

Aus der Klinik für Neurologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Sven Meuth

**Infektiologische Aspekte in der Pathogenese und Therapie der humanen
Autoimmunerkrankung Multiple Sklerose und ihres murinen Modells,
der Experimentellen Autoimmunencephalomyelitis**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Vsevolod Smolianov

2024

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. med. Harald H. Hofstetter

Zweitgutachter: Prof. Dr. med. Ulrich Germing

Drittgutachter: Prof. Dr. med. Helmar C. Lehmann

Meinen Eltern gewidmet

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Smolianov, V., Dehmel, T., Kieseier, B. C., Hemmer, B., Hartung, H.-P., Hofstetter, H. H., (2012), Ex vivo activation of naturally occurring IL-17-producing T cells does not require IL-6. *Cytokine*, (Band 58, Nr. 2), 231-237

Smolianov, V., Dehmel, T., Vollmar, P., Mausberg, A. K., Kieseier, B. C., Hemmer, B., Hartung, H.-P., Hofstetter, H. H., (2011), Alteration of T cell cytokine production in PLPp-139-151-induced EAE in SJL mice by an immunostimulatory CpG Oligonucleotide. *J Neuroinflammation*, (Band 8, Nr. 59)

Warnke, C., Smolianov, V., Dehmel, T., Andrée, M., Hengel, H., Zohren, F., Arendt, G., Wiendl, H., Haas, R., Hartung, H.-P., Adams, O., Kieseier, B. C., (2011), CD34⁺ progenitor cells mobilized by natalizumab are not a relevant reservoir for JC virus. *Mult Scler*, (Band 17, Nr. 2), 151-156

Zusammenfassung

Multiple Sklerose (MS) ist eine Autoimmunerkrankung des zentralen Nervensystems (ZNS), deren genauer Entstehungsmechanismus trotz intensiver klinischer und grundlagenwissenschaftlicher Forschung nicht bekannt ist. Die Assoziation von bestimmten mikrobiellen Faktoren in der prämorbid Phase wurde mit der späteren manifesten Erkrankung an MS vermutet. Bekannt ist aber auch die Verschärfung der bereits ablaufenden Autoimmunreaktion durch systemische virale und bakterielle Infektionen. Die experimentelle Autoimmunencephalomyelitis (EAE) als tierexperimentelles Modell stellt bestimmte Aspekte der humanen Erkrankung MS wie Entzündung, Demyelinisierung, Axonverlust und Gliose nach. Neben der bekannten Rolle der autoantigenspezifischen T-Helfer (Th)1-Zellen in der EAE, die durch die Produktion von Interferon-gamma (IFN- γ) charakterisiert sind, kristallisierte sich im letzten Jahrzehnt die Bedeutung der IL-17 produzierenden Th17-Zellen heraus. Im Rahmen dieser Arbeit wurden natürlich vorkommende, für eine spätere Immun- und/oder Autoimmunantwort relevante, im Thymus maturierende nTh17-Zellen genauer charakterisiert und deren Unterschiede zu den induzierten, iT17-Zellen – insbesondere Unabhängigkeit von IL-6 und Nichtregulierbarkeit durch IL-2 – herausgestellt. Ferner wurde unter Verwendung von CpG Oligonukleotiden (CpG) als Toll-like Rezeptor (TLR)9-Ligand im Rahmen einer EAE eine systemische Infektion in einem an einer Autoimmunentzündung des ZNS leidenden Organismus simuliert. Die Besonderheiten der für die Autoaggression verantwortlichen Zellen unter diesen Bedingungen wurden beschrieben. Augenfällig waren die Unterschiede in der Reaktion der autoantigenspezifischen Th1- und Th17-Zellen in der Immunperipherie und im ZNS auf die Stimulation mit CpG. Hiernach zeigte sich eine deutliche Hochregulation von Th1-Zellen in der Immunperipherie bei gänzlich fehlender Th17-Antwort nach Zugabe von CpG. Hingegen wurde im ZNS unter TLR9-Ligation ein Überwiegen der autoantigenspezifischen IL-17-Antwort unter entsprechenden Stimulationsbedingungen und insbesondere ein Ausbleiben der Th1-Reaktion unter alleiniger CpG-Stimulation beobachtet. Die Ergebnisse unterstreichen die Komplexität und die Bedeutung des jeweiligen Mikromilieus für die Art und Richtung der Autoimmunreaktion bei bereits bestehender Erkrankung EAE nach externer infektiologischer Modulation des Systems.

Des Weiteren wurde unter einem anderen Blickwinkel der Zusammenhang zwischen Infektion und Autoimmunität des ZNS beleuchtet. Die progressive multifokale Leukenzephalopathie (PML), verursacht durch das JC-Virus, stellt eine lebensbedrohliche Komplikation der Therapie einer hochaktiven schubförmigen MS mit Natalizumab, einem humanisierten, die Einwanderung von Leukozyten ins ZNS durch die Blut-Hirn-Schranke verhindernden Antikörper dar. Die Vermutung, die Therapie mit Natalizumab könne über eine Mobilisierung von mit JC-Virus infizierten CD34⁺ hämatopoietischen Vorläuferzellen aus dem Knochenmark zu einer konsekutiven Infektion des ZNS führen, fand im Rahmen der Bestimmung von JCV DNA in mononukleären Zellen und CD34⁺-Zellen aus dem peripheren Blut von mit Natalizumab behandelten Patienten keine Bestätigung.

Abstract

Multiple sclerosis (MS) is an inflammatory autoimmune disease of the central nervous system (CNS) of still unknown etiology. Despite intensive clinical and basic scientific research, the exact underlying pathomechanisms are still elusive. It has been suggested that microbial/viral agents play both a role during the premorbid phase of the disease and during its exacerbations, i.e. relapses. Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) mimics certain aspects of MS such as inflammation, demyelination, axonal loss and gliosis. Aside from the well-described role of autoantigen-specific Th1 helper cells, characterized by their interferon-gamma (IFN- γ) production, the contribution of Th17 cells to EAE has only been recently acknowledged. In this work, naturally occurring thymus-derived Th17 cells (nTh17) were characterized which later play a role in the autoimmune response during inflammation. In this context their distinction from induced Th17 cells (iTh17), characterized by independence from interleukin 6 (IL-6) and non-regulation through interleukin 2 (IL-2), were highlighted. Furthermore, a systemic infection in an organism suffering from CNS autoimmunity was simulated by using CpG oligonucleotides (CpG) as toll-like receptor (TLR)9-ligands. Under these circumstances, the unique features of cells responsible for autoaggression were described. In particular, the reactions towards CpG differed between autoantigen-specific Th1 and Th17 cells in the periphery and the CNS. In this regard, in the periphery there was a pronounced up-regulation of Th1 cells following addition of CpG while there was no Th17 response at all. In contrast, under parallel stimulation conditions there was a predominance of the autoantigen-specific IL-17 response in the CNS. Moreover, following sole CpG stimulation there was no detectable Th1 reaction. These results underline the complexity and relevance of the respective microenvironment for the nature and direction of autoimmune reactions in already established EAE upon external infectious modulation of the system.

In addition to that, in this work the connection between infection and CNS autoimmunity was investigated from a different point of view. Progressive multifocal leukoencephalopathy (PML) caused by JC virus (JCV) is a life-threatening complication of treatment with natalizumab, a highly active pharmaceutical option for relapsing-remitting MS. Natalizumab, a humanized monoclonal antibody prevents leukocytes from penetrating the blood-brain-barrier into the CNS parenchyma. The hypothesis that natalizumab treatment might lead to CNS infection via mobilization of JCV-infected CD34⁺ hematopoietic precursor cells from the bone marrow could not be corroborated by quantification of JCV DNA in mononuclear and CD34⁺ cells from natalizumab-treated patients.

Abkürzungsverzeichnis

α -GalCer	α -Galactosylceramid
APC	engl.: <i>antigen presenting cells</i>
CD	engl.: <i>cluster of differentiation</i>
CFA	engl.: <i>complete Freund's adjuvance</i>
CpG	CpG Oligonukleotide
DN	doppelt negativ
EAE	Experimentelle Autoimmunencephalomyelitis
EBV	Epstein-Barr-Virus
HHV-6	Humanes Herpesvirus Typ 6
HLA	engl.: <i>human leukocyte antigen</i>
IL	Interleukin
IFN	Interferon
iNKT	invariante natürliche Killerzelle
iTh17-Zelle	induzierte, IL-17 produzierende T-Helferzelle
LPS	Lipopolysaccharide
MBP	engl.: <i>myelin basic protein</i>
MOG	Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein
MHC	engl.: <i>major histocompatibility complex</i>
MS	Multiple Sklerose
nTh17-Zelle	natürlich vorkommende, IL-17 produzierende T-Zelle
PAMP	engl.: <i>pathogen-associated molecular pattern</i>
PBMC	engl.: <i>peripheral blood mononuclear cells</i>
PCR	engl.: <i>polymerase chain reaction</i>
PLP	Proteolipid-Protein
PML	Progressive multifokale Leukenzephalopathie
PRR	engl.: <i>pattern recognition receptor</i>
RRMS	engl.: <i>relapsing-remitting multiple sclerosis</i>
TCR	engl.: <i>T-cell receptor</i>
Th-Zelle	T-Helfer-Zelle
TLR	engl.: <i>toll-like receptor</i>
ZNS	Zentrales Nervensystem
VLA	engl.: <i>very late antigen</i>

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Multiple Sklerose	1
1.2	Grundlagen des Immunsystems.....	3
1.2.1	T-Lymphozyten im Kontext der Autoimmunität	3
1.2.2	Antigenpräsentierende Zellen	5
1.2.3	Toll-like Rezeptoren	7
1.3	Die experimentelle Autoimmunencephalomyelitis (EAE) als Vehikel neuroimmunologischer Forschung	8
1.4	Progressive multifokale Leukenzephalopathie (PML) als Folge der Therapie mit Natalizumab.....	10
1.5	Ethikvotum und Tierversuchsgenehmigung	12
1.6	Ziele der Arbeit.....	13
2	Ex vivo activation of naturally occurring IL-17-producing T cells does not require IL-6, Smolianov, V., Dehmel, T., Kieseier, B. C., Hemmer, B., Hartung, H.-P., Hofstetter, H. H., Cytokine, Band 58, Nr. 2: 231-237, (2012)	14
3	Alteration of T cell cytokine production in PLPp-139-151-induced EAE in SJL mice by an immunostimulatory CpG Oligonucleotide, Smolianov, V., Dehmel, T., Vollmar, P., Mausberg, A. K., Kieseier, B. C., Hemmer, B., Hartung, H.-P., Hofstetter, H. H., J Neuroinflammation, Band 8, Nr. 59, (2011).....	15
4	CD34+ progenitor cells mobilized by natalizumab are not a relevant reservoir for JC virus, Warnke, C., Smolianov, V., Dehmel, T., Andrée, M., Hengel, H., Zohren, F., Arendt, G., Wiendl, H., Haas, R., Hartung, H.-P., Adams, O., Kieseier, B. C., Mult Scler, Band 17, Nr. 2: 151-156, (2011)	16
5	Diskussion.....	17
5.1	Das Zytokin IL-6 ist für eine Ex-vivo-Aktivierung von natürlich vorkommenden, IL-17 produzierenden T-Zellen (nTh17) nicht notwendig	17
5.2	Wirkung von CpG Oligonukleotiden auf die Produktion von Zytokinen im murinen PLPp-139-151-SJL-EAE-Modell	21
5.3	Hämatopoietische Vorläuferzellen stellen nach Mobilisation mit Natalizumab kein relevantes Reservoir für das JC-Virus dar	24
6	Schlussfolgerungen.....	26
7	Literatur- und Quellenverzeichnis.....	27

1 Einleitung

1.1 Multiple Sklerose

Multiple Sklerose (MS) ist eine der häufigsten humanen Autoimmunerkrankungen mit einer Prävalenz von ca. 125.000 Patienten in Deutschland (Hein und Hopfenmüller, 2000) und ca. 2.500.000 Erkrankten weltweit (Tullman, 2013). Diese Krankheit wird vorwiegend im jungen Erwachsenenalter manifest und hat durch die mit ihr verbundenen, oftmals im Verlauf auftretenden dauerhaften Behinderungen und konsekutiven vorzeitigen Berentungen eine enorme volkswirtschaftliche Bedeutung. Nach übereinstimmender wissenschaftlicher Meinung handelt es sich bei der MS um eine chronisch-entzündliche, demyelinisierende autoimmunvermittelte Krankheit des zentralen Nervensystems (ZNS), deren primärer Auslösemechanismus trotz intensiver, weltweit betriebener klinischer und grundlagewissenschaftlicher Forschungsarbeit bis dato nicht identifiziert werden konnte. Die Bezeichnung der Erkrankung leitet sich von den an unterschiedlichen Stellen liegenden, verstreuten – multiplen – Läsionen des ZNS, die nach der initialen Entzündungsphase aufgrund der unzureichenden Reparationsvorgänge mit nachfolgendem gliotischem Umbau eine harte – sklerotische – Konsistenz aufweisen.

Klinisch kann die Erkrankung entsprechend den unterschiedlichen Manifestationsorten im ZNS (Großhirn, Kleinhirn, Rückenmark, Sehnerv) mit vielfältigen neurologischen Ausfallserscheinungen wie Paresen, Sensibilitätsstörungen, Sprachstörungen, Sprechstörungen, Visusminderung oder Augenbewegungsstörungen einhergehen. Im Wesentlichen werden drei Verlaufsformen der MS unterschieden. Bei der schubförmig-remittierenden MS treten in unterschiedlicher Frequenz innerhalb von wenigen Stunden bis Tagen, also subakut, neurologische Defizite (auch als Schübe bezeichnet) auf, die sich mit oder ohne Behandlung vollständig oder inkomplett nach frühestens 24 Stunden zurückbilden. Bei der sekundär-progredienten Verlaufsform der MS kann eine schleichende Zunahme der neurologischen Ausfälle zwischen den auf die Krankheitsprogression aufgelagerten Schüben beobachtet werden. Eine primär-progrediente MS ist durch eine zunehmende Krankheits- und Behinderungsprogression ohne Schübe charakterisiert und stellt aufgrund eines unzureichenden Ansprechens auf die gängigen MS-Therapeutika sowie eines vermutlich differenten ätiopathogenetischen Mechanismus eine Sonderform dar.

Die medikamentöse Therapie der multiplen Sklerose ruht auf insgesamt drei Säulen. Im akuten Schub wird ein hochdosiertes Glukokortikoid, üblicherweise Methylprednisolon, über drei bis fünf Tage mit dem Ziel einer Hemmung des akuten autoimmunentzündlichen

Prozesses verabreicht. Zur Modifizierung des Krankheitsverlaufs werden abhängig von Krankheitsaktivität, Behinderungsprogress und der Verlaufsform der Erkrankung verschiedene Medikamente eingesetzt. An dieser Stelle seien Glatirameracetat, Interferon- β -1a und Interferon- β -1b, Teriflunomid und Dimethylfumarat als Wirkstoffe zur Behandlung einer moderaten schubförmig-remittierenden MS (RRMS) genannt. Bei einem aktiven bzw. hochaktiven Verlauf der RRMS und/oder einem nicht suffizienten Ansprechen auf die oben genannte Medikation stehen zur Behandlung hochwirksame, jedoch mit potentiell lebensgefährlichen Nebenwirkungen vergesellschaftete Medikamente wie Alemtuzumab, Fingolimod und Natalizumab zur Verfügung. Daneben stehen für viele der erkrankungsbedingten Beschwerden wie Blasen- und Mastdarmstörungen, Depression, epileptische Anfälle, Schmerzen, Tremor und Müdigkeit symptomatische medikamentöse Therapien zur Verfügung.

