R. A. 2011. Control of TH17 cells occurs in the small intestine. *Nature*, 475, 514-8.
- FAHLEN, L., READ, S., GORELIK, L., HURST, S. D., COFFMAN, R. L., FLAVELL, R. A. & POWRIE, F. 2005. T cells that cannot respond to TGF-beta escape control by CD4(+)/CD25(+) regulatory T cells. *J Exp Med*, 201, 737-46.
- FAISSNER, S., MAHJOUB, Y., MISHRA, M., HAUPELTSHOFER, S., HAHN, J. N., GOLD, R., KOCH, M., METZ, L. M., BEN-HUR, T. & YONG, V. W. 2018. Unexpected additive effects of minocycline and hydroxychloroquine in models of multiple sclerosis: Prospective combination treatment for progressive disease? *Mult Scler*, 24, 1543-1556.
- FANTINI, M. C., RIZZO, A., FINA, D., CARUSO, R., SARRA, M., STOLFI, C., BECKER, C., MACDONALD, T. T., PALLONE, F., NEURATH, M. F. & MONTELEONE, G. 2009. Smad7 controls resistance of colitogenic T cells to regulatory T cell-mediated suppression. *Gastroenterology*, 136, 1308-16, e1-3.

- FATHMAN, C. G. & LINEBERRY, N. B. 2007. Molecular mechanisms of CD4+ T-cell anergy. *Nat Rev Immunol*, 7, 599-609.
- FAULKNER, J. R., HERRMANN, J. E., WOO, M. J., TANSEY, K. E., DOAN, N. B. & SOFRONIEW, M. V. 2004. Reactive astrocytes protect tissue and preserve function after spinal cord injury. *J Neurosci*, 24, 2143-55.
- FEAGAN, B. G., SANDS, B. E., ROSSITER, G., LI, X., USISKIN, K., ZHAN, X. & COLOMBEL, J. F. 2018. Effects of Mongersen (GED-0301) on Endoscopic and Clinical Outcomes in Patients With Active Crohn's Disease. *Gastroenterology*, 154, 61-64 e6.
- FERGUSON, B., MATYSZAK, M. K., ESIRI, M. M. & PERRY, V. H. 1997. Axonal damage in acute multiple sclerosis lesions. *Brain*, 120 (Pt 3), 393-9.
- FILIANO, A. J., GADANI, S. P. & KIPNIS, J. 2015. Interactions of innate and adaptive immunity in brain development and function. *Brain Res*, 1617, 18-27.
- FILIFE-SANTOS, O., BUSTAMANTE, J., HAVERKAMP, M. H., VINOLO, E., KU, C. L., PUEL, A., FRUCHT, D. M., CRISTEL, K., VON BERNUTH, H., JOUANGUY, E., FEINBERG, J., DURANDY, A., SENECHAL, B., CHAPGIER, A., VOGT, G., DE BEAUCOUDREY, L., FIESCHI, C., PICARD, C., GARFA, M., CHEMLI, J., BEJAOU, M., TSOLIA, M. N., KUTUKCULER, N., PLEBANI, A., NOTARANGELO, L., BODEMER, C., GEISSMANN, F., ISRAEL, A., VERON, M., KNACKSTEDT, M., BARBOUCHE, R., ABEL, L., MAGDORF, K., GENDREL, D., AGOU, F., HOLLAND, S. M. & CASANOVA, J. L. 2006. X-linked susceptibility to mycobacteria is caused by mutations in NEMO impairing CD40-dependent IL-12 production. *J Exp Med*, 203, 1745-59.
- FLAHERTY, S. & REYNOLDS, J. M. 2015. Mouse Naive CD4+ T Cell Isolation and In vitro Differentiation into T Cell Subsets. *J Vis Exp*.
- FLECK, A. K., SCHUPPAN, D., WIENDL, H. & KLOTZ, L. 2017. Gut-CNS-Axis as Possibility to Modulate Inflammatory Disease Activity-Implications for Multiple Sclerosis. *Int J Mol Sci*, 18.
- FLETCHER, J. M., LALOR, S. J., SWEENEY, C. M., TUBRIDY, N. & MILLS, K. H. 2010. T cells in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *Clin Exp Immunol*, 162, 1-11.
- GAGLIANI, N., HUBER, S. & FLAVELL, R. A. 2012. The Intestine: where amazing things happen. *Cell Res*, 22, 277-9.
- GHORESCHI, K., LAURENCE, A., YANG, X. P., TATO, C. M., MCGEACHY, M. J., KONKEL, J. E., RAMOS, H. L., WEI, L., DAVIDSON, T. S., BOULADOUX, N., GRAINGER, J. R., CHEN, Q., KANNO, Y., WATFORD, W. T., SUN, H. W., EBERL, G., SHEVACH, E. M., BELKAID, Y., CUA, D. J., CHEN, W. & O'SHEA, J. J. 2010. Generation of pathogenic T(H)17 cells in the absence of TGF-beta signalling. *Nature*, 467, 967-71.
- GOLD, R. & RIECKMANN, P. 2007. [Recent advances in the pathogenesis and immunotherapy of multiple sclerosis]. *Nervenarzt*, 78 Suppl 1, 15-24; quiz 25.
- GOLD, R. & WOLINSKY, J. S. 2011. Pathophysiology of multiple sclerosis and the place of teriflunomide. *Acta Neurol Scand*, 124, 75-84.
- GORELIK, L., CONSTANT, S. & FLAVELL, R. A. 2002. Mechanism of transforming growth factor beta-induced inhibition of T helper type 1 differentiation. *J Exp Med*, 195, 1499-505.
- GORELIK, L., FIELDS, P. E. & FLAVELL, R. A. 2000. Cutting edge: TGF-beta inhibits Th type 2 development through inhibition of GATA-3 expression. *J Immunol*, 165, 4773-7.
- GUARNER, F. & MALAGELADA, J. R. 2003. Gut flora in health and disease. *Lancet*, 361, 512-9.
- HAAK, S., CROXFORD, A. L., KREYMBORG, K., HEPPNER, F. L., POULY, S., BECHER, B. & WAISMAN, A. 2009. IL-17A and IL-17F do not contribute vitally to autoimmune neuro-inflammation in mice. *J Clin Invest*, 119, 61-9.
- HAFLER, D. A. 2004. Multiple sclerosis. *J Clin Invest*, 113, 788-94.

- HAGHIKIA, A., JORG, S., DUSCHA, A., BERG, J., MANZEL, A., WASCHBISCH, A., HAMMER, A., LEE, D. H., MAY, C., WILCK, N., BALOGH, A., OSTERMANN, A. I., SCHEBB, N. H., AKKAD, D. A., GROHME, D. A., KLEINWIETFIELD, M., KEMPA, S., THONE, J., DEMIR, S., MULLER, D. N., GOLD, R. & LINKER, R. A. 2015. Dietary Fatty Acids Directly Impact Central Nervous System Autoimmunity via the Small Intestine. *Immunity*, 43, 817-29.
- HALFVARSON, J., BRISLAWN, C. J., LAMENDELLA, R., VAZQUEZ-BAEZA, Y., WALTERS, W. A., BRAMER, L. M., D'AMATO, M., BONFIGLIO, F., MCDONALD, D., GONZALEZ, A., MCCLURE, E. E., DUNKLEBARGER, M. F., KNIGHT, R. & JANSSON, J. K. 2017. Dynamics of the human gut microbiome in inflammatory bowel disease. *Nat Microbiol*, 2, 17004.
- HASAN, M., NEUMANN, B., HAUPELTSHOFER, S., STAHLKE, S., FANTINI, M. C., ANGSTWURM, K., BOGDAHN, U. & KLEITER, I. 2015. Activation of TGF-beta-induced non-Smad signaling pathways during Th17 differentiation. *Immunol Cell Biol*, 93, 662-72.
- HELD, K., BHONSLE-DEENG, L., SIEWERT, K., SATO, W., BELTRAN, E., SCHMIDT, S., RUHL, G., NG, J. K., ENGERER, P., MOSER, M., KLINKERT, W. E., BABBE, H., MISGELD, T., WEKERLE, H., LAPLAUD, D. A., HOHLFELD, R. & DORNMAIR, K. 2015. alpha-beta T-cell receptors from multiple sclerosis brain lesions show MAIT cell-related features. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*, 2, e107.
- HORI, S., NOMURA, T. & SAKAGUCHI, S. 2003. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science*, 299, 1057-61.
- HUBER, S., GAGLIANI, N., ESPLUGUES, E., O'CONNOR, W., JR., HUBER, F. J., CHAUDHRY, A., KAMANAKA, M., KOBAYASHI, Y., BOOTH, C. J., RUDENSKY, A. Y., RONCAROLO, M. G., BATTAGLIA, M. & FLAVELL, R. A. 2011. Th17 cells express interleukin-10 receptor and are controlled by Foxp3(-) and Foxp3+ regulatory CD4+ T cells in an interleukin-10-dependent manner. *Immunity*, 34, 554-65.
- HUGENHOLTZ, F. & DE VOS, W. M. 2018. Mouse models for human intestinal microbiota research: a critical evaluation. *Cell Mol Life Sci*, 75, 149-160.
- INGLESE, M. 2006. Multiple sclerosis: new insights and trends. *AJNR Am J Neuroradiol*, 27, 954-7.
- ISHIGAME, H., KAKUTA, S., NAGAI, T., KADOKI, M., NAMBU, A., KOMIYAMA, Y., FUJIKADO, N., TANAHASHI, Y., AKITSU, A., KOTAKI, H., SUDO, K., NAKAE, S., SASAKAWA, C. & IWAKURA, Y. 2009. Differential roles of interleukin-17A and -17F in host defense against mucoepithelial bacterial infection and allergic responses. *Immunity*, 30, 108-19.
- IVANOV, II, ATARASHI, K., MANEL, N., BRODIE, E. L., SHIMA, T., KARAOZ, U., WEI, D., GOLDFARB, K. C., SANTEE, C. A., LYNCH, S. V., TANOUE, T., IMAOKA, A., ITOH, K., TAKEDA, K., UMESAKI, Y., HONDA, K. & LITTMAN, D. R. 2009. Induction of intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria. *Cell*, 139, 485-98.
- IVANOV, II, FRUTOS RDE, L., MANEL, N., YOSHINAGA, K., RIFKIN, D. B., SARTOR, R. B., FINLAY, B. B. & LITTMAN, D. R. 2008. Specific microbiota direct the differentiation of IL-17-producing T-helper cells in the mucosa of the small intestine. *Cell Host Microbe*, 4, 337-49.
- IVANOV, II, ZHOU, L. & LITTMAN, D. R. 2007. Transcriptional regulation of Th17 cell differentiation. *Semin Immunol*, 19, 409-17.
- IWAKURA, Y., NAKAE, S., SAIJO, S. & ISHIGAME, H. 2008. The roles of IL-17A in inflammatory immune responses and host defense against pathogens. *Immunol Rev*, 226, 57-79.
- JACOBSEN, M., CEPOK, S., QUAK, E., HAPPEL, M., GABER, R., ZIEGLER, A., SCHOCK, S., OERTEL, W. H., SOMMER, N. & HEMMER, B. 2002. Oligoclonal expansion of memory CD8+ T cells in cerebrospinal fluid from multiple sclerosis patients. *Brain*, 125, 538-50.