Die Frage nach dem genauen Auslösemechanismus der MS wurde bis dato nicht beantwortet. Nach dem aktuellen Wissensstand sind sowohl polygene Faktoren als auch externe Einflüsse für die Erkrankungswahrscheinlichkeit verantwortlich. Wohlbekannt sind aber viele der pathogenetischen Vorgänge, die zu Entzündung mit nachfolgender Demyelinisierung, unzureichenden Reparationsvorgängen und letztendlich zu axonalem Verlust sowie Gliose führen. Eine zentrale Rolle spielen hierbei autoimmunvermittelte Vorgänge mit Einwanderung von T- und B-Lymphozyten, Plasmazellen, Makrophagen sowie Aktivierung residenter Mikrogliazellen im ZNS, die letztendlich eine Entmarkung der Myelinscheiden bedingen. Bereits früh im Verlaufe der Erkrankung kommt es sekundär, möglicherweise zusätzlich verstärkt durch eine Fehlfunktion der Oligodendrozyten, zu einer axonalen Degeneration, deren Ausmaß wiederum den Behinderungsgrad wesentlich mitbestimmt (Rodriguez, 2003; Lappe-Stiefke, 2003).

Die herausragende Stellung des Immunsystems für die Perpetuierung der MS wird durch Populationsstudien unterstrichen. Hierbei zeigte sich, dass nahezu alle genetischen Varianten, die mit einem erhöhten Risiko einer Erkrankung an MS einhergehen, für Proteine des Immunsystems kodieren. Exemplarisch sei an dieser Stelle an die Assoziation der Krankheitshäufigkeit mit dem humanen Leukozyten-Antigen (HLA)-DR2b verwiesen (Barcellos, 2003).

Eine nicht zu vernachlässigende Rolle in der Begünstigung autoimmuner Prozesse im ZNS haben bakterielle und virale Infektionen, ohne dass sich ein bestimmtes infektiöses Agens

als entscheidend oder notwendig für die Auslösung der MS identifizieren ließ. Die Assoziation zwischen einer EBV (Epstein-Barr-Virus)-Infektion und erhöhtem Risiko, im weiteren Verlauf an MS zu erkranken, ist gut belegt (Levin, 2010). Ferner ist bekannt, dass die Seroprävalenz für verschiedene EBV-Antigene bei MS-Patienten im Vergleich zu Kontrollen signifikant erhöht ist (Santiago, 2010). Die DNA des humanen Herpesvirus von Typ 6 (HHV-6) fand sich häufiger in MS-Läsionen als im gesunden Kontrollgewebe (Virtanen, 2012). Bekannt ist aber auch die Korrelation von Infektionen – viral und bakteriell – und Schüben bei bereits etablierter MS (Buljevac, 2002; Sibey, 1985).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden in zwei Teilprojekten einzelne Aspekte im Zusammenwirken von Infektion, Immunsystem und Autoimmunität im ZNS anhand eines Tiermodells, der EAE, untersucht sowie eine Hypothese zur Manifestation einer lebensgefährlichen, durch das JC-Virus vermittelten Erkrankung, der progressiven multifokalen Leukenzephalopathie (PML), als Folge der Therapie der hochaktiven MS mit dem Antikörper Natalizumab überprüft.

1.2 Grundlagen des Immunsystems

1.2.1 T-Lymphozyten im Kontext der Autoimmunität

Thymus-abhängige oder T-Lymphozyten sind Zellen des adaptiven Immunsystems und nehmen durch ihre Dirigentenfunktion und hochgradige Spezialisierung eine zentrale Stellung in der Abwehr pathogener Erreger im Rahmen der Immunantwort ein. Sie entstammen lymphoiden Progenitorzellen, die im Zuge der Differenzierung aus pluripotenten hämatopoietischen Vorläuferzellen im Knochenmark entstehen. Ein Teil der so entstandenen Vorläuferzellen migriert über den Blutkreislauf in den Thymus, neben dem Knochenmark das zweite zentrale lymphatische Organ und Ort der Selektion und Reifung der T-Lymphozyten. Dort findet eine stufenweise Polarisierung und Lenkung der Vorläuferzellen über vor Ort befindliche Liganden und interne Transkriptionsfaktoren hin zu naiven antigenspezifischen T-Lymphozyten, die in sekundäre lymphatische Organe wie Milz, Lymphknoten oder darmassoziiertes Gewebe weiterziehen. Das Hauptziel dieses Prozesses stellt die Bildung eines variantenreichen T-Zell-Repertoires dar, welches die Erkennung und Bekämpfung einer größtmöglichen Anzahl von Pathogenen bei gleichzeitiger Unterscheidung von körpereigenen Strukturen möglich macht. In den allermeisten Fällen wird dies durch ein mehrstufiges Verfahren ermöglicht. Die einzelnen Phasen der Entwicklung der Thymozyten können am

Expressionsmuster bestimmter, für Signaltransduktion, Zell-Zell-Kontakt oder Costimulation unentbehrlicher Oberflächenmoleküle, *cluster of differentiation* (CD) genannt, beschrieben werden. Nach Durchlaufen der Phase, die wegen der fehlenden Expression von CD4 und CD8 als doppelt negativ (DN) bezeichnet wird und in der bereits die Art der künftigen Zelle anhand der Ausbildung des T-Zellrezeptors durch Rekombination und Zusammensetzung der Ketten präT α , β , γ und δ mehrheitlich zu präT $\alpha\beta$ oder alternativ zu $\gamma\delta$ bestimmt wird, kommt es im weiteren Verlauf der Maturation der T-Lymphozyten, die den $\alpha\beta$ -T-Zell-Rezeptor (TCR) voll ausgebildet haben, zur Hochregulation der Moleküle CD4, CD8 und CD3. Die doppelt positiven (DP) Thymozyten interagieren mit ihren CD3:TCR-Komplexen mit den *major histocompatibility complex* (MHC)-Proteinen der Klasse I oder II der kortikalen Thymus-Epithelzellen. MHC-Proteine der Klasse I bedingen die Herunterregulierung der CD4-Proteine, so dass CD8⁺-T-Zellen, die in den allermeisten Fällen zytotoxisch agieren, entstehen. MHC I werden auf praktisch allen kernhaltigen Zellen exprimiert und dienen in Kombination mit den präsentierten Peptiden der Selbsterkennung durch CD8⁺-T-Lymphozyten, die bei Erkennung veränderter oder fremder Proteinbestandteile die Zelle eliminieren. MHC-Proteine der Klasse II bedingen im Kontext der positiven Selektion die Ausbildung von CD4⁺-T-Lymphozyten. MHC II-Proteine finden sich vor allem auf den sogenannten Antigen-präsentierenden Zellen wie Makrophagen, dendritischen Zellen und B-Lymphozyten und dienen in Kombination mit den darin präsentierten Peptiden der Signalgebung an die CD4⁺-T-Lymphozyten, die abhängig von umgebendem Milieu und den dargebotenen co-stimulatorischen Signalen aktivierend, hemmend oder Anergie auslösend wirkend kann. Nur die Zellen, die eigene MHC-Moleküle an den kortikalen Thymus-Epithelzellen erkennen, durchlaufen weitere Differenzierungsschritte; die restlichen Thymozyten werden durch Apoptose eliminiert. Dieser Vorgang wird positive Selektion genannt. Im Rahmen der anschließenden negativen Selektion werden nur diejenigen Thymozyten nicht entfernt, die eine mittelstarke Bindung an die Komplexe aus Selbst-Peptiden und MHC-Proteinen, die sich an der Oberfläche der medullären Thymus-Epithelzellen und der aus dem Knochenmark in die Medulla des Thymus eingewanderten Makrophagen und dendritischen Zellen, aufweisen. T-Zellen, die entweder nicht, zu stark oder zu schwach binden, werden aus dem Verkehr gezogen. Durch den Vorgang der positiven und negativen Selektion – zentrale Toleranz genannt – wird sichergestellt, dass die Mehrzahl der selektierten und gereiften Thymozyten die eigenen Körperstrukturen in der Peripherie nicht als fremd erkennen. Daneben bestehen verschiedene Strategien, die der Thymusselektion entwichenen autoreaktiven Zellen in Schach

zu halten. Zu den Strategien der peripheren Toleranz gehören die Abschottung der körpereigenen Strukturen gegen Teile des Immunsystems durch Barrieren wie dies z.B. bei der Blut-Hirn-Schranke der Fall ist, Induktion einer Anergie durch Zellinaktivierung mittels einer schwachen Signalgebung ohne Co-Stimuli, Suppression einer Immunantwort durch regulatorische T-Zellen oder Unterdrückung der Inflammation durch Polarisierung der Effektorzellen in Richtung des Th2-Phänotyps sowie klonale Deletion bei zu starker Stimulierung durch den T-Zell-Rezeptor. Bei Versagen der Kontrollmechanismen in Kombination mit externen inflammatorischen Stimuli – wie dies im Rahmen von Infektionen möglich ist – können die in jedem Individuum vorhandenen autoreaktiven Zellen des Immunsystems eine selbstschädigende Reaktion in Gang setzen und abhängig von angegriffenen Autoantigenen zu spezifischen Autoimmunerkrankungen führen (Murphy, 2008).

1.2.2 Antigenpräsentierende Zellen

Fast alle körpereigenen Zellen besitzen die Fähigkeit zur Präsentation von aufgenommenen und degradierten Proteinbestandteilen an die T-Lymphozyten mittels MHC-Molekülen an ihrer Oberfläche. Die Antigenpräsentation über MHC-Proteine der Klasse I an die $CD8^+$ -T-Lymphozyten dient der Unterscheidung zwischen körpereigenen und körperfremden Bestandteilen und führt im Falle der Erkennung von als fremden oder fremd erkannten, körpereigenen entarteten Molekülen zu einer Eliminierung der entsprechenden Zelle. Antigenpräsentierende Zellen (APC) im eigentlichen Sinne oder professionelle APC präsentieren die aufgenommenen Proteinbestandteile durch MHC-Moleküle der Klasse II an $CD4^+$ -T-Lymphozyten mit dem Ziel der Initiierung einer antigenspezifischen, adaptiven Immunantwort, die neben dem ersten Signal, also der Bildung eines MHCII-Antigen-TCR-Komplexes, ein zweites Signal, nämlich das Zusammenwirken co-stimulatorischer Moleküle auf den APC und co-stimulatorischer Rezeptoren auf den T-Lymphozyten, zwingend benötigt. Hierbei kann sich das zweite Signal abhängig von der Art der Wechselwirkung sowohl stimulierend als auch inhibierend, i.e. die adaptive Immunantwort bremsend, erweisen.

Die Funktion professioneller Antigenpräsentation wird in erster Linie den dendritischen Zellen, ferner Makrophagen und B-Lymphozyten sowie Mikrogliazellen zugeschrieben, wobei letztere durch ihre differente Abstammung und exklusive ZNS-Residenz eine Sonderstellung einnehmen.

Unter dendritischen Zellen werden verschiedene Zelltypen mit unterschiedlicher Abstammung – sowohl aus myeloider als auch aus lymphoider Reihe – subsumiert, denen die Antigenpräsentation an die Zellen des adaptiven Immunsystems als Hauptaufgabe gemein ist. Unreife dendritische Zellen verlassen das Knochenmark und lassen sich in nahezu allen Geweben nieder. Im unreifen Zustand prozessieren sie große Mengen an Antigenen über Phagozytose, Mikropinozytose und rezeptorvermittelte Endozytose, ohne dabei diese an die T-Lymphozyten suffizient zu präsentieren. Im Falle einer Aktivierung durch inflammatorische Signale, beispielsweise ausgelöst nach unspezifischer Erkennung von körperfremden Bestandteilen durch die Zellen des angeborenen Immunsystems, kommt es zu einer Reifung der dendritischen Zellen, die zunächst in lokale Lymphknoten abwandern und dort die zuvor aufgenommenen Antigenbestandteile an T-Lymphozyten präsentieren und somit eine antigenspezifische Antwort in Gang setzen.

Makrophagen stellen durch inflammatorische Signale aktivierte, aus dem Blutkreislauf ins Gewebe durch chemotaktische Signale angelockte Monozyten dar, deren Hauptfunktion in der Aufnahme von abgestorbenen Zellbestandteilen und abgetöteten oder lebenden bakteriellen und viralen Erregern darstellt. Daneben präsentieren sie ähnlich den dendritischen Zellen über MHC-Moleküle der Klasse II die prozessierten Antigene an T-Lymphozyten, jedoch ohne in Lymphknoten auszuwandern, i.e. an Ort und Stelle des entzündlichen Prozesses, und unterhalten somit die lokale antigenspezifische Abwehrreaktion.

Mikrogliazellen residieren exklusiv im ZNS und haben in erster Linie eine Überwachungsfunktion und stellen aufgrund des durch die Blut-Hirn-Schranke verschwindend geringen Anteils an übrigen Abwehrzellen den Vorposten des Immunsystems im ZNS dar. Sie entwickeln sich – anders als übrige dendritische Zellen – aus embryonalen Stammzellen und wandern früh in der Ontogenese in das ZNS ein, um dort sesshaft zu bleiben. Ähnlich den Makrophagen können sie im Falle einer Infektion eindringende Viren und Bakterien bekämpfen und eine lokale Immunreaktion in Gang setzen. Im Kontext der ZNS-Autoimmunität wird den Mikrogliazellen durch anhaltende Präsentation von Myelinbestandteilen an T-Zellen eine wichtige Rolle in der Unterhaltung des Autoimmunprozesses zugerechnet.

Ferner ist die antigenpräsentierende Funktion der B-Zellen neben ihrer Hauptaufgabe der spezifischen Antikörperbildung erwähnenswert. B-Lymphozyten sind in der Lage, gelöste Antigene über ihren spezifischen, an der Oberfläche der Zellmembran gelegenen B-Zell-Rezeptor aufzunehmen und anschließend in der den APC eigenen Manier über MHC-Moleküle der Klasse II den T-Zellen zu präsentieren. Bei Vorliegen zusätzlicher co-stimulatorischer

Signale kommt es zu gegenseitiger Aktivierung der T- und B-Zellen, die neben spezifischer zellulärer Antwort die Produktion von ebenso antigenspezifischen Antikörpern nach sich zieht (Murphy, 2008).

1.2.3 Toll-like Rezeptoren

Neben den bereits beschriebenen, wesentlichen zellulären Bestandteilen des adaptiven Immunsystems soll hier aufgrund der spezifischen Fragestellung und der verwendeten Methoden in dieser Arbeit auf ein universelles System der unspezifischen Pathogenerkennung eingegangen werden. Nach dem aktuellen Stand der biomedizinischen Forschung stellen die *toll-like receptors* (TLR) eines der phylogenetisch ältesten, konservierten Systeme zur Erkennung und Abwehr von bakteriellen, viralen und fungalen Infektionen dar, welche sowohl bei Wirbellosen als auch bei Wirbeltieren beschrieben und charakterisiert wurden. TLR gehören zur übergeordneten Gruppe der *pattern recognition receptors* (engl.: Mustererkennungszusatzrezeptoren; PRR), die als solche bereits bei Pflanzen als Teil deren primitiven, ausschließlich angeborenen Immunsystems nachgewiesen wurde. Die Beschreibung der TLR als „*toll-like*“ geht auf die Entdeckung von Toll-Rezeptoren im Zuge der Erforschung der Embryonalentwicklung der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* zurück (Anderson, 1985; Anderson, 1985). Im weiteren Verlauf wurde die Rolle dieser Rezeptoren als Teil des Immunsystems der Fruchtfliege beleuchtet (Ip, 1993; Lemaitre, 1995), bevor eine Dekade nach deren Entdeckung TLR im Immunsystem der Säugetiere nachgewiesen wurden (Medzhitov, 1997). Momentan sind bei den Wirbeltieren sechs TLR-Familien mit 23 TLR bekannt; in der menschlichen Spezies wurden 10 funktionierende, sich sowohl auf als auch innerhalb der Zellen des angeborenen (Makrophagen, dendritische Zellen) und des adaptiven Immunsystems (T- und B-Lymphozyten) befindlichen TLR beschrieben (Roach, 2005). TLR erkennen *pathogen-associated molecular patterns* (engl.: pathogen-assoziierte molekulare Muster; PAMP), die im Wirtsorganismus nicht vorkommende, repetitive Abfolgen von Aminosäuren, Eiweißen, Lipoproteinen, Lipopolysacchariden sowie DNA- oder RNA-Bestandteilen darstellen und nach Eindringen von Infektionserregern freigesetzt werden. Die Aktivierung der TLR führt über eine Signalkaskade zur Verlagerung von Transkriptionsfaktoren wie NFκB oder IRF3 in den Nukleus, in deren Folge mannigfaltige Cytokine, Chemokine und co-stimulatorische Moleküle zur Aktivierung zellulärer Bestandteile des angeborenen Immunsystems produziert werden.