- KADOWAKI, A., SAGA, R., LIN, Y., SATO, W. & YAMAMURA, T. 2019. Gut microbiota-dependent CCR9+CD4+ T cells are altered in secondary progressive multiple sclerosis. *Brain*.
- KALEKAR, L. A., SCHMIEL, S. E., NANDIWADA, S. L., LAM, W. Y., BARSNESS, L. O., ZHANG, N., STRITESKY, G. L., MALHOTRA, D., PAUKEN, K. E., LINEHAN, J. L., O'SULLIVAN, M. G., FIFE, B. T., HOGQUIST, K. A., JENKINS, M. K. & MUELLER, D. L. 2016. CD4(+) T cell anergy prevents autoimmunity and generates regulatory T cell precursors. *Nat Immunol*, 17, 304-14.
- KEBIR, H., KREYMBORG, K., IFERGAN, I., DODELET-DEVILLERS, A., CAYROL, R., BERNARD, M., GIULIANI, F., ARBOUR, N., BECHER, B. & PRAT, A. 2007. Human TH17 lymphocytes promote blood-brain barrier disruption and central nervous system inflammation. *Nat Med*, 13, 1173-5.
- KIM, H. J., PAUL, F., LANA-PEIXOTO, M. A., TENEMBAUM, S., ASGARI, N., PALACE, J., KLAWITER, E. C., SATO, D. K., DE SEZE, J., WUERFEL, J., BANWELL, B. L., VILLOSLADA, P., SAIZ, A., FUJIHARA, K., KIM, S. H., GUTHY-JACKSON CHARITABLE FOUNDATION, N. M. O. I. C. C. & BIOREPOSITORY 2015a. MRI characteristics of neuromyelitis optica spectrum disorder: an international update. *Neurology*, 84, 1165-73.
- KIM, M. H., TAPAROWSKY, E. J. & KIM, C. H. 2015b. Retinoic Acid Differentially Regulates the Migration of Innate Lymphoid Cell Subsets to the Gut. *Immunity*, 43, 107-19.
- KIMBROUGH, D. J., FUJIHARA, K., JACOB, A., LANA-PEIXOTO, M. A., LEITE, M. I., LEVY, M., MARIGNIER, R., NAKASHIMA, I., PALACE, J., DE SEZE, J., STUVE, O., TENEMBAUM, S. N., TRABOULSEE, A., WAUBANT, E., WEINSHENKER, B. G., WINGERCHUK, D. M., GJCF, C. C. & BR 2012. Treatment of Neuromyelitis Optica: Review and Recommendations. *Mult Scler Relat Disord*, 1, 180-187.
- KLEINSCHNITZ, C., MEUTH, S. G., KIESEIER, B. C. & WIENDL, H. 2007. Immunotherapeutic approaches in MS: update on pathophysiology and emerging agents or strategies 2006. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*, 7, 35-63.
- KLEITER, I., PEDRE, X., MUELLER, A. M., POESCHL, P., COUILLARD-DESPRES, S., SPRUSS, T., BOGDAHN, U., GIEGERICH, G. & STEINBRECHER, A. 2007. Inhibition of Smad7, a negative regulator of TGF-beta signaling, suppresses autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol*, 187, 61-73.
- KLEITER, I., SONG, J., LUKAS, D., HASAN, M., NEUMANN, B., CROXFORD, A. L., PEDRE, X., HOVELMEYER, N., YOGEV, N., MILDNER, A., PRINZ, M., WIESE, E., REIFENBERG, K., BITTNER, S., WIENDL, H., STEINMAN, L., BECKER, C., BOGDAHN, U., NEURATH, M. F., STEINBRECHER, A. & WAISMAN, A. 2010. Smad7 in T cells drives T helper 1 responses in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain*, 133, 1067-81.
- KNIGHTS, D., SILVERBERG, M. S., WEERSMA, R. K., GEVERS, D., DIJKSTRA, G., HUANG, H., TYLER, A. D., VAN SOMMEREN, S., IMHANN, F., STEMPAK, J. M., HUANG, H., VANGAY, P., AL-GHALITH, G. A., RUSSELL, C., SAUK, J., KNIGHT, J., DALY, M. J., HUTTENHOWER, C. & XAVIER, R. J. 2014. Complex host genetics influence the microbiome in inflammatory bowel disease. *Genome Med*, 6, 107.
- KOCH-HENRIKSEN, N. & SORENSEN, P. S. 2010. The changing demographic pattern of multiple sclerosis epidemiology. *Lancet Neurol*, 9, 520-32.
- KOLE, A. & MALOY, K. J. 2014. Control of intestinal inflammation by interleukin-10. *Curr Top Microbiol Immunol*, 380, 19-38.
- KORN, T., OUKKA, M., KUCHROO, V. & BETTELLI, E. 2007. Th17 cells: effector T cells with inflammatory properties. *Semin Immunol*, 19, 362-71.
- KRISHNAMOORTHY, G., LASSMANN, H., WEKERLE, H. & HOLZ, A. 2006. Spontaneous opticospinal encephalomyelitis in a double-transgenic mouse model of autoimmune T cell/B cell cooperation. *J Clin Invest*, 116, 2385-92.

- KRISHNAMOORTHY, G., SAXENA, A., MARS, L. T., DOMINGUES, H. S., MENTELE, R., BEN-
NUN, A., LASSMANN, H., DORNMAIR, K., KURSCHUS, F. C., LIBLAU, R. S. & WEKERLE,
H. 2009. Myelin-specific T cells also recognize neuronal autoantigen in a transgenic
mouse model of multiple sclerosis. *Nat Med*, 15, 626-32.
- KULKARNI, A. B., HUH, C. G., BECKER, D., GEISER, A., LYGH, M., FLANDERS, K. C., ROBERTS,
A. B., SPORN, M. B., WARD, J. M. & KARLSSON, S. 1993. Transforming growth factor
beta 1 null mutation in mice causes excessive inflammatory response and early
death. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90, 770-4.
- KURTZKE, J. F. 1993. Epidemiologic evidence for multiple sclerosis as an infection. *Clin
Microbiol Rev*, 6, 382-427.
- KURUVILLA, A. P., SHAH, R., HOCHWALD, G. M., LIGGITT, H. D., PALLADINO, M. A. &
THORBECKE, G. J. 1991. Protective effect of transforming growth factor beta 1 on
experimental autoimmune diseases in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88, 2918-21.
- LECHLER, R., CHAI, J. G., MARELLI-BERG, F. & LOMBARDI, G. 2001. The contributions of T-
cell anergy to peripheral T-cell tolerance. *Immunology*, 103, 262-9.
- LEE, Y. K., MENEZES, J. S., UMESAKI, Y. & MAZMANIAN, S. K. 2011. Proinflammatory T-cell
responses to gut microbiota promote experimental autoimmune
encephalomyelitis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108 Suppl 1, 4615-22.
- LEY, R. E., TURNBAUGH, P. J., KLEIN, S. & GORDON, J. I. 2006. Microbial ecology: human gut
microbes associated with obesity. *Nature*, 444, 1022-3.
- LITZENBURGER, T., FASSLER, R., BAUER, J., LASSMANN, H., LININGTON, C., WEKERLE, H. &
IGLESIAS, A. 1998. B lymphocytes producing demyelinating autoantibodies:
development and function in gene-targeted transgenic mice. *J Exp Med*, 188, 169-
80.
- LO, C. P., KAO, H. W., CHEN, S. Y., HSUEH, C. J., LIN, W. C., HSU, W. L., WU, D. K. & LIU, G. C.
2009. Prediction of conversion from clinically isolated syndrome to clinically
definite multiple sclerosis according to baseline MRI findings: comparison of revised
McDonald criteria and Swanton modified criteria. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*,
80, 1107-9.
- LOZUPONE, C. A., STOMBAUGH, J. I., GORDON, J. I., JANSSON, J. K. & KNIGHT, R. 2012.
Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. *Nature*, 489, 220-30.
- LUBLIN, F. D. 2014. New multiple sclerosis phenotypic classification. *Eur Neurol*, 72 Suppl 1,
1-5.
- LUBLIN, F. D. & REINGOLD, S. C. 1996. Defining the clinical course of multiple sclerosis:
results of an international survey. National Multiple Sclerosis Society (USA) Advisory
Committee on Clinical Trials of New Agents in Multiple Sclerosis. *Neurology*, 46,
907-11.
- LUKAS, D., YOGEV, N., KEL, J. M., REGEN, T., MUFAZALOV, I. A., TANG, Y., WANKE, F., REIZIS,
B., MULLER, W., KURSCHUS, F. C., PRINZ, M., KLEITER, I., CLAUSEN, B. E. &
WAISMAN, A. 2017. TGF-beta inhibitor Smad7 regulates dendritic cell-induced
autoimmunity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 114, E1480-E1489.
- MALHOTRA, N. & KANG, J. 2013. SMAD regulatory networks construct a balanced immune
system. *Immunology*, 139, 1-10.
- MANGAN, P. R., HARRINGTON, L. E., O'QUINN, D. B., HELMS, W. S., BULLARD, D. C., ELSON,
C. O., HATTON, R. D., WAHL, S. M., SCHOEB, T. R. & WEAVER, C. T. 2006.
Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage.
Nature, 441, 231-4.
- MANNARA, F., VALENTE, T., SAURA, J., GRAUS, F., SAIZ, A. & MORENO, B. 2012. Passive
experimental autoimmune encephalomyelitis in C57BL/6 with MOG: evidence of
involvement of B cells. *PLoS One*, 7, e52361.
- MARAFINI, I., MONTELEONE, I., DINALLO, V., DI FUSCO, D., DE SIMONE, V., LAUDISI, F.,
FANTINI, M. C., DI SABATINO, A., PALLONE, F. & MONTELEONE, G. 2017. CCL20 Is

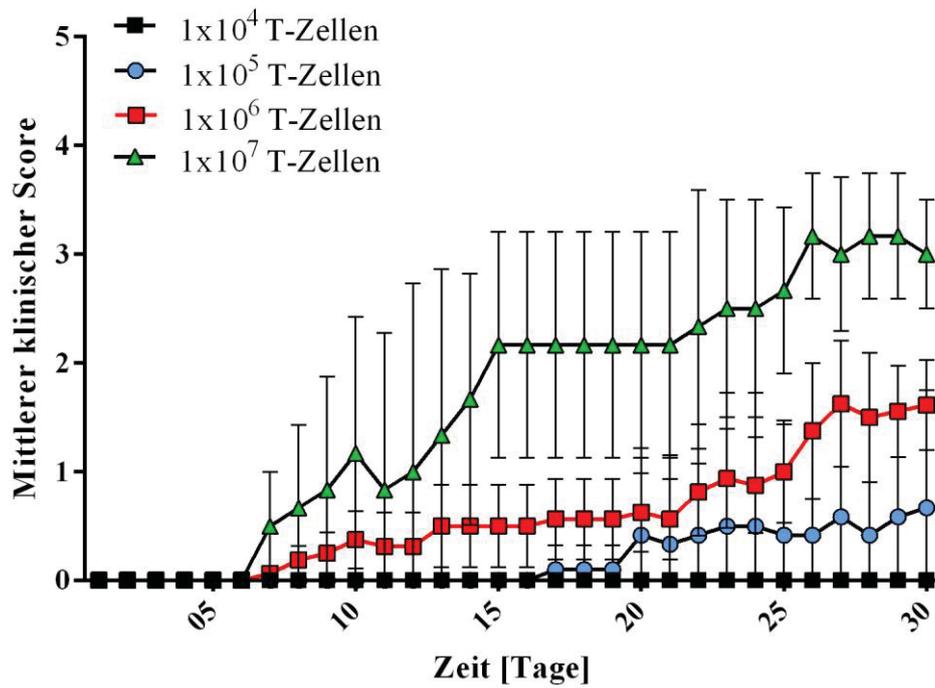
- Negatively Regulated by TGF-beta1 in Intestinal Epithelial Cells and Reduced in Crohn's Disease Patients With a Successful Response to Mongersen, a Smad7 Antisense Oligonucleotide. *J Crohns Colitis*, 11, 603-609.
- MARTIN, R., GRAN, B., ZHAO, Y., MARKOVIC-PLESE, S., BIELEKOVA, B., MARQUES, A., SUNG, M. H., HEMMER, B., SIMON, R., MCFARLAND, H. F. & PINILLA, C. 2001. Molecular mimicry and antigen-specific T cell responses in multiple sclerosis and chronic CNS Lyme disease. *J Autoimmun*, 16, 187-92.
- MARTIN, R., MCFARLAND, H. F. & MCFARLIN, D. E. 1992. Immunological aspects of demyelinating diseases. *Annu Rev Immunol*, 10, 153-87.
- MASSAGUE, J. 1990. The transforming growth factor-beta family. *Annu Rev Cell Biol*, 6, 597-641.
- MAYNARD, C. L., HARRINGTON, L. E., JANOWSKI, K. M., OLIVER, J. R., ZINDL, C. L., RUDENSKY, A. Y. & WEAVER, C. T. 2007. Regulatory T cells expressing interleukin 10 develop from Foxp3+ and Foxp3- precursor cells in the absence of interleukin 10. *Nat Immunol*, 8, 931-41.
- MCCARTHY, D. P., RICHARDS, M. H. & MILLER, S. D. 2012. Mouse models of multiple sclerosis: experimental autoimmune encephalomyelitis and Theiler's virus-induced demyelinating disease. *Methods Mol Biol*, 900, 381-401.
- MCFARLAND, H. F. & MARTIN, R. 2007. Multiple sclerosis: a complicated picture of autoimmunity. *Nat Immunol*, 8, 913-9.
- MCGEACHY, M. J., BAK-JENSEN, K. S., CHEN, Y., TATO, C. M., BLUMENSCHNEIN, W., MCCLANAHAN, T. & CUA, D. J. 2007. TGF-beta and IL-6 drive the production of IL-17 and IL-10 by T cells and restrain T(H)-17 cell-mediated pathology. *Nat Immunol*, 8, 1390-7.
- MILLER, D. H. & LEARY, S. M. 2007. Primary-progressive multiple sclerosis. *Lancet Neurol*, 6, 903-12.
- MILLER, S. D. & KARPUS, W. J. 2007. Experimental autoimmune encephalomyelitis in the mouse. *Curr Protoc Immunol*, Chapter 15, Unit 15 1.
- MIRSHAFIEY, A. & MOHSENZADEGAN, M. 2009. TGF-beta as a promising option in the treatment of multiple sclerosis. *Neuropharmacology*, 56, 929-36.
- MIYAKE, S., KIM, S., SUDA, W., OSHIMA, K., NAKAMURA, M., MATSUOKA, T., CHIHARA, N., TOMITA, A., SATO, W., KIM, S. W., MORITA, H., HATTORI, M. & YAMAMURA, T. 2015. Dysbiosis in the Gut Microbiota of Patients with Multiple Sclerosis, with a Striking Depletion of Species Belonging to Clostridia XIVa and IV Clusters. *PLoS One*, 10, e0137429.
- MIYAKE, S. & YAMAMURA, T. 2018. Gut environmental factors and multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*.
- MONTELEONE, G., CARUSO, R. & PALLONE, F. 2012. Role of Smad7 in inflammatory bowel diseases. *World J Gastroenterol*, 18, 5664-8.
- MONTELEONE, G., KUMBEROVA, A., CROFT, N. M., MCKENZIE, C., STEER, H. W. & MACDONALD, T. T. 2001. Blocking Smad7 restores TGF-beta1 signaling in chronic inflammatory bowel disease. *J Clin Invest*, 108, 601-9.
- MONTELEONE, G., MANN, J., MONTELEONE, I., VAVASSORI, P., BREMNER, R., FANTINI, M., DEL VECCHIO BLANCO, G., TERSIGNI, R., ALESSANDRONI, L., MANN, D., PALLONE, F. & MACDONALD, T. T. 2004. A failure of transforming growth factor-beta1 negative regulation maintains sustained NF-kappaB activation in gut inflammation. *J Biol Chem*, 279, 3925-32.
- MONTELEONE, G., NEURATH, M. F., ARDIZZONE, S., DI SABATINO, A., FANTINI, M. C., CASTIGLIONE, F., SCRIBANO, M. L., ARMUZZI, A., CAPRIOLI, F., STURNIOLO, G. C., ROGAI, F., VECCHI, M., ATREYA, R., BOSSA, F., ONALI, S., FICHERA, M., CORAZZA, G. R., BIANCONE, L., SAVARINO, V., PICA, R., ORLANDO, A. & PALLONE, F. 2015.