Beispielsweise bindet der ausschließlich intrazellulär und in verschiedenen Zellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems wie T- und B-Lymphozyten, Monozyten, dendritischen Zellen und natürlichen Killerzellen lokalisierte TLR9 unmethylierte CpG Oligonukleotide einzel- oder doppelsträngiger DNA bakteriellen Ursprungs, die in dieser Form in Wirbeltieren sehr selten oder nicht vorkommen. Nach Aktivierung des TLR9 kommt es zu Initiierung einer direkten sowie indirekten entzündlichen Immunantwort mit Produktion von IFN- α , IFN- β , IL-6, IL-12 und weiteren proinflammatorischen Cytokinen und Chemokinen, die letztendlich eine schnelle, wenngleich unspezifische Immunreaktion auf eindringende Pathogene auslösen, der eine spezialisierte Reaktion des adaptiven Immunsystems folgt. Zu experimentellen Zwecken werden synthetische CpG-Motive verwendet, die die natürlich vorkommenden CpG bakteriellen Ursprungs nachahmen.

Aufgrund der herausragenden Stellung der TLR in der Erkennung von infektiösen Erregern an der vordersten Front der Immunabwehr mit konsekutiver Inangriffnahme einer komplexen Maschinerie zur spezifischen Bekämpfung von Fremdorganismen durch Teile des adaptiven Immunsystems stellen TLR-Liganden paradigmatisch einen mikrobiellen Stimulus in der immunologischen Forschung dar. Sie sind aber auch auf dem Hintergrund der bekannten Rolle von Infektionen in der Initiierung, Aufrechterhaltung und dem Progress autoimmunologischer Erkrankungen von besonderem Interesse in der Bearbeitung von Fragestellungen zu Autoimmunität an Zellkulturen und Tiermodellen und waren Gegenstand von zwei der drei Teilprojekte dieser Arbeit.

1.3 Die experimentelle Autoimmunencephalomyelitis (EAE) als wichtige Methode der neuroimmunologischen Forschung

Zur Erforschung neuroimmunologischer Fragestellungen spielen neben Zellkulturen Tiermodelle eine herausragende Bedeutung. Die experimentelle Autoimmunencephalomyelitis (EAE) ist ein weit verbreitetes und wissenschaftlich allgemein akzeptiertes Tiermodell autoimmunvermittelter Erkrankungen des ZNS, insbesondere der MS, welches zur Erforschung der Pathogenese auf histologischer, immunologischer sowie molekularbiologischer Ebene und Erprobung neuer Therapeutika verwendet wird. Dieses Modell diente zur Bearbeitung spezifischer Fragen im Rahmen dieser Arbeit und wird daher näher beschrieben. Erstmals wurde die EAE in den 1930er Jahren in Rhesusaffen, denen Hirngewebeextrakte gesunder Kaninchen mehrmals appliziert wurden, ausgelöst (Rivers, 1933; Rivers und

Schwentker, 1935). Aktuell gibt es eine Vielzahl an unterschiedlichen EAE-Modellen die in verschiedenen Spezies - exemplarisch seien hier Ratten, Mäuse, Meerschweinchen und Weißbüschelaffen genannt - erfolgreich etabliert werden konnten. Üblicherweise wird die EAE durch subkutane Injektion von ZNS-Homogenisat, Myelinproteinen wie Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein (MOG), Proteolipid-Protein (PLP) und Basisches Myelinprotein (engl.: *myelin basic protein*; MBP) oder von deren immundominanten Peptiden induziert. In den heutzutage verwendeten Mausmodellen erfolgt die subkutane Immunisierung unter Zugabe des kompletten Freundschens Adjuvans (CFA), welches ein Gemisch aus Mineralöl zur Gewährleistung der Depotwirkung, einem Emulgator sowie hitzeinaktivierten Zellwandbestandteilen von *Mycobacterium tuberculosis* H37RA, die potente TLR2-Liganden enthalten, darstellt. Zur Potenzierung des Schweregrades der Erkrankung werden zudem sequentielle (meist zwei) intraperitoneale Injektionen von Pertussis-Toxin durchgeführt. Initial findet durch antigenpräsentierende Zellen (APC) die Aufbereitung und Präsentation von aufgrund des Immunisierungsmodus als „fremd“ erkannten ZNS-Peptiden und deren anschließende Präsentation in den lokalen Lymphknoten an die naiven autoreaktiven T-Zellen statt. In deren Folge ereignen sich Reifungs- und Differenzierungsvorgänge sowie klonale Expansion mit anschließender Migration in die weiter entfernt liegenden sekundären lymphatischen Organe (weitere Lymphknoten, Milz) und über den Blutkreislauf sowie die Blut-Hirn-Schranke in das Effektororgan ZNS. Dort findet durch erneute Präsentation des vor Ort befindlichen und durch die residenten APC (Mikroglia-Zellen) aufbereiteten Autoantigens die Aktivierung der in der Immunperipherie geprimten autoreaktiven T-Zellen statt. Diese werden zu autoaggressiven Zellen und attackieren die Myelinstrukturen direkt, locken aber auch durch Produktion proinflammatorischer Cytokine und Chemokine weitere Zellen des Immunsystems wie B-Lymphozyten und Makrophagen an, die die Entzündungskaskade aufrechterhalten und zu einer ausgedehnten, zum Teil unspezifischen Schädigung der nervalen Strukturen beitragen.

Neben der aktiven Immunisierung kann die EAE durch einen sogenannten adoptiven Transfer – eine Übertragung autoantigenreaktiver T-Zellen in gesunde Rezipienten – ausgelöst werden. Dieser Auslösemechanismus stellt die immunologische Natur der EAE mit zentraler Stellung myelinspezifischer T-Lymphozyten unzweifelhaft unter Beweis.

Der wichtigste Unterschied zwischen EAE und MS, der eine direkte Übertragung der Ergebnisse im Tiermodell auf die humane Erkrankung nicht zulässig macht, sind die Modalitäten der Entstehung der Immunpathologie. Die EAE wird durch einen extern herbeigeführten

Immunisierungsvorgang ausgelöst, wohingegen in der MS-Entstehung Sensibilisierungsprozesse zu ZNS-Autoantigenen offensichtlich ohne einen solchen vorstättgehen (Constantinescu, 2011).

1.4 Progressive multifokale Leukenzephalopathie (PML) als Folge der Therapie mit Natalizumab

Pathogene Erreger und infektiöse Stimuli werden im Kontext der ZNS-Autoimmunität als mögliche mitauslösende Faktoren diskutiert und können die bereits laufende Erkrankung MS nachteilig beeinflussen. Doch kann auch eine Infektion als seltene, jedoch potentiell lebensgefährliche Folge einer hochspezifischen immunmodulatorischen Therapie der MS wie im Falle des Antikörpers Natalizumab und der PML auftreten.

Natalizumab ist ein humanisierter ImmunglobulinG4-Antikörper mit Affinität zum Antigen CD49d, welches als Alpha 4 Untereinheit des *very late activation antigen* (VLA)4 fungiert. Nach Bindung von Natalizumab an sein Antigen wird die Andockung von an der Plasmamembran der Leukozyten exprimiertem VLA4 an seinen an der Oberfläche der Endothelzellen lokalisierten Rezeptor VCAM-1 verhindert und somit die Einwanderung der Lymphozyten, darunter autoreaktive T-Zellen, und Monozyten über die Blut-Hirn-Schranke in das ZNS unterbunden (von Adrian und Engelhardt, 2003; Ransohoff, 2007; Rice, 2005). Darüber hinaus wurde die Mobilisierung von CD 34⁺ hämatopoietischen Vorläuferzellen aus dem Knochenmark nach Verabreichen von Natalizumab nachgewiesen (Zohren, 2008).

Nach der Erstzulassung von Natalizumab zur Behandlung der hochaktiven schubförmigen MS auf dem nordamerikanischen Markt im Jahre 2004 wurde über drei Patienten – ein Patient erhielt das Medikament zur Therapie von Morbus Crohn – berichtet, die an PML erkrankt waren (Kleinschmidt-DeMasters BK, 2005; Langer-Gould A, 2005; Van Assche G, 2005). In der Folge der Erkrankung verstarben zwei dieser Patienten; ein Patient blieb in einem dauerhaft schwer beeinträchtigten Zustand. Diese Ereignisse führten zu einer vorübergehenden Verbannung des Medikaments vom nordamerikanischen Markt, bevor durch eine Nachuntersuchung von über 3000 mit Natalizumab behandelten Patienten, die keine weitere PML-Fälle zeigte, die Wiedenzulassung auf dem nordamerikanischen Markt und die Erstzulassung in Europa im Jahre 2006 erwirkt werden konnte.

PML ist eine akute demyelinisierende Erkrankung der subkortikalen Strukturen des Großhirns, die durch das zusammen mit dem SV-40 und BK-Virus zur Familie der Polyomaviridae gehörende opportunistische JC-Virus verursacht wird (Frisque, 1984) und ausschließlich bei immunsupprimierten Patienten, insbesondere mit erheblicher Störung der zellulären Immunantwort, nachgewiesen wurde. Ursachen der Immundefizienz können sowohl durch erworbene Immundefekte wie AIDS im fortgeschrittenen Stadium oder hämatologische Erkrankungen als auch vorangegangene Chemotherapien, immunsuppressive Behandlung nach Organtransplantationen oder zur Therapie von Autoimmunerkrankungen darstellen (Koralnik, 2004). Die Infektion mit dem Erreger findet im Kindesalter statt und verläuft asymptomatisch. Die Durchseuchung ist hoch, in bis zu 85% der Erwachsenen können Antikörper gegen das JC-Virus im Serum nachgewiesen werden. Das Virus persistiert in Epithelzellen der Nieren, in der Milz und im Knochenmark (Ferrante, 1997). Aufgrund des Wirkmechanismus von Natalizumab mit Affektion der zellulären Bestandteile des Immunsystems und nicht gegebener Risikoerhöhung durch die MS als solche wurde ein kausaler Zusammenhang zwischen dem Verabreichen dieses Medikaments und dem Auftreten von PML angenommen. Zur Erhöhung der Therapiesicherheit waren sowohl ein enges Monitoring der behandelten Patienten als auch die nun ausgearbeitete Definition von Risikofaktoren im Sinne der Risikostratifizierung einer PML (Warnke, 2011) unter der Therapie mit Natalizumab notwendig. Von besonderem Interesse war aber auch der bis dato nicht gänzlich geklärte Pathomechanismus der PML-Entstehung. Anhand der ersten Hypothese wird die Reaktivierung der möglicherweise in den Oligodendrozyten residenten JC-Viren durch vermindertes Einwandern von T-Lymphozyten und somit Reduktion der Überwachungskapazitäten im ZNS begünstigt. Eine Persistenz des JC-Virus im ZNS galt jedoch zum Zeitpunkt der Durchführung der Arbeit als unsicher, ferner würde eine verminderte Einwanderung von Lymphozyten eine unspezifische Risikoerhöhung für opportunistische Infektionen des ZNS erwarten lassen. Die zweite Hypothese, die in einem der Teilprojekte dieser Arbeit überprüft wurde, nahm eine Natalizumab-bedingte Mobilisierung JCV-infizierter hämatopoietischer Stammzellen aus dem Knochenmark mit konsekutivem Übertritt in das ZNS an (Ransohoff, 2005).

1.5 Ethikvotum und Tierversuchsgenehmigung

Die Tierversuche im Rahmen der Originalarbeit

Smolianov, V., Dehmel, T., Kieseier, B. C., Hemmer, B., Hartung, H.-P., Hofstetter, H. H., (2012), Ex vivo activation of naturally occurring IL-17-producing T cells does not require IL-6. *Cytokine*, (Band 58, Nr. 2), 231-237

wurden nach vorheriger Anzeige beim Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen (LANUV) durchgeführt. Die vergebene Projektnummer lautete: O/115/2007.

Die Tierversuche im Rahmen der Originalarbeit

Smolianov, V., Dehmel, T., Vollmar, P., Mausberg, A. K., Kieseier, B. C., Hemmer, B., Hartung, H.-P., Hofstetter, H. H., (2011), Alteration of T cell cytokine production in PLPp-139-151-induced EAE in SJL mice by an immunostimulatory CpG Oligonucleotide. *J Neuroinflammation*, (Band 8, Nr. 59)

wurden nach erfolgter Genehmigung durch das LANUV durchgeführt. Die vergebene Projektnummer lautete: G/207/2007.

Die Experimente im Rahmen der Originalarbeit

Warnke, C., Smolianov, V., Dehmel, T., Andrée, M., Hengel, H., Zohren, F., Arendt, G., Wiendl, H., Haas, R., Hartung, H.-P., Adams, O., Kieseier, B. C., (2011), CD34+ progenitor cells mobilized by natalizumab are not a relevant reservoir for JC virus. *Mult Scler*, (Band 17, Nr. 2), 151-156

wurden nach positivem Votum der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf durchgeführt. Die entsprechende Studie „Natalizumab (Tysabri®) und die Progressive Multifokale Leukenzephalopathie (PML) als unerwünschte Arzneimittelwirkung: Prospektive longitudinale Studie zur Bestimmung des zellulären Immunstatus und der JC-Viruslast im Liquor, Plasma und Urin von Patienten unter Langzeittherapie mit Natalizumab“ wurde unter der Studiennummer 3315 registriert.

Der Promovend nahm vom 01.04. bis 07.04.2009 am versuchstierkundlichen Kompaktkurs „Versuchstiere, Tierversuche und Ersatzmethoden“ nach der damaligen FELASA-B Kategorie erfolgreich teil.

1.6 Ziele der Arbeit

Im Rahmen von drei Teilprojekten sollten verschiedene Aspekte und Zusammenhänge von Autoimmunität im ZNS und Infektion unter unterschiedlichen Blickwinkeln beleuchtet werden.

Zunächst erfolgte im ersten Teilprojekt die Charakterisierung von aus dem murinen Thymus isolierten naïven, IL-17 produzierenden T-Zellen mithilfe einer simulierten Infektion in einem kontrollierten *in vitro*-System. Hierbei sollten folgende Fragen beantwortet werden:

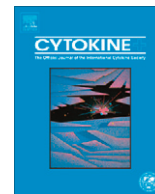
1. Kann eine TLR- und CD3-Stimulation in Thymozyten die Produktion von IL-6 triggern?
2. Korreliert die Produktion von IL-6 und IL-17 in Thymozyten?
3. Ist IL-6 notwendig für die Produktion von IL-17 im murinen Thymus?

Im zweiten Teilprojekt wurde die Rolle einer Infektion in der Frühphase sowie bei bereits aktiver autoimmun-entzündlicher Erkrankung des ZNS im murinen PLPp-139-151-SJL-EAE-Modell unter Verwendung von CpG als paradigmatischen infektiösen Stimulus untersucht. Folgende Fragen wurden bearbeitet:

1. Welche Effekte haben CpG auf das Priming von PLPp-spezifischen T-Zellen?
2. Beeinflussen CpG bereits geprimte enzephalitogene T-Zellen?
3. Unterscheiden sich die Effekte von CpG auf bereits geprimte Zellen in der Immunperipherie und im Zielorgan ZNS?

Im dritten Teilprojekt wurde folgende Hypothese zur Entstehung von PML, einer durch JC-Virus vermittelten Infektion des ZNS, im Zuge der Therapie der RR-MS mit Natalizumab überprüft:

Stellen hämatopoietische Vorläuferzellen ein potentielles Reservoir für JCV in mit Natalizumab behandelten Patienten dar?



Ex vivo activation of naturally occurring IL-17-producing T cells does not require IL-6

Vsevolod Smolianov^a, Thomas Dehmel^a, Bernd C. Kieseier^a, Bernhard Hemmer^b, Hans Peter Hartung^a, Harald H. Hofstetter^{a,*}

^a Department of Neurology, Medical Faculty, Heinrich Heine University, Düsseldorf, Germany

^b Department of Neurology, Klinikum rechts der Isar, Technische Universität München, Munich, Germany

ARTICLE INFO

Article history:

Received 18 January 2011

Received in revised form 15 January 2012

Accepted 19 January 2012

Available online 17 February 2012

Keywords:

EAE

T cell

Cytokine

Interleukin 17

Thymus

ABSTRACT

Interleukin (IL)-17 is a potent proinflammatory cytokine for which an important role in the immune response against infections and in autoimmune diseases has been demonstrated. Recently, it has been shown that – in addition to mature T cells which are primed in the immune periphery – this cytokine can also be produced by T cells in the thymus, so-called naturally occurring IL-17-producing T cells (nT17 cells). In this study we demonstrate that the generation and activation of nT17 cells in the thymus do not depend on the cytokine IL-6. In addition, nT17 cells are not regulated by IL-2. These properties of nT17 cells significantly differ from induced IL-17-producing T cells primed in the immune periphery (iT17 cells). Given the strong association of IL-17-producing T cells with immune responses against infections and human autoimmune diseases, closer characterization of nT17 cells is warranted.

© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Interleukin-17A (IL-17) forms together with IL-17B–E and the structurally homologous IL-17F the Interleukin 17 cytokine family [1]. It is produced mainly by a subset of activated CD4⁺ T-lymphocytes distinct from T helper cells type 1 (Th1) or T helper cells type 2 (Th2), which are characterized by production of interferon γ (IFN- γ) and IL-4, respectively. Due to specific requirements for maturation, proliferation and stabilization and distinct involvement of transcription factors which are different from the development of Th1 or Th2 cells, IL-17 producing CD4⁺ T cells are considered a separate helper T cell lineage, termed Th17 [5,21]. Th17 cells play a crucial role in defense against bacterial [7,17] and fungal [44] infections, especially in mucosal surfaces, where they help in developing an early immune response against invading pathogens, creating a proinflammatory environment and, as a consequence thereof, initiating the subsequent migration of other effector immune cells such as neutrophils or macrophages into the inflamed tissue [32].

During the last years Th17 cells have been identified as important contributors to the immune response against self-antigens in several human autoimmune diseases and their respective animal models. In the rodent animal model for multiple sclerosis (MS), experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), CNS-autoantigen specific Th17 cells represent – in addition to autoaggressive

Th1 cells – a separate T-helper-cell subset which determines the severity of CNS pathology and clinical disease [8]. IL-17-knock-out (IL-17-KO) mice and mice treated with monoclonal antibodies against IL-17 develop a milder form of disease compared to unmanipulated animals, albeit with unaltered disease incidence. [11,19,22]. Moreover, strain differences in EAE susceptibility correlate with IL-17 production [31]. However, deficiency in IL-17 or IL-17F does not protect against EAE, and IL-17 overexpression in T cells does not enhance the disease severity [9]. High numbers of CNS-autoantigen-specific Th17 cells accumulate in the inflamed CNS of mice in EAE both in myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG)-induced disease in C57BL/6 mice as well as in proteolipid protein (PLP)-induced disease in SJL mice [11,12]. IL-17-producing T cells also play a role in other animal models of autoimmune disease: in collagen-induced arthritis (CIA), a model of rheumatoid arthritis, IL-17 appears to be a crucial cytokine for disease development [24]. In experimental autoimmune uveitis (EAU) IL-17 has proinflammatory activity, but is not strictly required for the development of autoimmune pathology [25]. To the contrast, a protective function has been attributed to IL-17 in a model of intestinal inflammation, suggesting a suppressive effect on Th1 differentiation as a possible disease-attenuating mechanism [34]. Patients with systemic lupus erythematosus (SLE) show higher serum levels of IL-17. Furthermore, expression of IL-17 is increased in the kidneys of lupus nephritis patients. These findings correspond with data from SNF1 and BXD2 mice, strains that develop SLE-like disease, where Th17 cells contribute to disease progression [37].

The development of CD4⁺ T cells into different T cell lineages critically depends on the cytokine microenvironment. Specific cytokines

* Corresponding author. Address: Department of Neurology, Heinrich Heine University, Moorenstrasse 5, 40225 Düsseldorf, Germany.

E-mail address: harald.hofstetter@uni-duesseldorf.de (H.H. Hofstetter).

induce the production of key transcription factors essential for the maturation of naïve T-lymphocytes to distinct T-helper cell types, their survival and further maintenance of lineage-specific cytokine production [10,36]. Transforming growth factor β (TGF- β), the main factor for differentiation of regulatory T cells, together with IL-6, a pro-inflammatory cytokine produced by cells of the innate immune system, induces the expression of signal transduction and activator of transcription (STAT) 3 and retinoic acid receptor-related orphan receptor (ROR)- γ t, thereby directing naïve CD4⁺ cells towards the Th17 developmental pathway [15,21]. IL-21, a type I cytokine, is secreted by maturing Th17 cells and acts in an autocrine fashion to promote proliferation and to amplify antigen-specific responses by the emerging Th17 cell lineage [33]. Moreover, IL-21 is produced to a smaller extent by Th1, Th2 and natural killer T (NKT) cells and can substitute for IL-6 in driving Th17 differentiation. However, this alternative pathway seems to be less effective *in vivo* [20].

IL-17-producing T cells already occur in the thymus of naïve mice [13,27,42]. These cells do not seem to originate from peripheral T cells and are therefore termed “naturally occurring T17 cells (nT17 cells)”. nT17 cells are predominantly CD4⁺CD8⁻ cells. Since thymic selection and education of naïve T-lymphocytes also represent the basis for peripheral immune responses, we investigated particular activation requirements of nT17 cells. Since microbial factors can critically interfere with selection and maturation processes in the thymus by altering the local cytokine and chemokine microenvironment and activating distinct cell types via specific cellular surface receptors, we also determined the cytokine signature of thymocytes upon stimulation by CpG-DNA, a ligand of toll-like receptor 9 (TLR9) which has been shown to stimulate thymocyte proliferation [26], and lipopolysaccharide (LPS), a TLR4 ligand, which activates the corresponding receptor on macrophages [2], conventional [40] and plasmacytoid dendritic cells [35] using the ELISPOT technique. As IL-6 has been demonstrated to be a crucial requirement for Th17 development and also determines the Treg/Th17 ratio [4], we here investigated the relationship between IL-6 and IL-17 production in murine thymocytes.

2. Materials and methods

2.1. Animals

Wild-type female C57BL/6 and BALB/c mice aged 6–10 weeks as well as IL-6 knockout (KO) mice on the C57BL/6 background were provided by and maintained at the local animal facilities. IL-6 KO mice were originally generated by Dr. Horst Bluethmann and obtained via RCC, Basel, Switzerland. All animal experiments were approved by the local authorities for animal experimentation.

2.2. Reagents

For anti-CD3 stimulation, the clone 2C-11 (BD Pharmingen, San Diego, USA) was used. The CpG oligonucleotide 1760 with the sequence ATAATCGACGTTCAAGCAAG was obtained from EurofinsMWG Synthesis (Ebersberg, Germany). LPS from *Salmonella typhimurium* was obtained from Sigma (Saint Louis, USA). Murine IL-2 was obtained from BD Biosciences (Bedford, USA). KNR7000 (α -GalCer) was obtained from Biomol (Hamburg, Germany). Stimulation in cell culture was performed with 1 μ g/ml for anti-CD3, with 10 μ g/ml for the CpG oligonucleotide, with 1 μ g/ml for LPS, 100 ng/ml for α -GalCer and 90 IU/ml for IL-2.

2.3. Cell preparations from the organs tested

After sacrificing the animals with isoflurane euthanasia, thymi were prepared. Subsequently, each thymus was squeezed using

the back of a syringe plunger to obtain a single cell suspension. To sort out cell clusters the obtained suspension was filtered through a 70 μ m cell strainer (BD Biosciences, Heidelberg, Germany). The cells were counted by trypan blue exclusion and plated together with the respective stimulants at the cell numbers indicated in serum-free HL-1 medium (Lonza, Cologne, Germany).

2.4. Cytokine measurements by ELISPOT and computer-assisted ELISPOT image analysis

ELISPOT assays were performed as described [13]. Briefly, MultiScreen HTS-IP plates (Millipore, Schwalbach, Germany) were coated overnight with the capture antibodies in sterile PBS. All antibodies were obtained from Pharmingen, San Diego, CA. The following coating antibodies were used: MP5-20F3 was used for IL-6, TC11-18H10 was used for IL-17. The plates were blocked for 1 h with sterile PBS/BSA 0.5% and washed 3 $\times$ with sterile PBS. Unsorted thymocytes were plated in HL-1 medium in triplicate cultures each. Subsequently plates were incubated at 37 °C, 5% CO₂ for 16 h. After washing with PBS followed by PBS/BSA 0.5%, detection antibodies were added overnight. Biotinylated MP5-32C11 was used for IL-6, biotinylated TC11-8H4.1 was used for IL-17. The plate bound second antibody was then visualized by adding streptavidin-alkaline phosphatase (SAV-AP, DAKO, Glostrup, Denmark) and NBT/BCIP substrate (Bio-Rad, Munich, Germany). Image analysis of ELISPOT assays was performed with the ImmunoSpot™ Analysis Software after scanning the plates with an ImmunoSpot™ Analyzer (CTL Europe, Bonn, Germany). In brief, digitized images of individual wells of the ELISPOT plates were analyzed for cytokine spots, based on the comparison of experimental wells (containing immune cells and stimuli) and control wells (immune cells, no stimuli). After separating spots that touched or partially overlapped, non-specific ‘background noise’ was gated out by applying spot size and circularity analysis as additional criteria. Then, spots that fell within the accepted criteria were highlighted and counted. Single wells which could not be enumerated because of confluence phenomena were assessed by using the highest numbers of cytokine-producing cells which could be regularly counted in other wells in the same assay as an approximated estimate.

2.5. Statistical analysis

For statistical analysis, the two-sided *t*-test (GraphPad PRISM 4 software, La Jolla, USA) was used. Differences at *p* < 0.05 were considered statistically significant.

3. Results

3.1. Effects of CpG on IL-6 and IL-17 production by BALB/c and C57BL/6 thymocytes

As shown in Fig. 1A and B, CpG stimulation alone led to high frequencies of IL-6 producing cells both in BALB/c and C57BL/6 thymocytes with low or absent IL-17 production, respectively. Comparable frequencies of IL-6 producing cells in BALB/c and in C57BL/6 mice were detected for each stimulation regimen after *in vitro* challenge with α -CD3 Ab, CpG and both agents combined, respectively. CD3 stimulation alone led to IL-17 production in both mouse strains in the complete absence of IL-6-producing cells. Compared to BALB/c thymocytes, lower absolute numbers of IL-17 producing cells were detectable in C57BL/6 thymi after CD3 and combined stimulation (*p* < 0.01). For both IL-17 (*p* < 0.05) and IL-6 (*p* < 0.01), combined stimulation with both CD3 and CpG had a statistically significant augmenting effect on BALB/c as well

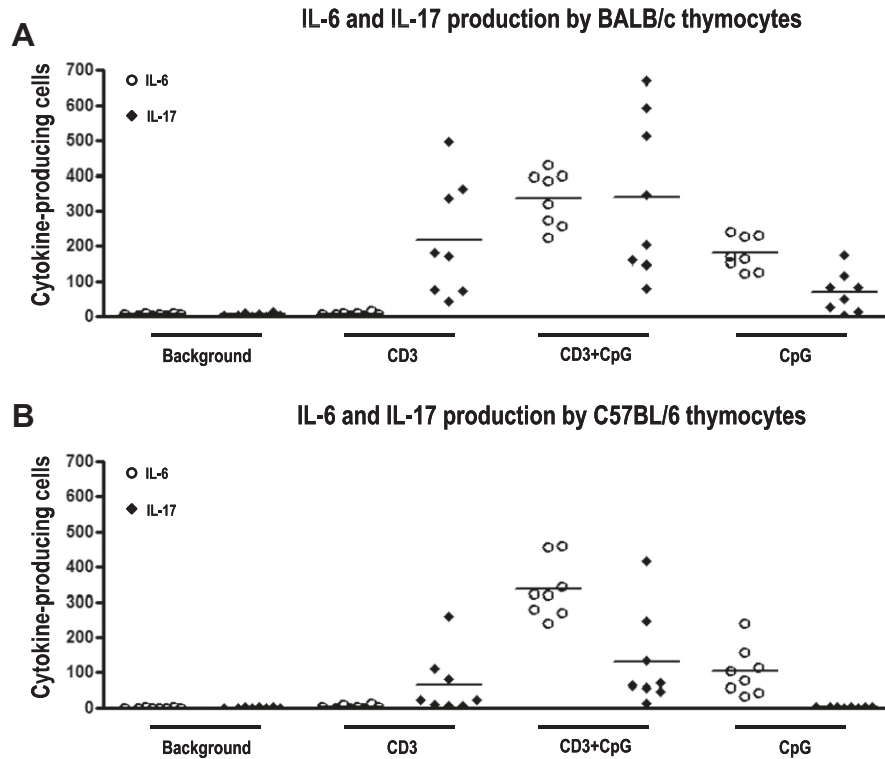


Fig. 1. IL-6 and IL-17 production by BALB/c (A) and C57BL/6 (B) thymocytes after stimulation with α -CD3 Ab, CpG and both agents. Thymocytes of naïve female BALB/c (A) or C57BL/6 (B) mice were freshly isolated *ex vivo* and stimulated as indicated. The cumulative data of eight animals tested individually in two independent experiments are shown.

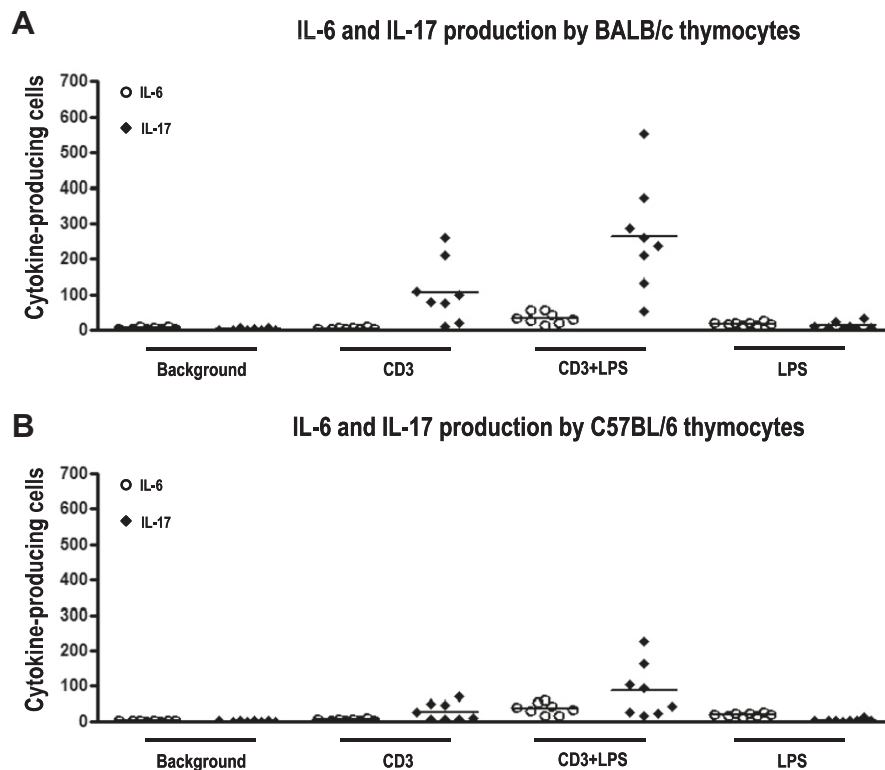


Fig. 2. IL-6 and IL-17 production by BALB/c (A) and C57BL/6 (B) thymocytes after stimulation with α -CD3 Ab, LPS and both agents. Thymocytes of naïve female BALB/c (A) or C57BL/6 (B) mice were freshly isolated *ex vivo* and stimulated as indicated. The cumulative data of eight animals tested individually in two independent experiments are shown.

as on C57BL/6 thymocytes in comparison to single stimulation with either CD3 or CpG.

3.2. Effects of LPS on IL-6 and IL-17 production by BALB/c and C57BL/6 thymocytes

In contrast to CpG stimulation, only minor IL-6 production was triggered by LPS both after single and combined stimulation, an effect present in BALB/c as well as in C57BL/6 thymocytes. These data are shown in Fig. 2A and B. Still, a potent effect of LPS as a co-stimulant was demonstrated by augmentation of IL-17 production in both mouse strains ($p < 0.01$).