- Mongersen, an oral SMAD7 antisense oligonucleotide, and Crohn's disease. *N Engl J Med*, 372, 1104-13.
- MONTELEONE, G. & PALLONE, F. 2015. Mongersen, an Oral SMAD7 Antisense Oligonucleotide, and Crohn's Disease. *N Engl J Med*, 372, 2461.
- MORAN, A. E., HOLZAPFEL, K. L., XING, Y., CUNNINGHAM, N. R., MALTZMAN, J. S., PUNT, J. & HOGQUIST, K. A. 2011. T cell receptor signal strength in Treg and iNKT cell development demonstrated by a novel fluorescent reporter mouse. *J Exp Med*, 208, 1279-89.
- MORTON, A. M., SEFIK, E., UPADHYAY, R., WEISSLEDER, R., BENOIST, C. & MATHIS, D. 2014. Endoscopic photoconversion reveals unexpectedly broad leukocyte trafficking to and from the gut. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111, 6696-701.
- MURPHY, K. & WEAVER, C. *Janeway's immunobiology*.
- NAKAO, A., AFRAKHTE, M., MOREN, A., NAKAYAMA, T., CHRISTIAN, J. L., HEUCHEL, R., ITOH, S., KAWABATA, M., HELDIN, N. E., HELDIN, C. H. & TEN DIJKE, P. 1997. Identification of Smad7, a TGFbeta-inducible antagonist of TGF-beta signalling. *Nature*, 389, 631-5.
- NAKAO, A., OKUMURA, K. & OGAWA, H. 2002. Smad7: a new key player in TGF-beta-associated disease. *Trends Mol Med*, 8, 361-3.
- NOURI, M., BREDBERG, A., WESTROM, B. & LAVASANI, S. 2014. Intestinal barrier dysfunction develops at the onset of experimental autoimmune encephalomyelitis, and can be induced by adoptive transfer of auto-reactive T cells. *PLoS One*, 9, e106335.
- O'CONNOR, K. C., BAR-OR, A. & HAFNER, D. A. 2001. The neuroimmunology of multiple sclerosis: possible roles of T and B lymphocytes in immunopathogenesis. *J Clin Immunol*, 21, 81-92.
- O'GARRA, A. & VIEIRA, P. 2004. Regulatory T cells and mechanisms of immune system control. *Nat Med*, 10, 801-5.
- OCHOA-REPARAZ, J., MIELCARZ, D. W., DITRIO, L. E., BURROUGHS, A. R., FOUREAU, D. M., HAQUE-BEGUM, S. & KASPER, L. H. 2009. Role of gut commensal microflora in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol*, 183, 6041-50.
- ODOARDI, F., SIE, C., STREYL, K., ULAGANATHAN, V. K., SCHLAGER, C., LODYGIN, D., HECKELSMILLER, K., NIETFELD, W., ELLWART, J., KLINKERT, W. E., LOTTAZ, C., NOSOV, M., BRINKMANN, V., SPANG, R., LEHRACH, H., VINGRON, M., WEKERLE, H., FLUGEL-KOCH, C. & FLUGEL, A. 2012. T cells become licensed in the lung to enter the central nervous system. *Nature*, 488, 675-9.
- OLIVEIRA, L. M., TEIXEIRA, F. M. E. & SATO, M. N. 2018. Impact of Retinoic Acid on Immune Cells and Inflammatory Diseases. *Mediators Inflamm*, 2018, 3067126.
- OUYANG, W., FILVAROFF, E., HU, Y. & GROGAN, J. 2009. Novel therapeutic targets along the Th17 pathway. *Eur J Immunol*, 39, 670-5.
- PETERSEN, G., WITTMANN, R., ARNDT, V. & GOPFFARTH, D. 2014. [Epidemiology of multiple sclerosis in Germany: regional differences and drug prescription in the claims data of the statutory health insurance]. *Nervenarzt*, 85, 990-8.
- SAKAGUCHI, S. 2000. Regulatory T cells: key controllers of immunologic self-tolerance. *Cell*, 101, 455-8.
- SALLUSTO, F., GEGINAT, J. & LANZAVECCHIA, A. 2004. Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. *Annu Rev Immunol*, 22, 745-63.
- SCHLAGER, C., KORNER, H., KRUEGER, M., VIDOLI, S., HABERL, M., MIELKE, D., BRYLLA, E., ISSEKUTZ, T., CABANAS, C., NELSON, P. J., ZIEMSEN, T., ROHDE, V., BECHMANN, I., LODYGIN, D., ODOARDI, F. & FLUGEL, A. 2016. Effector T-cell trafficking between the leptomeninges and the cerebrospinal fluid. *Nature*, 530, 349-53.

- SCHÜNKE, M., ROSS, L. M., LAMPERTI, E. D., SCHULTE, E. & SCHUMACHER, U. 2007. *Head and neuroanatomy*, Stuttgart ; New York, Thieme.
- SEDDA, S., MARAFINI, I., DINALLO, V., DI FUSCO, D. & MONTELEONE, G. 2015. The TGF-beta/Smad System in IBD Pathogenesis. *Inflamm Bowel Dis*, 21, 2921-5.
- SEIDERER, J., ELBEN, I., DIEGELMANN, J., GLAS, J., STALLHOFER, J., TILLACK, C., PFENNIG, S., JURGENS, M., SCHMECHEL, S., KONRAD, A., GOKE, B., OCHSENKUHN, T., MULLER-MYHSOK, B., LOHSE, P. & BRAND, S. 2008. Role of the novel Th17 cytokine IL-17F in inflammatory bowel disease (IBD): upregulated colonic IL-17F expression in active Crohn's disease and analysis of the IL17F p.His161Arg polymorphism in IBD. *Inflamm Bowel Dis*, 14, 437-45.
- SELLERS, R. S., CLIFFORD, C. B., TREUTING, P. M. & BRAYTON, C. 2012. Immunological variation between inbred laboratory mouse strains: points to consider in phenotyping genetically immunomodified mice. *Vet Pathol*, 49, 32-43.
- SHI, W., SUN, C., HE, B., XIONG, W., SHI, X., YAO, D. & CAO, X. 2004. GADD34-PP1c recruited by Smad7 dephosphorylates TGFbeta type I receptor. *J Cell Biol*, 164, 291-300.
- SOFRONIEW, M. V. 2005. Reactive astrocytes in neural repair and protection. *Neuroscientist*, 11, 400-7.
- STANISAVLJEVIC, S., DEDOVIC, N., VUJICIC, M., SAKSIDA, T., JEVTIC, B., MILOVANOVIC, B., MOMCILOVIC, M., MILJKOVIC, D. & STOJANOVIC, I. 2017. Strain-specific helper T cell profile in the gut-associated lymphoid tissue. *Immunol Lett*, 190, 282-288.
- STROBER, W. & FUSS, I. J. 2011. Proinflammatory cytokines in the pathogenesis of inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology*, 140, 1756-1767.
- STROMNES, I. M., CERRETTI, L. M., LIGGITT, D., HARRIS, R. A. & GOVERMAN, J. M. 2008. Differential regulation of central nervous system autoimmunity by T(H)1 and T(H)17 cells. *Nat Med*, 14, 337-42.
- STYS, P. K., ZAMPONI, G. W., VAN MINNEN, J. & GEURTS, J. J. 2012. Will the real multiple sclerosis please stand up? *Nat Rev Neurosci*, 13, 507-14.
- T HART, B. A., HINTZEN, R. Q. & LAMAN, J. D. 2009. Multiple sclerosis - a response-to-damage model. *Trends Mol Med*, 15, 235-44.
- TAU, G. Z., VON DER WEID, T., LU, B., COWAN, S., KVATYUK, M., PERNIS, A., CATTORETTI, G., BRAUNSTEIN, N. S., COFFMAN, R. L. & ROTHMAN, P. B. 2000. Interferon gamma signaling alters the function of T helper type 1 cells. *J Exp Med*, 192, 977-86.
- THOMPSON, A. J., MONTALBAN, X., BARKHOF, F., BROCHET, B., FILIPPI, M., MILLER, D. H., POLMAN, C. H., STEVENSON, V. L. & MCDONALD, W. I. 2000. Diagnostic criteria for primary progressive multiple sclerosis: a position paper. *Ann Neurol*, 47, 831-5.
- TRAN, D. Q. 2012. TGF-beta: the sword, the wand, and the shield of FOXP3(+) regulatory T cells. *J Mol Cell Biol*, 4, 29-37.
- TRAPP, B. D., PETERSON, J., RANSOHOFF, R. M., RUDICK, R., MORK, S. & BO, L. 1998. Axonal transection in the lesions of multiple sclerosis. *N Engl J Med*, 338, 278-85.
- ULLOA, L., DOODY, J. & MASSAGUE, J. 1999. Inhibition of transforming growth factor-beta/SMAD signalling by the interferon-gamma/STAT pathway. *Nature*, 397, 710-3.
- URBAN, J. F., JR., NOBEN-TRAUTH, N., DONALDSON, D. D., MADDEN, K. B., MORRIS, S. C., COLLINS, M. & FINKELMAN, F. D. 1998. IL-13, IL-4Ralpha, and Stat6 are required for the expulsion of the gastrointestinal nematode parasite *Nippostrongylus brasiliensis*. *Immunity*, 8, 255-64.
- VAN DEN HOOGEN, W. J., LAMAN, J. D. & T HART, B. A. 2017. Modulation of Multiple Sclerosis and Its Animal Model Experimental Autoimmune Encephalomyelitis by Food and Gut Microbiota. *Front Immunol*, 8, 1081.
- VAN DER VOORN, P., TEKSTRA, J., BEELEN, R. H., TENSEN, C. P., VAN DER VALK, P. & DE GROOT, C. J. 1999. Expression of MCP-1 by reactive astrocytes in demyelinating multiple sclerosis lesions. *Am J Pathol*, 154, 45-51.