3.3. Comparable frequencies of IL-17 producing thymocytes are detectable in both wild-type C57BL/6 and IL-6-KO mice after CD3 stimulation

To confirm that IL-17 production in the thymus does not depend on IL-6 we compared IL-17 responses of IL-6-KO and C57BL/6 thymocytes. As shown in Fig. 3, the frequencies of IL-17 producing cells after CD3 stimulation were in average practically identical in both mouse strains, the difference was statistically not significant.

3.4. IL-2 does not regulate thymic IL-17 production both in BALB/c and C57BL/6 mice

To investigate whether nT17 cells differ from iT17 cells not only in regard of the requirement for IL-6, we tested the impact of IL-2 on the ability of thymocyte IL-17 production. In C57BL/6 thymocytes, IL-2 did not downregulate IL-17 production upon stimulation with α -CD3 (Fig. 4B). In BALB/c thymocytes, the number of IL-17-producing cells was even increased by additional IL-2 stimulation compared to CD3-stimulation alone ($p < 0.05$) (Fig. 4A).

3.5. α -GalCer shows no effect on thymic IL-17 production both in BALB/c and C57BL/6 mice

To clarify a possible contribution of invariant NKT (iNKT) cells to thymic IL-17 production, we utilized a potent activating ligand for iNKT cells, α -galactosylceramide (α -GalCer). Overall, we could not detect any modulation on thymic IL-17 production in both mouse strains (Fig. 5).

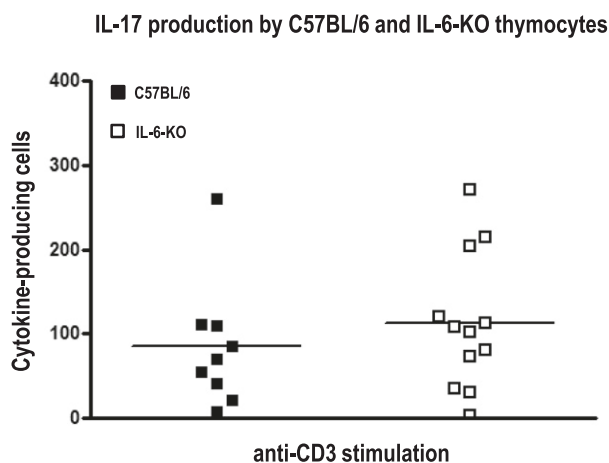


Fig. 3. IL-17 production by thymocytes from C57BL/6 and IL-6 KO mice after stimulation with α -CD3 Ab. Thymocytes of naïve female C57BL/6 and IL-6-KO mice were freshly isolated *ex vivo* and stimulated as indicated. Animals tested in overall three experiments are shown, each symbol reflects thymocytes from one animal tested individually. The bars represent the mean values in each group.

4. Discussion

In the last years, IL-17 and IL-17-producing T cells have moved into the focus of interest in several areas of T cell immunology. A specific emphasis has been placed on their role in infection and autoimmunity, in particular on the exogenous factors, which activate Th17 cells and the endogenous differentiation and transcription factors which are necessary for Th17 development [5,21]. Other leukocyte subsets, e.g. iNKT cells and $\gamma\delta$ T cells have also been identified as potential sources of IL-17 production [29,41]. However, almost exclusively, the role of induced Th17 cells (iT17) has been investigated, since the studies available so far have mainly focused on the generation of IL-17-producing mature T cells. These emerge from naïve T cells in the immune periphery, which have already passed thymic selection and have subsequently been activated in inflammatory settings *in vivo* or have been skewed towards a phenotype capable of IL-17 production in polarizing conditions *in vitro*. In contrast, the current literature only contains a few reports on the corresponding characteristics of naturally occurring IL-17-producing T cells in the thymus [13,27,41].

In this study we addressed the potential role of IL-6 for the activation of naturally occurring IL-17 producing T cells. IL-6 is a key requirement for generation of induced IL-17-producing T cells and can skew naïve CD4⁺ cells towards a Th17 profile opposed to regulatory T cell (Treg) commitment [4]. Hereby microbial stimuli have been shown to have an important influence [6,43]. Therefore,

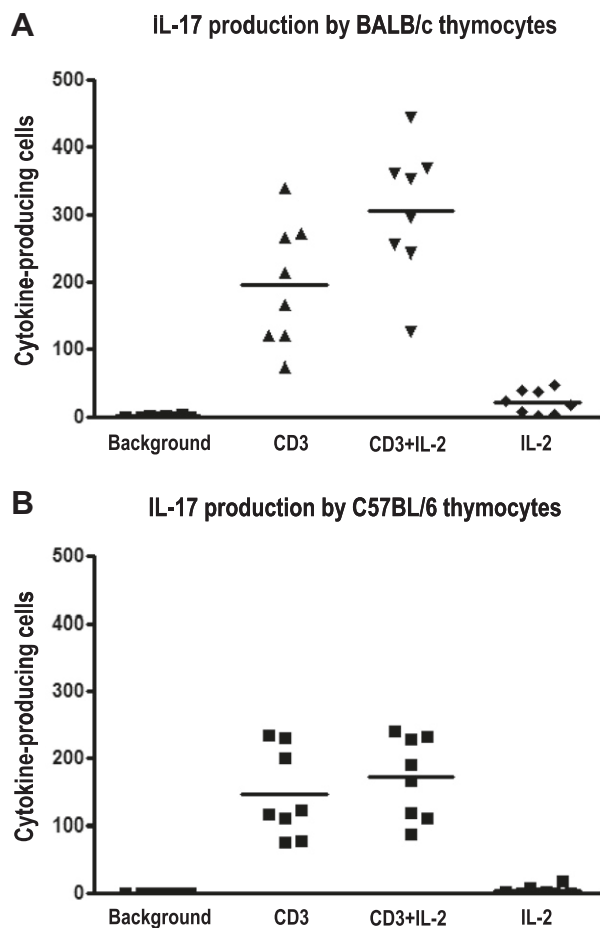


Fig. 4. IL-17 production by BALB/c (A) and C57BL/6 (B) thymocytes after stimulation with α -CD3 Ab, IL-2 and both agents. Thymocytes of naïve female BALB/c (A) and C57BL/6 (B) mice were freshly isolated *ex vivo* and stimulated as indicated. The cumulative data of eight animals tested individually in two independent experiments are shown.

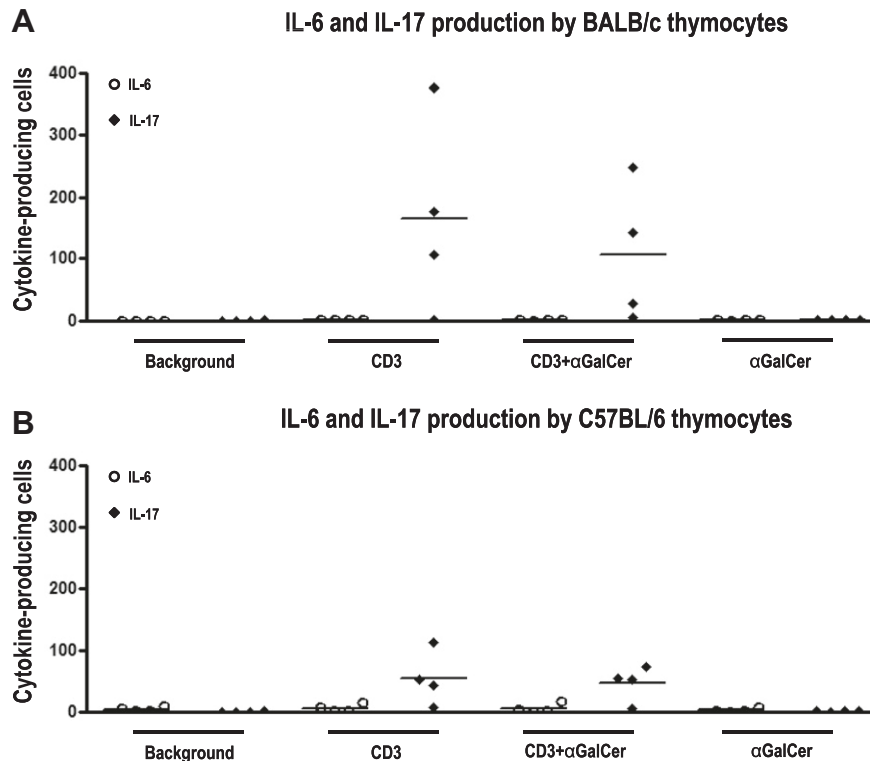


Fig. 5. IL-17 production by BALB/c (A) and C57BL/6 (B) thymocytes after stimulation with α -CD3 Ab, α -GalCer and both agents. Thymocytes of naïve female BALB/c (A) and C57BL/6 (B) mice were freshly isolated *ex vivo* and stimulated as indicated. The data of four animals tested individually in one experiment are shown.

we utilized the TLR ligands CpG and LPS to simulate in a simple *ex vivo* model the presence of an infectious agent in the thymic microenvironment. Our results indicate that CpG and LPS lead to distinct cytokine activation patterns in thymocytes, independently of the mouse strain investigated. CpG induced a considerably stronger IL-6 production than LPS in both mouse strains either when used alone or in combination with CD3 stimulation. However, this did not correlate with IL-17 production. On the other hand induction of IL-17 production with CD3 stimulation alone and potentiation of CD3-induced IL-17 production by LPS was not accompanied by relevant IL-6 production. Overall, this indicates that – independently from the genetic background – there is no strict correlation between IL-6 and IL-17 in the thymus. As a consequence, the expression of these two inflammatory mediators in the thymus is not (in either way) mandatorily linked to each other. This conclusion is extended by the findings in thymocytes of IL-6-KO mice on a C57BL/6 background, in which the frequencies of nT17 cells were virtually identical with those from wild type C57BL/6 mice upon CD3 stimulation. Overall, IL-6 appears to be dispensable for generation and activation of nT17 cells in the thymus. However, this might be only one of (potentially many) differences between nT17 and iT17 cells. A recent study demonstrated that IL-2 inhibits Th17 polarization in the immune periphery [23]. Although there are differences between our study and the work of Laurence and colleagues referred to above in regard to cell populations studied (unsorted thymocytes vs. purified CD4⁺ CD62L⁺ CD44[−] CD25[−] T cells) we surmise that this principle does not seem to apply to IL-17-producing T cells in the thymus. In line with this suggestion, we even observed a mild augmentation of the frequencies of nT17 cells after combined stimulation with α -CD3 Ab and IL-2 compared to activation of thymocytes by CD3 stimulation alone. Hence, nT17 and iT17 cells are also in this aspect different. This part of the data also confirms that iT17 cells primed in the periphery do not seem to re-migrate to the thymus, as we have demonstrated previously in an earlier study [14].

IL-6-independent production of IL-17 by specific T cell subpopulations has been reported previously: thymic iNKT cells can on the one hand inhibit development of Th17 lineage in the periphery [28], but on the other hand are capable of IL-17 production by themselves and are an IL-6 independent cell population [38]. This prompted us to test the possible contribution of iNKT cells to IL-17 production in our experimental system. α -galactosylceramide, a potent activator of iNKT cells, only led to a very low production of IL-17 with no additional effect on the frequencies of IL-17 producers induced by CD3. Thymic IL-17 producing iNKT cells are described as CD4[−] [30]; however most of the IL-17 producers in the thymus are CD4⁺CD8[−] [13]. Although we can not formally exclude iNKT cells as possible producers of IL-17 in the thymus, our results and the observations of others [27] therefore indicate a negligible contribution of iNKT cells to thymic IL-17 production. Studies describing thymic $\gamma\delta$ T cells as another source of IL-17 have been recently published: Ribot and co-workers demonstrated the presence of IL-17-producing, IL-6 independent $\gamma\delta$ T cells in the thymus and discriminated them from interferon- γ -producing $\gamma\delta$ T cells by lack of CD27 expression on the surface of the former cell type [39]. Another study describes antigen encounter in the thymus as a watershed event for developing $\gamma\delta$ T cells in respect of their future cytokine production, whereby antigen-naïve cells make IL-17 and antigen-experienced cells produce IFN- γ [16]. The question whether populations described in these two independent studies correspond, is unresolved and has to be addressed in future investigations. However, our own previous results and current unpublished observations have shown that CD3⁺ CD4[−] CD8[−] cells (which contain the $\gamma\delta$ T cells) clearly represent the smallest fraction of IL-17 producing thymocytes [13], and the contribution of $\gamma\delta$ T cells to thymic IL-17 production is, at least in our experimental setting, negligible.

A recent landmark study using a double-transgenic mouse model showed that CD4⁺CD8[−] thymocytes with a CD44⁺ memory cell-like phenotype and surface markers also found on iT17 cells

effectively produce IL-17 [27]. The fact that these cells depend – in contrast to the results of our own study – on IL-6 could be due to certain intrinsic properties of double-transgenic models in which the majority of developing thymocytes encounter their antigen early and therefore might not mirror in all details their counterparts in thymus of genetically unaltered mice. In another study, nTh17 cells have been demonstrated to be IL-6-independent in a technologically different experimental setting [41]. In a recently published work on thymic IL-17 production nTh17 cells have been further delineated; this innate-like cell type is described as MHC class II-dependent and fundamentally different with regard to the TCR repertoire and development requirements compared to iTTh17 cells [18].

The majority of thymic IL-17 producers is among the CD4⁺CD8[−] subset [13], therefore nTh17 cells are the most important contributors (among all nT17 cells) to thymocyte IL-17 production. Given the importance of this cell type in the early phase of airway inflammation [41] and protective capacities of nTh17 during the course of toxin-induced hepatitis [27], our findings that thymocyte activation and subsequent thymic IL-17 production can be enhanced by TLR ligands (being paradigms for particles associated with infectious agents) either directly [3,26] or indirectly [2,35,40] could be of interest, showing the readiness of nT17 to quickly react before primed iT17 are ready to do so.

To summarize, our study shows that IL-17 production in the thymus (i) does not correlate with IL-6 production and vice versa, (ii) does itself not depend on IL-6, and (iii) is not regulated by IL-2. Since these properties of nT17 cells represent fundamental differences in comparison with induced IL-17-producing T cells primed in the immune periphery, further studies on nT17 cells are warranted, in particular on their role in infectious diseases and autoimmune pathology.

Acknowledgements

We thank Anne Mausberg and Mark Stettner for helpful discussions. H.H.H. and V.S. were supported by a Grant of the Forschungskommission der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf (No. 9772322). H.H.H. was also supported by a Grant of the Deutsche Forschungsgemeinschaft (Ho 4392/1-1), of the Strategischer Forschungsfonds der HHU Düsseldorf and of the Deutsche Multiple Sklerose Gesellschaft. B.H. was supported by a Grant of the Deutsche Forschungsgemeinschaft (He 2386/5-2).

References

- [1] Aggarwal S, Gurney AL. IL-17: prototype member of an emerging cytokine family. *J Leukoc Biol* 2002;71:1–8.
- [2] Applequist SE, Wallin RP, Ljunggren HG. Variable expression of Toll-like receptor in murine innate and adaptive immune cell lines. *Int Immunol* 2002;14(9):1065–74.
- [3] Bendigs S, Salzer U, Lipford GB, Wagner H, Heeg K. CpG-oligodeoxynucleotides co-stimulate primary T cells in the absence of antigen-presenting cells. *Eur J Immunol* 1999;29:1209–18.
- [4] Bettelli E, Carrier Y, Gao W, Korn T, Strom TB, Oukka M, et al. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector Th17 and regulatory T cells. *Nature* 2006;441:235–8.
- [5] Dong C. Differentiation and function of proinflammatory Th17 cells. *Microbes Infect* 2009;11:584–8.
- [6] Fang C, Zhang X, Miwa T, Song WC. Complement promotes the development of inflammatory T-helper 17 cells through synergistic interaction with toll-like receptor signaling and interleukin 6 production. *Blood* 2009;114:1005–15.
- [7] Freitas A, Alves-Filho JC, Victoni T, Secher T, Lemos HP, Sonego F, et al. IL-17 receptor signaling is required to control polymicrobial sepsis. *J Immunol* 2009;182:7846–54.
- [8] Gold R, Lühder F. Interleukin-17 – extended features of a key player in multiple sclerosis. *Am J Pathol* 2008;172:8–10.
- [9] Haak S, Croxford AL, Kreymborg K, Heppner FL, Pouly S, Becher B, et al. IL-17A and IL-17F do not contribute vitally to autoimmune neuro-inflammation in mice. *J Clin Invest* 2008;119:61–9.
- [10] Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, Turner H, Murphy TL, Murphy KM, et al. Interleukin 17-producing CD4⁺ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol* 2005;6:1123–32.
- [11] Hofstetter HH, Ibrahim SM, Koczan D, Kruse N, Weishaupt A, Toyka KV, et al. Therapeutic efficacy of IL-17 neutralization in murine experimental autoimmune encephalomyelitis. *Cell Immunol* 2005;237:123–30.
- [12] Hofstetter HH, Toyka KV, Tary-Lehmann M, Lehmann PV. Kinetics and organ distribution of IL-17-producing CD4 cells in proteolipid protein 139–151 peptide-induced experimental autoimmune encephalomyelitis of SJL mice. *J Immunol* 2007;178:1372–8.
- [13] Hofstetter HH, Lühder F, Toyka KV, Gold R. IL-17 production by thymocytes upon CD3 stimulation and costimulation with microbial factors. *Cytokine* 2006;34:184–97.
- [14] Hofstetter H, Grau C, Buttmann M, Forsthuber TG, Gaupp S, Toyka KV, et al. The PLPP-specific T-cell population promoted by pertussis toxin is characterized by high frequencies of IL-17 producing cells. *Cytokine* 2007;40:35–43.
- [15] Ivanov II, McKenzie BS, Zhou L, Tadokoro CE, Lepelletier A, Lafaille JJ, et al. The orphan nuclear receptor ROR γ directs the differentiation program of proinflammatory IL-17⁺ T helper cells. *Cell* 2006;126:1121–33.
- [16] Jensen KD, Su X, Shin S, Li L, Youssef S, Yamasaki S, et al. Thymic selection determines gamma-delta T cell effector fate: antigen-naïve cells make interleukin-17 and antigen-experienced cells make interferon-gamma. *Immunity* 2008;29:90–100.
- [17] Khader SA, Bell GK, Pearl JE, Fountain JJ, Rangel-Moreno J, Cilley GE, et al. IL-23 and IL-17 in the establishment of protective pulmonary CD4⁺ T cell responses after vaccination and during *Mycobacterium tuberculosis* challenge. *Nat Immunol* 2007;8:369–77.
- [18] Kim JS, Smith-Garvin JE, Koretzky GA, Jordan MS. The requirements for natural Th17 cell development are distinct from those of conventional Th17 cells. *J Exp Med* 2011 [Epub ahead of print].
- [19] Komiyama Y, Nakae S, Matsuki T, Nambu A, Ishigame H, Kakuta S, et al. IL-17 plays an important role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 2006;177:566–73.
- [20] Korn T, Bettelli E, Gao W, Awasthi A, Jäger A, Strom TB, et al. IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory T(H)17 cells. *Nature* 2007;448:484–7.
- [21] Korn T, Oukka M, Bettelli E. Th17 cells: effector T cells with inflammatory properties. *Semin Immunol* 2007;19:362–71.
- [22] Langrish CL, Chen Y, Blumenschein WM, Mattson J, Basham B, Sedgwick JD, et al. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J Exp Med* 2005;201:233–40.
- [23] Laurence A, Tato CM, Davidson TS, Kanno Y, Chen Z, Yao Z, et al. Interleukin 2 signaling via STAT5 constrains T helper 17 cell generation. *Immunity* 2007;26:371–81.
- [24] Lubberts E, Koenders MI, van den Berg WB. The role of T cell interleukin-17 in conducting destructive arthritis: lessons from animal models. *Arthritis Res Ther* 2005;7:29–37.
- [25] Luger D, Silver PB, Tang J, Cua D, Chen Z, Iwakura Y, et al. Either a Th17 or a Th1 effector response can drive autoimmunity: conditions of disease induction affect dominant effector category. *J Exp Med* 2008;205:799–810.
- [26] Mannon RB, Nataraj C, Pisetsky DS. Stimulation of thymocyte proliferation by phosphorothioate DNA oligonucleotides. *Cell Immunol* 2000;201:14–21.
- [27] Marks BR, Nowyhed HN, Choi JY, Poholek AC, Odegard JM, Flavell RA, et al. Thymic self-reactivity selects natural interleukin 17-producing T cells that can regulate peripheral inflammation. *Nat Immunol* 2009;10:1132.
- [28] Mars LT, Araujo L, Kerschen P, Diem S, Bourgeois E, Van LLP, et al. Invariant NKT cells inhibit development of the Th17 lineage. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009;106:6238–43.
- [29] Michel ML, Keller AC, Paget C, Fujino M, Trottein F, Savage PB, et al. Identification of an IL-17-producing NK1.1(neg) iNKT cell population involved in airway neutrophilia. *J Exp Med* 2007;204:995–1001.
- [30] Michel ML, Mendes-da-Cruz D, Keller AC, Lochner M, Schneider E, Dy M, et al. Critical role of ROR γ in a new thymic pathway leading to IL-17-producing invariant NKT cell differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105:19845–50.
- [31] Miljkovic D, Stosic-Grujicic S, Markovic M, Momcilovic M, Ramic Z, Maksimovic-Ivanic D, et al. Strain difference in susceptibility to experimental autoimmune encephalomyelitis between Albino Oxford and Dark Agouti rats correlates with disparity in production of IL-17, but not nitric oxide. *J Neurosci Res* 2006;84:379–88.
- [32] Miyamoto M, Prause O, Sjöstrand M, Laan M, Lötvall J, Linden A. Endogenous IL-17 as a mediator of neutrophil recruitment caused by endotoxin exposure in mouse airways. *J Immunol* 2003;170:4665–72.
- [33] Nurieva R, Yang XO, Martinez G, Zhang Y, Panopoulos AD, Ma L, et al. Essential autocrine regulation by IL-21 in the generation of inflammatory T cells. *Nature* 2007;448:480–3.
- [34] O'Connor Jr W, Kamanaka M, Booth CJ, Town T, Nakae S, Iwakura Y, et al. A protective function for interleukin 17A in T cell-mediated intestinal inflammation. *Nat Immunol* 2009;10:603–9.
- [35] Okada T, Lian ZX, Naiki M, Ansari AA, Ikehara S, Gerschwinn ME. Murine thymic plasmacytoid dendritic cells. *Eur J Immunol* 2000;33:1012–9.
- [36] Park H, Li Z, Yang XO, Chang SH, Nurieva R, Wang YH, et al. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol* 2005;6:1133–41.
- [37] Pernis AB. Th17 cells in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *J Intern Med* 2009;265:644–52.

- [38] Rachitskaya AV, Hansen AM, Horai R, Li Z, Villasmil R, Luger D, et al. NKT cells constitutively express IL-23 receptor and RORgammat and rapidly produce IL-17 upon receptor ligation in an IL-6-independent fashion. *J Immunol* 2008;180:5167–71.
- [39] Ribot JC, deBarros A, Pang DJ, Neves JF, Peperuzak V, Roberts SJ, et al. CD 27 is a thymic determinant of the balance between interferon-gamma and interleukin-17-producing gamma-delta T cell subsets. *Nat Immunol* 2009;10:427–36.
- [40] Richez C, Yasuda K, Watkins AA, Akira S, Lafyatis R, van Seventer JM, et al. TLR4 ligands induce IFN-alpha production by mouse conventional dendritic cells and human monocytes after IFN-beta priming. *J Immunol* 2009;182(2):820–8.
- [41] Roark CL, Simonian PL, Fontenot AP, Born WK, O'Brien RL. Gamma-delta T cells: an important source of IL-17. *Curr Opin Immunol* 2008;20:353–7.
- [42] Tanaka S, Yoshimoto T, Naka T, Nakae S, Iwakura Y, Cua D, et al. Natural occurring IL-17 producing T cells regulate the initial phase of neutrophil mediated airway responses. *J Immunol* 2009;183:7523–30.
- [43] Torchinsky MB, Garaude J, Martin AP, Blander JM. Innate immune recognition of infected apoptotic cells directs T(h)17 cell differentiation. *Nature* 2009;458:78–82.
- [44] Van de Veerdonk FL, Marijnissen RJ, Kullberg BJ, Koenen HJ, Cheng SC, Joosten I, et al. The macrophage mannose receptor induces IL-17 in response to *Candida albicans*. *Cell Host Microbe* 2009;5:329–40.

RESEARCH

Open Access

Alteration of T cell cytokine production in PLPp-139-151-induced EAE in SJL mice by an immunostimulatory CpG Oligonucleotide

Vsevolod Smolianov¹, Thomas Dehmel¹, Patrick Vollmar², Anne K Mausberg¹, Bernd C Kieseier¹, Bernhard Hemmer², Hans P Hartung¹ and Harald H Hofstetter^{1*}

Abstract

Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) is - in certain aspects - regarded as an animal model of the human CNS autoimmune disease multiple sclerosis (MS). While in EAE CNS-autoantigen-specific immunity is induced in a defined way, the initial processes leading to CNS autoimmunity in humans are so far unknown. Despite essential restrictions, which exist regarding the interpretation of EAE data towards MS, EAE might be a useful model to study certain basic aspects of CNS autoimmunity. Studies in MS have demonstrated that established autoimmune pathology can be critically influenced by environmental factors, in particular viral and bacterial infections. To investigate this interaction, EAE as an instrument to study CNS autoimmunity under defined conditions appears to be a suitable experimental tool. For this reason, we here investigated the influence of the Toll-like-receptor (TLR) ligand CpG oligonucleotide (CpG) on already established CNS autoimmunity in murine proteolipid protein (PLP)-induced EAE in SJL mice. CpG were found to co-stimulate PLPp-specific IFN- γ production in the peripheral immune system and in the CNS. However, CpG induced Interleukin (IL)-17 production in the inflamed CNS both alone and in combination with additional PLPp stimulation. These findings might indicate a mechanism by which systemic infections and the microbial stimuli associated with them may influence already existing CNS autoimmune pathology.

Background

Research on the role of T cells in CNS autoimmune disease both in human diseases as well as in their experimental animal models currently centers on the endogenous requirements which are necessary for T cell activation as well as on the exogenous factors which trigger it. Among the environmental elements, which can influence this process (both in a positive and negative way), infections are considered important [1;2]. These include both viral and bacterial infections as well as the pathogenic factors which are associated with them. The potential role of microbial pathogens in triggering autoimmune disease has been extensively studied both in humans as well as in experimental animal models. As an example for one of many infectious agents which have been discussed as the cause of MS, a

positive association between Epstein-Barr virus (EBV) infection and increased risk of developing MS thereafter has been broadly discussed [3]. Such clinical observations have been supported by basic observations from cell culture models which try to explain how infectious agents can affect the CNS and facilitate key steps in MS pathogenesis, e.g. through creating a local proinflammatory milieu in the early stages of disease [4]. In the EAE mouse model, there is currently increasing evidence for a critical role of commensal gut microbiota in the initiation of CNS autoimmunity, as demonstrated by experiments in which reduction of the commensal microflora by antibiotic treatment inhibits the development of EAE [5]. However, despite the fact that disease progression or relapse is clinically to the same extent associated with bacterial or viral infection as the beginning of disease, in particular in the case of MS [6-9], the influence of these pathogenic conditions on already established autoimmune disease has received less attention. In EAE

* Correspondence: harald.hofstetter@uni-duesseldorf.de

¹Department of Neurology, Heinrich Heine University, Düsseldorf, Germany
Full list of author information is available at the end of the article

in the SJL mouse model lipopolysaccharide, a TLR 4 ligand, has been shown to be able to induce relapses via antigen presenting cell (APC)-dependent activation of autoantigen-specific T cells [10].

When studying the impact of infection on ongoing CNS autoimmunity, a differentiated setup has to be chosen. First, systemic effects of a microbial stimulus on the autoimmune T cell population might differ from its effects in the CNS [11;12]. Second, different T cell populations might be affected in a distinct way, which might also be different in the periphery and in the inflamed CNS. T cell populations that are currently implied in CNS autoimmune pathology are Th1 and Th17 cells, which are characterized by the production of IFN- γ and IL-17, respectively [13]. Both cytokines are important mediators of disease and tissue damage in CNS autoimmunity, albeit with different roles in the autoimmune process and different resulting pathology [14-16].

For this reason, it was the purpose of this study to investigate the influence of CpG as a paradigm of a microbial stimulus which is able to activate both APC [17] as well as T cells directly [18] on the PLPp-specific T cell cytokine production in EAE in SJL mice, in particular in regard of IFN- γ and IL-17.

Methods

Animals, antigens and treatments

Female SJL/J mice at age 6-8 wk were purchased from Charles River (Sulzfeld, Germany) and maintained at the local animal facilities. Mice were divided in two groups and immunized subcutaneously either with 100 μ g PLP peptide amino acids 139-151 (PLPp, Biotrend, Cologne, Germany) and 100 μ g CpG oligonucleotide 1760 with the sequence ATAATCGACGTTCAAGCAAG (CpG, Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Germany) in incomplete Freund's adjuvant (IFA, Difco, Detroit, USA) or with 100 μ g PLPp in complete Freund's adjuvant (CFA, Difco, Detroit, USA). Mice immunized with PLPp in CFA were additionally given two intraperitoneal applications of 400 ng pertussis toxin (PTX, Sigma, Deisenhofen, Germany) in 500 μ l phosphate buffered saline (PBS) on day 0 and day 2 after immunization. PLPp/CFA was prepared by mixing PLPp in CFA yielding a final concentration of 1 mg/ml. PLPp/CpG/IFA was prepared by mixing PLPp and CpG in IFA yielding a final concentration of 1 mg/ml for both agents. Mice were assessed daily for the development of paralytic symptoms, and the severity of disease was recorded according to a standard scale: grade 1, floppy tail; grade 2: hind leg weakness; grade 3: full hind leg paralysis; grade 4: quadriplegia; and grade 5: death. Access to food and drinking water was ensured for all mice, including those with paralysis. All animal experiments were approved by the local authorities for animal experimentation.

Cell preparation from the organs tested

After sacrificing the animals with isoflurane euthanasia, spleens and spinal cords were prepared as described previously [19]. Subsequently, single cell suspensions were made. The cells were counted by trypan blue exclusion and plated at the cell numbers indicated in HL-1 medium (Lonza, Cologne, Germany).

Adoptive transfer experiments

For adoptive transfer experiments, spleen cells were prepared from female SJL mice injected with PLPp/CFA and PTX as described above at day 7 after immunization. The resulting cells were incubated for three days in HL-1 medium at 37°C, 5% CO₂ with PLPp (concentration 20 μ g/ml) alone or with PLPp plus CpG (concentration 10 μ g/ml). At the end of the incubation period cells were washed carefully several times and 40×10^6 cells were injected intraperitoneally per recipient mouse. Mice were assessed daily for the development of paralytic symptoms, and the severity of disease was recorded as described above.

Stimulation regimens, cytokine measurements by ELISPOT and computer-assisted ELISPOT image analysis

ELISPOT assays were performed as described previously [20]. Briefly, MultiScreen HTS-IP plates (Millipore, Schwalbach, Germany) were coated overnight with the capture antibodies in sterile PBS. All antibodies were obtained from BD Pharmingen, San Diego, CA. The following coating antibodies were used: R4-6A2 was used for IFN- γ , JES6-1A12 was used for IL-2 and TC11-18H10 was used for IL-17. Plates were blocked for 1 h with sterile PBS/BSA 0,5% and washed 3 $\times$ with sterile PBS. Splenocytes were plated in HL-1 medium in triplicate cultures each. Spinal cord single cell suspensions were pooled from 3 to 4 animals and plated in HL-1 medium in duplicate wells. Thereafter cells were stimulated with PLPp (final concentration of 20 μ g/ml), with CpG (final concentration of 10 μ g/ml) or with both agents. Subsequently plates were incubated at 37°C, 5% CO₂ for 16 h. After washing with PBS followed by PBS/BSA 0,5%, detection antibodies were added overnight. Biotinylated XMG1.2 was used for IFN- γ , biotinylated JES6-5H4 was used for IL-2, biotinylated TC11-8H4.1 was used for IL-17. The plate bound second antibody was then visualized by adding streptavidin-alkaline phosphatase (SAV-AP, DAKO, Glostrup, Denmark) and NBT/BCIP substrate (Bio-Rad, Munich, Germany). Image analysis of ELISPOT assays was performed with the ImmunoSpot™ Analysis Software after scanning the plates with an ImmunoSpot™ Analyzer (CTL-Europe, Bonn, Germany). In brief, digitized images of individual wells of the ELISPOT plates were analyzed for cytokine spots, based on the comparison of experimental wells

(containing immune cells and stimuli) and control wells (immune cells, no stimuli). After separating spots that touched or partially overlapped, non-specific 'background noise' was gated out by applying spot size and circularity analysis as additional criteria. Then, spots that fell within the accepted criteria were highlighted and counted. Single wells which could not be enumerated because of confluence phenomena were assessed by using the highest numbers of cytokine-producing cells which could be regularly counted in other wells in the same assay as an approximated estimate.