- VIDARSSON, G., DEKKERS, G. & RISPENS, T. 2014. IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions. *Front Immunol*, 5, 520.
- VIEIRA, P. L., CHRISTENSEN, J. R., MINAEE, S., O'NEILL, E. J., BARRAT, F. J., BOONSTRA, A., BARTHLOTT, T., STOCKINGER, B., WRAITH, D. C. & O'GARRA, A. 2004. IL-10-secreting regulatory T cells do not express Foxp3 but have comparable regulatory function to naturally occurring CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Immunol*, 172, 5986-93.
- VIGLIETTA, V., BAECHER-ALLAN, C., WEINER, H. L. & HAFNER, D. A. 2004. Loss of functional suppression by CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. *J Exp Med*, 199, 971-9.
- WAN, Y. Y. & FLAVELL, R. A. 2009. How diverse--CD4 effector T cells and their functions. *J Mol Cell Biol*, 1, 20-36.
- WEIGMANN, B., TUBBE, I., SEIDEL, D., NICOLAEV, A., BECKER, C. & NEURATH, M. F. 2007. Isolation and subsequent analysis of murine lamina propria mononuclear cells from colonic tissue. *Nat Protoc*, 2, 2307-11.
- WEINSTOCK, G. M. 2012. Genomic approaches to studying the human microbiota. *Nature*, 489, 250-6.
- WEISSERT, R., DE GRAAF, K. L., STORCH, M. K., BARTH, S., LININGTON, C., LASSMANN, H. & OLSSON, T. 2001. MHC class II-regulated central nervous system autoaggression and T cell responses in peripheral lymphoid tissues are dissociated in myelin oligodendrocyte glycoprotein-induced experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol*, 166, 7588-99.
- WEKERLE, H. & HOHLFELD, R. 2003. Molecular mimicry in multiple sclerosis. *N Engl J Med*, 349, 185-6.
- WRANA, J. L., ATTISANO, L., WIESER, R., VENTURA, F. & MASSAGUE, J. 1994. Mechanism of activation of the TGF-beta receptor. *Nature*, 370, 341-7.
- WU, C. Y., KIRMAN, J. R., ROTTE, M. J., DAVEY, D. F., PERFETTO, S. P., RHEE, E. G., FREIDAG, B. L., HILL, B. J., DOUEK, D. C. & SEDER, R. A. 2002. Distinct lineages of T(H)1 cells have differential capacities for memory cell generation in vivo. *Nat Immunol*, 3, 852-8.
- YU, H., GAGLIANI, N., ISHIGAME, H., HUBER, S., ZHU, S., ESPLUGUES, E., HEROLD, K. C., WEN, L. & FLAVELL, R. A. 2017. Intestinal type 1 regulatory T cells migrate to periphery to suppress diabetogenic T cells and prevent diabetes development. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 114, 10443-10448.
- ZAMVIL, S. S. & STEINMAN, L. 1990. The T lymphocyte in experimental allergic encephalomyelitis. *Annu Rev Immunol*, 8, 579-621.
- ZHANG, S., FEI, T., ZHANG, L., ZHANG, R., CHEN, F., NING, Y., HAN, Y., FENG, X. H., MENG, A. & CHEN, Y. G. 2007. Smad7 antagonizes transforming growth factor beta signaling in the nucleus by interfering with functional Smad-DNA complex formation. *Mol Cell Biol*, 27, 4488-99.
- ZHANG, T., KINGWELL, E., ZHU, F., PETKAU, J., KASTRUKOFF, L. F., MARRIE, R. A., TREMLETT, H. & EVANS, C. 2017. Effect of adherence to the first-generation injectable immunomodulatory drugs on disability accumulation in multiple sclerosis: a longitudinal cohort study. *BMJ Open*, 7, e018612.
- ZHENG, Y., DELGOFFE, G. M., MEYER, C. F., CHAN, W. & POWELL, J. D. 2009. Anergic T cells are metabolically anergic. *J Immunol*, 183, 6095-101.

Anhang



Anhang 1. Titration der T-Zell-Menge für den adoptiven Transfer. Um herauszufinden, welche Menge 2D2 T-Zellen einen klinischen Score in Th-Mäuse auslösen, wurden verschiedene Mengen an T-Zellen injiziert. PTX wurde den Tieren an Tag 0 und 2 appliziert.

Adoptiver Transfer (Progression)											
	Donor					Rezipient					
	Modell	Donor	Zeit nach EAE-Induktion (Tage)	Organ	In vitro MOG ₃₅₋₅₅ Restimulation	Rezipient (21Tage alt)	PTX	Klinische Symptome	Zahl (n)	Zeit nach dem Transfer (Tage)	
					RA	Applizierte Zellzahl					
1	EAE	WT	30	LK, Milz	1x10 ⁶	Nein	WT	Ja	Ja	3	30
2	EAE	WT	30	LK, Milz	1x10 ⁶	Nein	TH	Ja	Ja	4	30
3	EAE	2D2	30	LK, Milz	1x10 ⁶	Nein	WT	Ja	Ja	3	30
4	EAE	2D2	30	LK, Milz	1x10 ⁶	Nein	TH	Ja	Ja	3	30
5	EAE	2D2	30	LK, Milz	1x10 ⁶	Nein	WT	Nein	Nein	3	30
6	EAE	2D2	30	LK, Milz	1x10 ⁶	Nein	TH	Nein	Nein	3	30
7	EAE	2D2	30	LK, Milz	1x10 ⁶	Ja	WT	Nein	Nein	3	30
8	EAE	2D2	30	LK, Milz	1x10 ⁶	Ja	TH	Ja	Ja	3	30

Anhang 2. Etablierung der adoptiven Transfer (AT) –Experimente. Um das adoptive Transfer (AT) -Modell der OSE zu etablieren, wurden CD4⁺ T-Zellen verschiedener Genotypen (WT, 2D2, TH, OSE, Smad7^{CD2}-OSE und Smad7^{CD4}^{-/-}-OSE) verwendet (Donor). Diese Zellen wurden in Rezipienten injiziert, um eine Demyelinisierung ähnlich der experimentellen Autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE) zu induzieren. ATs wurden nach etablierten Protokollen und mit einer geringen Anzahl von CD4⁺T-Zellen (1x10⁶) durchgeführt. Diese Zellmenge reicht nicht aus, um eine EAE ohne zusätzliche Injektion von PTX (IACUC-Protokoll) zu induzieren (Mannara et al., 2012). Es konnte gezeigt werden, dass CD4⁺T-Zellen aus EAE-Tieren in Rezipienten induziert eine EAE auslösen. Die Übertragung von WT- oder 2D2-CD4⁺T-Zellen in WT- oder TH-Rezipienten unter Anwendung von PTX konnte AT-EAE induzieren.