Statistical analysis

For statistical analysis, the two-sided *t*-test for different variances (GraphPad PRISM 4 software, La Jolla, USA) was used. Differences at $p < 0.05$ were considered statistically significant.

Results

Injection of SJL mice with PLPp/CPG/IFA does not result in clinical disease

To study the impact of TLR9 stimulation during the priming of the autoreactive T cell response, we immunized SJL mice with PLPp emulsified in CpG/IFA (PLPp/CpG/IFA). In contrast to the mice immunized according to the standard protocol at the same time, no clinical signs of EAE were observed (Figure 1), consistent with previously reported results by others [21;22]. No signs of EAE were seen during the entire observation period of 90 days. SJL mice immunized with PLPp in CFA and 2 subsequent applications of PTX (PLPp/CFA/PTX) developed severe EAE.

Injection of SJL mice with PLPp/CPG/IFA results in a PLPp-specific Th1 response, but not a Th17 response

To investigate whether autoantigen specific T lymphocytes are present in the peripheral lymphatic tissue of mice immunized with PLPp/CpG/IFA, measurements of cytokine expression (IFN- γ , IL-2, IL-17) in the spleens of animals were conducted by ELISPOT at day 14 after immunisation. High numbers of IFN- γ - (mean: 104.67, SD: 42.82) and IL-2- (mean: 168.72, SD: 73.44) producing cells were identified after restimulation with PLPp (Figure 2A and 2B). Combined stimulation with PLPp and CpG led to strong up-regulation of IFN- γ production (mean: 626.31, SD: 370.19) in comparison to stimulation with PLPp alone ($p < 0.01$), but the number of IL-2 producing cells (mean: 188.28, SD: 64.79) did not change significantly. Almost no IL-17 producing cells (mean: 4.19, SD: 3.22) were present in the spleens of mice immunized according to the alternative protocol (Figure 2C). Additional stimulation with CpG did not lead to induction of higher numbers of IL-17 secreting cells (mean: 2.33, SD: 2.52).

CpG enhance PLPp-specific IFN- γ production in spleens of mice during acute EAE, but have no effect on PLPp-specific IL-17 production

To assess the impact of TLR 9 ligation on PLPp-specific cytokine responses in the spleens of mice immunized according to the standard (PLPp/CFA/PTX) protocol, we conducted measurements on splenocytes of mice sacrificed on day 12 after EAE induction. High frequencies of IFN- γ - (mean: 183.24, SD: 143.62) and IL-2-producing (mean: 519.09, SD: 384.08), PLPp-specific T cells

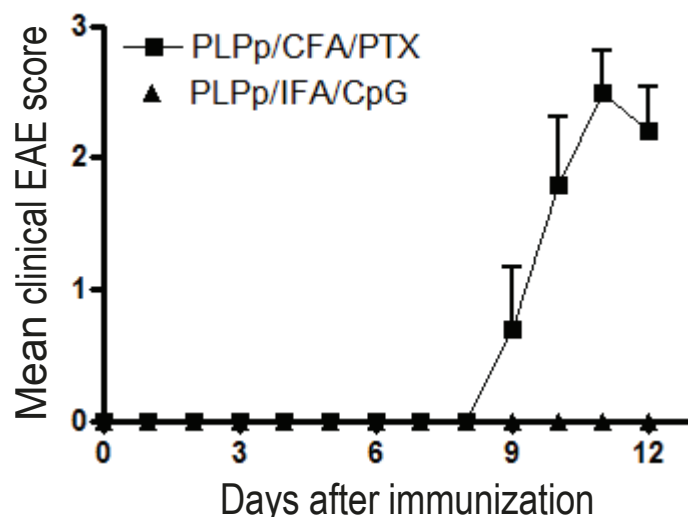
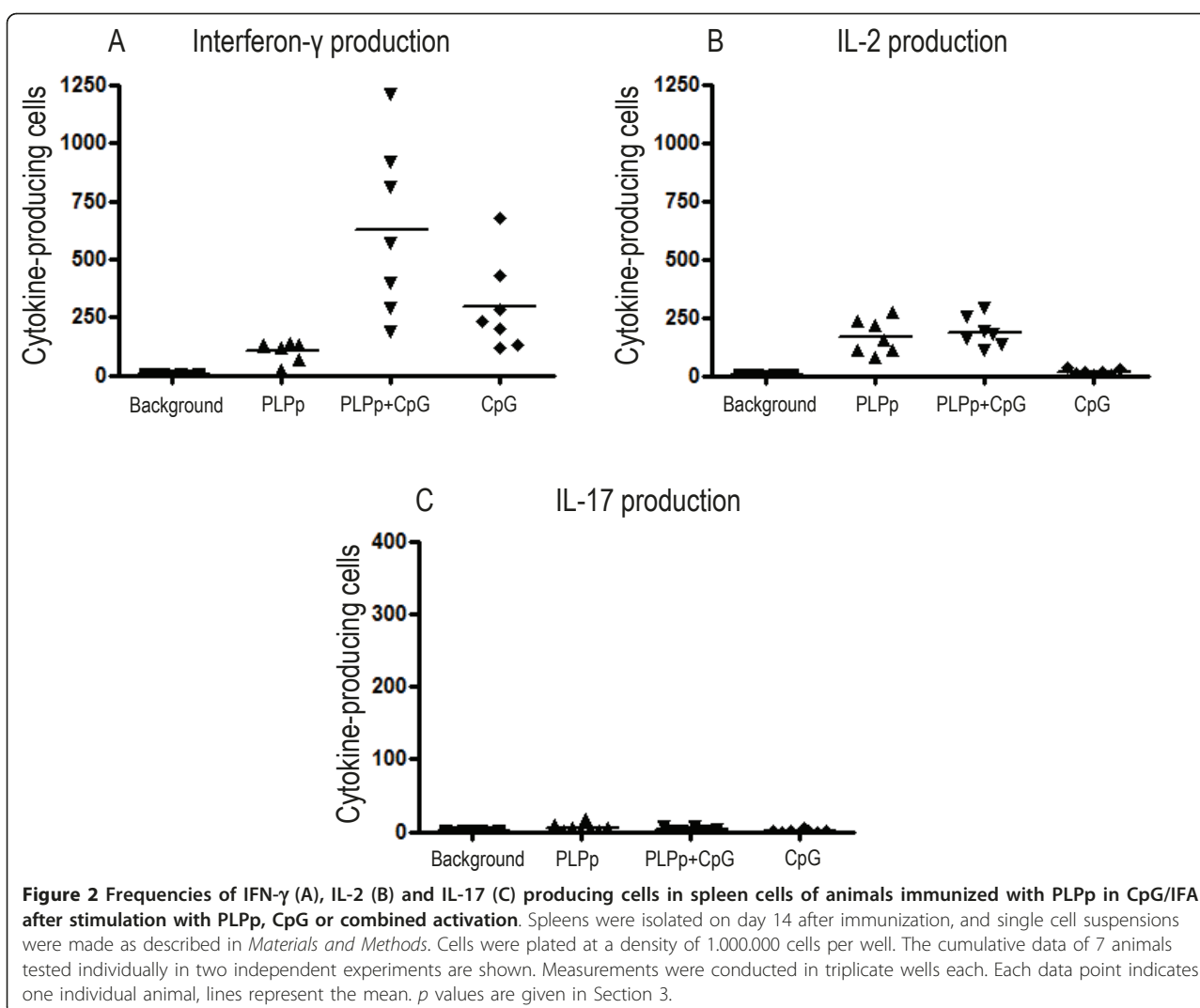


Figure 1 Representative disease course of SJL mice. 5 mice were immunized with PLPp/CFA with addition of pertussis toxin. 5 mice were immunized with PLPp and CpG in IFA. The mean clinical EAE score is shown with standard deviation. The differences in disease scores between the two groups on days 10, 11 and 12 were highly significant ($p < 0.001$).



could be observed in spleens of mice during acute EAE after recall with PLPp. The presence of CpG had a considerable superadditive effect on the number of IFN- γ -producing cells (mean: 809.43, SD: 367.45), $p = 0.0012$ for PLPp vs. PLPp+CpG), but no effect on IL-2 production (mean: 519.48, SD: 415.49) (Figure 3). These findings are comparable to cytokine responses of splenocytes isolated out of mice immunized with PLPp/CpG/IFA at day 14. ELISPOT measurements showed that splenocytes of mice, in which EAE was successfully induced, produced IL-17 after restimulation with PLPp (mean: 172.33, SD: 103.68). However, CpG did not increase the number of IL-17-producing, antigen specific T cells (mean: 110.67, SD: 40.99) in splenocytes.

CpG potentiate both autoantigen-specific IFN- γ and IL-17 production locally in the CNS during acute EAE

To study the impact of microbial components on cytokine responses in the CNS in acute EAE, pooled spinal

cord single cell suspensions from mice with acute EAE at day 12 were restimulated with PLPp and CpG and the frequencies of cytokine-producing cells were determined by ELISPOT (Figure 4). Without antigen stimulation, residual IL-17 (mean: 780, SD: 197.99) and IFN- γ (mean: 145, SD: 148.49) production was detected, reflecting the activity of primed T cells *in situ* stimulated by endogenous antigen. With external PLPp stimulation, dominant IL-17 production (mean: 2465, SD: 1124.3) was detected, accompanied by IFN- γ (mean: 1505, SD: 7.07) and (less) IL-2 (mean: 755, SD: 77.78) production. Additional stimulation with CpG led to a strong upregulation of IFN- γ secretion in the target organ (mean: 7485, SD: 1378.86, $p < 0.01$ for PLPp vs. PLPp+CpG), as well as a moderate upregulation of IL-17 production (mean: 6320, SD: 56.57, $p = 0.01$ for PLPp vs. PLPp+CpG), but had no effect on IL-2 production (mean: 515, SD: 219.2, $p = \text{ns}$). Stimulation with CpG only (without addition of external PLPp) led to

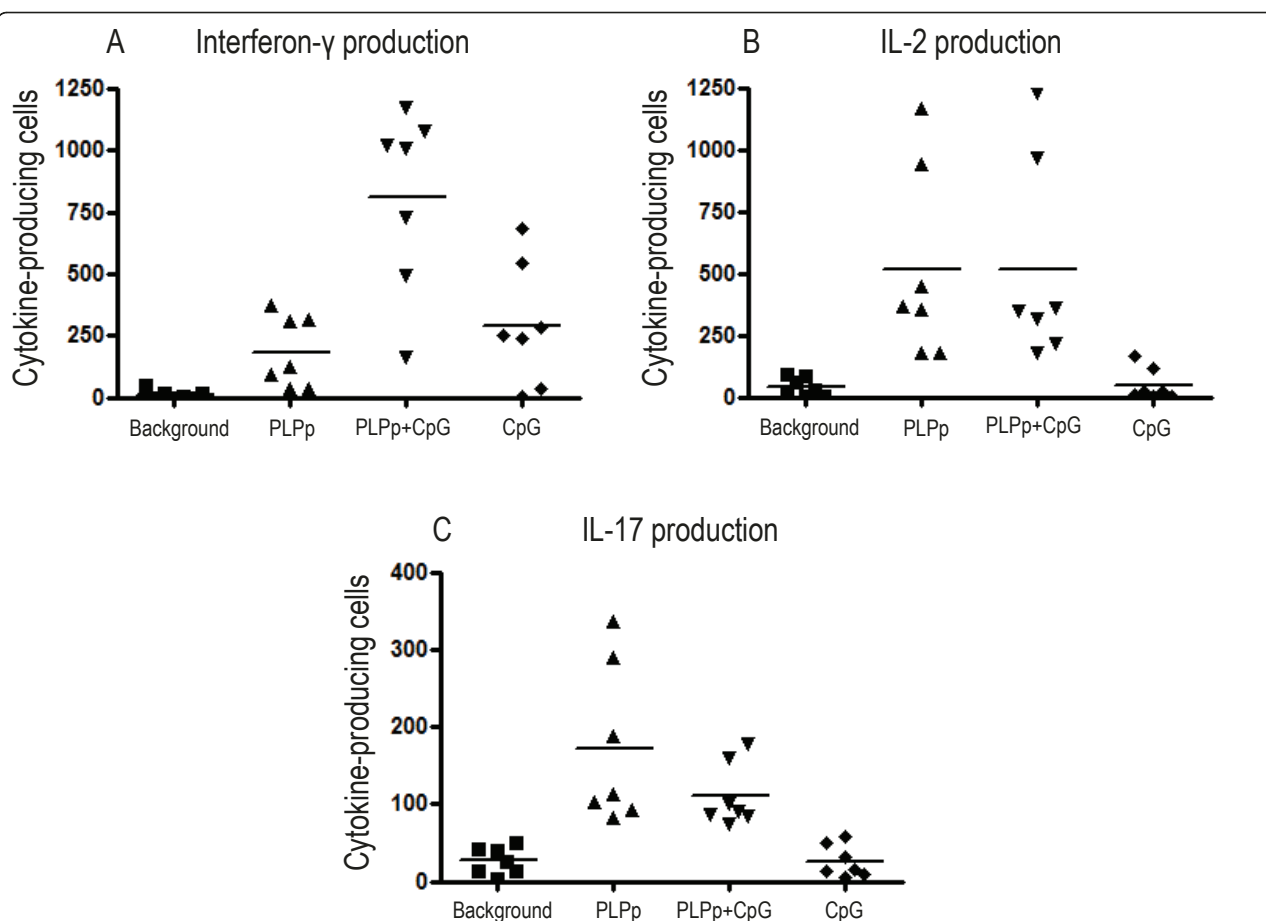


Figure 3 Frequencies of IFN- γ (A), IL-2 (B) and IL-17 (C) producing cells in spleens of animals immunized with PLPp in CFA and pertussis toxin after stimulation with PLPp, CpG or combined activation. Spleens were isolated on day 12 after immunization, and single cell suspensions were made as described in *Materials and Methods*. Cells were plated at a density of 1,000,000 cells per well. The cumulative data of 7 animals tested individually in two independent experiments are shown. Measurements were conducted in triplicate wells each. Each data point indicates one individual animal, lines represent the mean. *p* values are given in Section 3.

strong selective enhancement of IL-17 production (mean: 2715, SD: 261.63, $p = 0.014$ for CpG vs. background), but did not affect spontaneous IFN- γ (mean: 85, SD: 35.36, $p = \text{ns}$) or IL-2 (mean: 315, SD: 49.5, $p = \text{ns}$) production of the inflammatory CNS isolate. As a consequence, the IFN- γ /IL-17 ratio substantially differed depending on the type of stimulation (background: 0.19, PLPp: 0.61, PLPp+CpG: 1.18, CpG: 0.03).