Adoptiver Transfer										
Modell	Donor				In vitro MOG ₃₅₋₅₅ Restimulation			Rezipient		
	Donor	Zeit nach EAE-Induktion (Tage)	Organ	RA	Applizierte Zellzahl	Rezipient (21Tage alt)	PTX	Klinische Symptome	Zahl (n)	Zeit nach dem Transfer (Tage)
1	OSE 2D2xTH (krank)	80	LK, Milz	Nein	1x10 ⁶	2D2xTH (gesund)	Nein	Nein	4	20
2	OSE 2D2xTH (krank)	80	LK, Milz	Nein	1x10 ⁶	2D2xTH (gesund)	Ja	Ja	4	20
3	OSE 2D2xTH (krank)	80	Darm	Nein	1x10 ⁶	2D2xTH (gesund)	Ja	Ja	3	20
4	OSE 2D2xTH (krank)	80	Darm	Nein	1x10 ⁶	2D2xTH (gesund)	Nein	Ja	5	20
5	OSE 2D2xTH (krank)	80	Darm	Ja	1x10 ⁶	2D2xTH (gesund)	Nein	Nein	3	20
6	OSE 2D2xTH-Smad7 ^{CD4-/-} (krank)	80	Darm	Nein	1x10 ⁶	2D2xTH (gesund)	Nein	Nein	3	20
7	OSE 2D2xTH-Smad7 ^{CD2} (krank)	80	Darm	Nein	1x10 ⁶	2D2xTH (gesund)	Nein	Ja	6	20
8	OSE 2D2xTH-Smad7 ^{CD2} (krank)	80	LK, Milz	Nein	1x10 ⁶	2D2xTH (gesund)	Nein	Nein	6	20
9	OSE 2D2xTH-Smad7 ^{CD2} (krank)	80	LK, Milz	Ja	1x10 ⁶	2D2xTH (gesund)	Nein	Ja	6	20

Anhang 3. Adoptiven Transfer (AT) –Experimente mit OSE-Tieren. CD4⁺T-Zellen wurden aus erkrankten OSE-Mäusen isoliert. Die Zugabe von PTX in Empfängermäusen verursacht eine Permeabilisierung der Blut-Hirn-Schranke und erhöht somit die Anfälligkeit gegenüber der EAE. Alle isolierten CD4⁺T-Zellen aus den Donoren wurden vor der adoptiven Transfer auf Rezipienten (Zeilen 1 bis 9) mit MOG₃₅₋₅₅ restimuliert. Die Tabelle zeigt das ZNS-Entzündungsmodell (Modell), Donor (genetische Modifikation), Zeit nach EAE-Induktion (Experiment in Tagen bis zur Isolierung von CD4⁺T-Zellen für den adoptiven Transfer), Organ der Isolierung von CD4⁺T-Zellen (Organ), Behandlung mit Retinsäure (RA) für die Darmregulierung des Darmrezeptors (ja / nein), Applizierte Zellzahl (verwendete Anzahl von Zellen für den adoptiven Transfer), Rezipient (Genotyp für die Anwendung von CD4⁺T-Zellen), PTX (Behandlung mit Pertussis-Toxin ja/nein), klinische Symptome (Entwicklung einer Behinderung) und Tierzahlen.

Adoptive Transfer (Migration) – GFP positive CD4 ⁺ T-Zellen										
Donor						Rezipient				
Modell	Donor	Zeit nach EAE-Induktion (Tage)	Organ	RA	Applizierte Zellzahl	Rezipient (21Tage alt)	PTX	Klinische Symptome	Zahl (n)	Zeit nach dem Transfer(Tage)
10	EAE	WT	30	LK, Milz	Nein	1x10 ⁶	TH	Nein	6	20
11	EAE	2D2	30	LK, Milz	Ja	1x10 ⁶	TH	Nein	12	20
12	EAE	2D2xNur77	30	LK, Milz	Ja	1x10 ⁶	TH	Nein	12	20
13	EAE	2D2xNur77-Smad7 ^{CD2}	30	LK, Milz	Ja	1x10 ⁶	TH	Nein	12	20
14	EAE	2D2xNur77-Smad7 ^{CD4/-}	30	LK, Milz	Ja	1x10 ⁶	TH	Nein	12	20

Anhang 4. Migration im Adoptiven Transfer-Modell. Die Zeilen 10-14 zeigen Experimente zur Verfolgung der Migration GFP markierten CD4⁺T-Zellen nach AT. WT-Mäuse wurden als Kontrolle verwendet. 2D2, 2D2xGFP, 2D2xGFP-Smad7^{CD2} und 2D2xGFP-Smad7^{CD4/-} CD4⁺T-Zellen wurden verwendet, um die Beteiligung von intestinal aktivierten CD4⁺T-Zellen am Induktionsprozess der EAE zu veranschaulichen. Retinsäure wurde verwendet, um die Expression der Darm-Homing-Rezeptoren CCR9 und $\alpha4\beta7$ zu induzieren. Hierdurch werden GFP⁺CD4⁺T-Zellen nach dem Transfer in den Darm geleitet.

Deklaration der Autorenschaft

Die Ergebnisse dieser Dissertation sind zur Veröffentlichung bei einem wissenschaftlichen Journal eingereicht. An der Publikation waren folgende Autoren beteiligt:

Steffen Hauptshofer (S.H.), Teresa Leichsenring (T.L.), Sarah Ann Berg (S.B.), Xiomara Pedreiturria (X.P.), Stephanie Joachim (S.J.), Iris Tischhoff (I.T.), Jan-Michael Otte (J.O.), Tobias Bopp (T.B.), Massimo Fantini (M.F.), Charlotte Esser (C.E.), Dieter Willbold (D.W.), Ralf Gold (R.G.), Simon Faissner (S.F.), Ingo Kleiter (I.K.)

Für die wissenschaftlichen Untersuchungen haben die Autoren S.H., T.L., S.B., X.P., S.J wie folgt an der Entstehung die Publikation mitgewirkt:

Steffen Hauptshofer hat alle vorliegenden Tier-experimentellen Arbeiten durchgeführt und analysiert (Abb. 4 – 27, Anhang).

Sarah Ann Berg, Xiomara Pedreiturria und Stephanie Joachim haben bei den experimentellen Arbeiten zur Etablierung der *Mixed lymphocyte Reaction* und der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE) unterstützt.

Deklaration über die humanen Daten unter Abbildung 28 – 30 und Aufschlüsselung der anteiligen Arbeit von Steffen Hauptshofer und Teresa Leichsenring: Die in dieser Arbeit aufgeführten humanen histologischen Färbungen, exklusive der Detail-Analyse der Darmabschnitte und der IFN γ -Färbung/Analyse wurden von T.L. durchgeführt.