CpG oligonucleotides do not essentially alter the encephalitogenicity of in-vitro-stimulated PLPp-specific T cells pre-primed in the immune periphery

To investigate the impact of additional CpG stimulation on pre-primed PLPp-specific T cells *in vitro*, adoptive transfer experiments were conducted. Female SJL mice were immunized with PLPp/CFA and PTX with the standard protocol described above. On day 7 after immunization (when the immune response in the periphery was well established) these mice were sacrificed

and their spleen cells were taken in culture (either with PLPp or with PLPp/CpG). After three days of culture, the remaining viable cells were transferred into recipient female SJL mice which also had been immunized with PLPp/CFA and PTX with the standard protocol. To get more differentiated information, one set of animals was injected at day 9 after immunization (when disease just started in some animals), another set was injected at day 10 after immunization (when disease was already established). A control group at day 9 and day 10 each received PBS only, no cells. As can be seen from Figure 5A-C, disease was quite severe in all groups in this set of experiments, and even in the control group most animals eventually died after a fairly short time (the disease course of all animals is depicted individually). In both groups which received cells restimulated with PLPp one animal each survived (in contrast to the respective group receiving cells restimulated with PLPp/CpG). This could (carefully) be interpreted as further evidence for

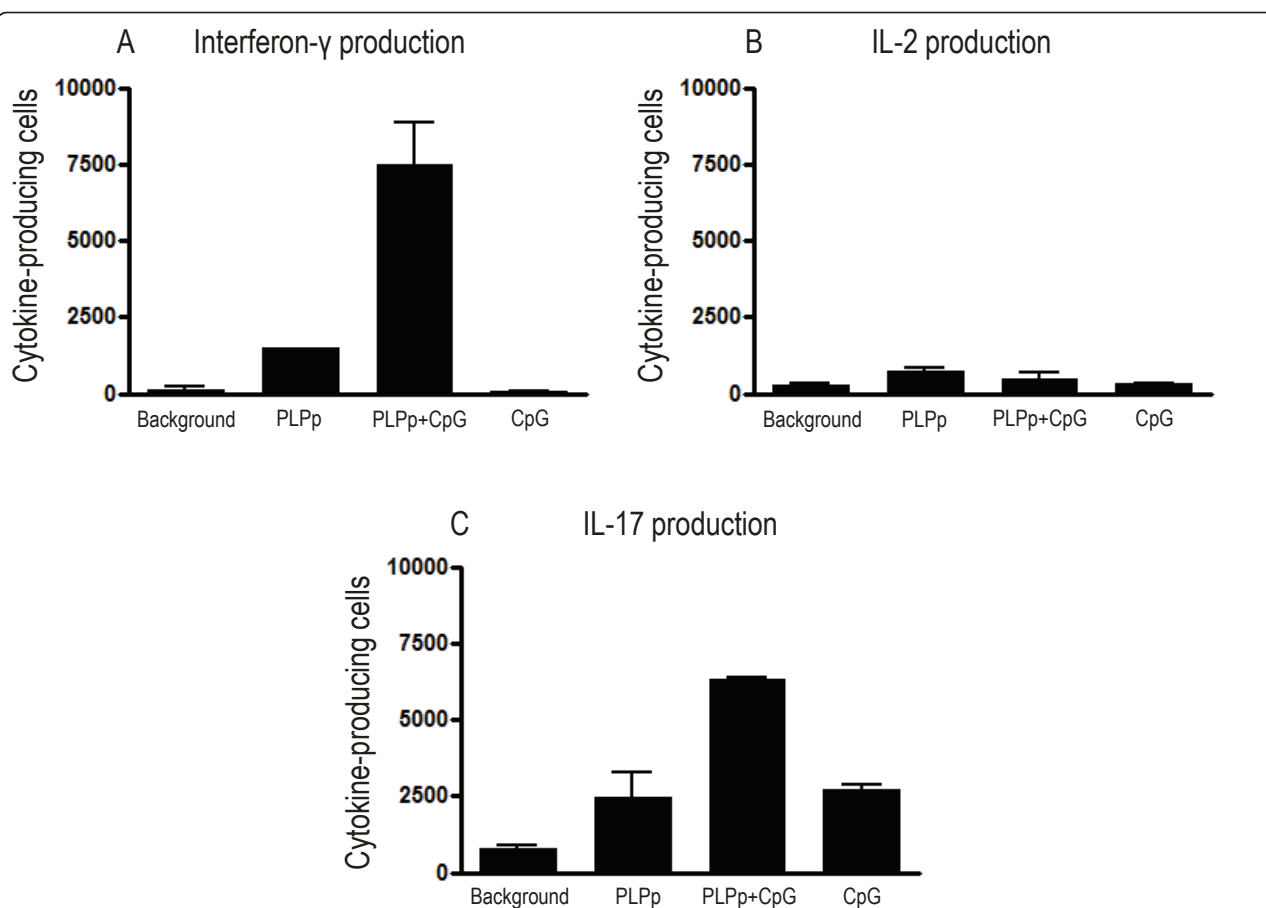


Figure 4 Frequencies of IFN- γ (A), IL-2 (B) and IL-17 (C) producing PLPp specific cells in spinal cords of animals immunized with PLPp in CFA and pertussis toxin after stimulation with PLPp, CpG or combined activation. Spinal cords were isolated on day 12 after immunization, and single cell suspensions were made as described in *Materials and Methods*. Cells were plated at a density of 100,000 cells per well. Raw data is adjusted to 1,000,000 cells per well for a direct comparison with frequencies of cytokine-producing spleen cells. Each bar represents two independent experiments with pooled spinal cord cultures of totally 7 mice (4 mice in the first experiment, 3 mice in the second experiment) due to the small number of mononuclear cells which can be recovered the CNS. Measurements were conducted in duplicate wells each. *p* values are given in Section 3.

the potential of CpG to enhance the encephalitogenicity of already primed PLPp-specific T cells. However, there was not a fundamental alteration of disease into a negative or positive fashion affecting the majority of animals.

Discussion

The principal goal of this study was to investigate how a microbial immune stimulant associated with a systemic infection can influence the cytokine signature of an ongoing autoimmune reaction in CNS autoimmune disease. The focus hereby was (1) on potential differences between immune periphery and the CNS and (2) on distinct effects regarding Th1 and Th17 cells. The human clinical situation to which the results of our EAE-based study might apply is the mechanism via which a systemic infection might worsen ongoing CNS autoimmune pathology in MS and thereby cause disease progression

or relapse [6-9]. As a paradigmatic microbial stimulus simulating "infection" in our study CpG oligonucleotides were investigated regarding their co-stimulating effect on the PLPp-specific cytokine signature in PLPp-induced EAE in SJL mice. We concentrated on the situation in acute EAE by measuring the quantity of PLPp-specific IFN- γ , IL-2- and IL-17-producing cells in the immune periphery and the target organ CNS. The presence of microbial factors, in particular TLR stimulants, can have different effects on the immune system when it happens initially during the priming of the autoimmune reaction [22-24] in contrast to its appearance during the actual autoimmune disease [11;12;25;26]. It has been demonstrated by two previous studies that mice injected with PLPp/CPG do not develop clinical EAE, but a strong PLPp-specific Th1 response [21;22]. Our data confirms these observations, as well as the fact

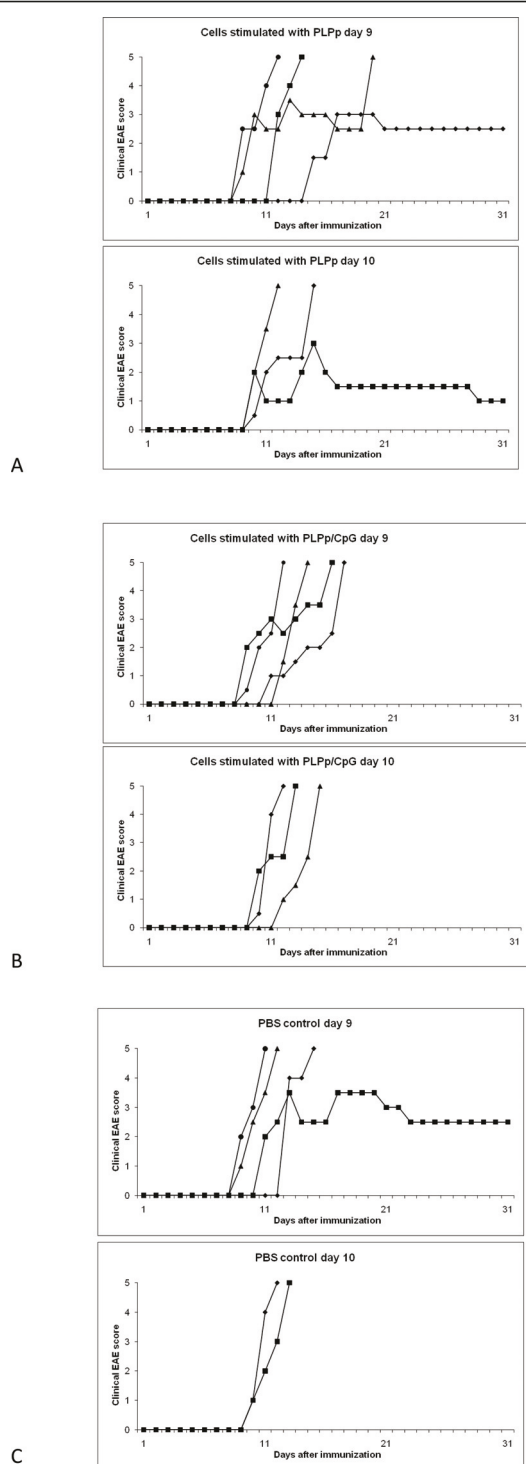


Figure 5 Adoptive transfer of PLPp-stimulated and PLPp/CpG-stimulated PLPp-specific T cells into SJL mice with actively induced EAE. Female SJL mice injected with PLPp/CFA and PTX as described above were (either at day 9 or day 10) injected with cells re-stimulated *in vitro* either with PLPp (A) or PLPp/CpG (B). A control group received PBS at day 9 or day 10, respectively (C). The disease course of all animals is depicted individually. Further details are described in the results section.

that there is a complete lack of a PLPp-specific Th17 response after this injection protocol. In contrast to one of these previous works [22] however, we want to avoid the simplistic conclusion that the mere absence of Th17 cells explains the lack of clinical disease symptoms. The same group which has initially described the adjuvant effect of CpG in EAE [21] has demonstrated that EAE can be induced in the absence of Th17 cells, and that Th1 cells cannot automatically be seen as protective, but induce a different type of CNS pathology than do Th17 cells [15].

Under the conditions of established CNS-autoantigen-specific immunity, CpG oligonucleotides effectively enhance PLPp-specific IFN- γ production in splenocytes, i.e. the immune periphery. Since they also trigger IFN- γ without PLPp, this appears to be (partially) a stimulating effect on the non-T-cell compartment, presumably monocytes and macrophages. However, combined stimulation (PLPp and CpG) results in an over-additive effect, which is more than the sum of the single stimulations with PLPp or CpG alone. This is not dependent on the presence of clinical EAE symptoms - the effect is the same both in healthy animals after injection with PLPp/CpG/IFA and in animals with severe EAE after injection with PLPp/CFA and PTX. No effect is seen in both animal groups on PLPp-specific IL-2 and IL-17 production, neither alone or with combined stimulation. Therefore, the effect of TLR9 ligation on the autoreactive T cell population in the periphery does not clarify its disease-enhancing effect in EAE which has been described by others [11]. In contrast, in the inflamed CNS a complex picture emerges: Already stimulation with CpG alone (without addition of PLPp) triggers strong IL-17 production, but no IFN- γ production. With combined stimulation (CpG and PLPp), a strong enhancement of both IFN- γ and IL-17 occurs, whereas IL-2 production is not essentially altered at any stimulation condition. Since in the spinal cord, which was isolated directly *ex vivo*, considerable amounts of endogenous antigen are likely to be presented by local APC, there is most likely no pure TLR9 stimulation, but also combined stimulation when only CpG are experimentally applied. This explains why there is already considerable residual cytokine production without external stimulant, with IL-17 being the dominant cytokine. CpG might enhance the already existing Th17 response, but might also activate cells of the innate immune system which are able to produce IL-17. In any case, these cells are in EAE only present in the inflamed CNS, not in the immune periphery, or they can only be activated in the inflamed CNS. This indicates that one immunological stimulus (CpG) can have substantially different effects on the cytokine architecture in distinct stages of an autoimmune reaction. TLR9 stimulation alone during priming is not sufficient to

induce antigen-specific Th17 cells, but has a decisive effect on IL-17 production in the inflamed target organ *in situ* under various local conditions. This is paralleled by the observation that *in vitro* co-stimulation of peripherally primed PLPp-specific T cells with CpG does not essentially alter the encephalitogenic potential of these cells in adoptive transfer experiments.

As a main conclusion of this set of data, within the CNS, microbial stimulants might cause very heterogeneous and patchy micro-effects. Both the presence of an infectious stimulus and the amount of CNS autoantigen locally present might determine the IFN- γ /IL-17 ratio which results. External addition of PLPp (which might yield unrealistic concentrations which do not occur *in vivo*) causes a strongly different IFN- γ /IL-17 ratio than the culture with endogenous PLPp only. A landmark study has suggested that the local IFN- γ /IL-17 ratio in the individual lesions determines disease progression and depends on the anatomic site of the lesion [27]. Therefore, different inflammatory lesions in the same CNS might be differentially affected by the presence of a microbial stimulus, depending on autoantigen availability and other local factors. This might be in line with the heterogeneity of MS lesions in one and the same patient. For the potential connection between infection and worsening of already ongoing CNS autoimmune disease, our results suggest that the crucial effect of inflammatory mediators is achieved in the CNS *in situ*. A scenario is possible where traces of low molecular pathogenic factors present in abundance in peripheral compartments (e.g. blood, spleen, lymphatic tissues) during a systemic inflammation enter the brain and lead in cooperation with local ongoing autoimmune processes to reactivation of quiescent or suppressed autoantigen-specific T cells. These activated memory cells recruit other antigen-specific and bystander immune cells from the peripheral pool causing thereby an acute relapse or disease progression. This concept is supported by observations by other groups [11;12;25]. One of these studies even claims that endogenous, non-microbial TLR9 ligands like phosphodiester DNA (which might arise in the course of the autoimmune process) might substitute for microbial TLR9 ligands and thereby further local autoimmune pathology [11].

Of note, it is not the purpose of our study to support argumentation for a unidimensional pathogenic role for one single cytokine, neither for IL-17 nor for IFN- γ . In the light of the current literature on EAE and other experimental autoimmune diseases, different cytokines can induce different types of autoimmune pathology [15;16;28]. We conclude that (1) CpG can have different effects on T cell cytokine production depending on whether they are present in the priming phase or during

the ongoing autoimmune response (2) the effects in the immune periphery and in the inflamed CNS differ qualitatively and quantitatively and (3) in the CNS, conditions of the local microenvironment like the amount of antigen additionally determine the cytokine signature. An organism with an ongoing autoimmune response in which additionally infectious agents and their microbial stimuli are present is likely to be an anatomically quite heterogeneous "mosaïque" regarding the cytokines which dominate ongoing local autoimmunity, in particular in the inflamed target organ. Simple mechanistic extrapolations towards the human disease MS currently therefore do not seem justified, in particular not for one single molecular receptor or ligand. Additional studies have to clarify which cellular compartments in the CNS are producing the respective cytokines and how they change under the influence of exogenous/endogenous TLR ligands during the various stages of the course of the autoimmune disease.

Acknowledgements

HHH and VS were supported by a Grant of the Forschungskommission der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf (Nr. 9772322). HHH was also supported by grants of the Deutsche Forschungsgemeinschaft (Ho 4392/1-1), of the Strategischer Forschungsfonds der Universität Düsseldorf and of the Deutsche Multiple Sklerose Gesellschaft. BH and PV were supported by a Grant of the Deutsche Forschungsgemeinschaft (He 2386/7-1). The MS center at the Department of Neurology, Heinrich-Heine-University is supported in part by the Walter-and-Ilse Rose Stiftung.

Competing interests statement

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

HHH designed the study, analyzed data, wrote the paper and performed experiments, VS analyzed data, wrote the paper and performed experiments, TD, AKM and PV wrote the paper and performed experiments, BCK, BH and HPH wrote the paper. All authors read and approved the final manuscript.

Author details

¹Department of Neurology, Heinrich Heine University, Düsseldorf, Germany.

²Department of Neurology, Klinikum rechts der Isar, Technische Universität München, Munich, Germany.

Received: 18 October 2010 Accepted: 30 May 2011

Published: 30 May 2011

References

- Chervonsky AV: Influence of microbial environment on autoimmunity. *Nature Immunology* 2010, **11**:28-35.
- Christen U, von Herrath MG: Infections and autoimmunity - good or bad? *J Immunol* 2005, **174**:7481-6.
- Levin LI, Munger KL, O'Reilly EJ, Falk KI, Ascherio A: Primary infection with the Epstein-Barr virus and risk of multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2010, **67**:824-30.
- Casiraghi C, Dorovini-Zis K, Horwitz MS: Epstein-Barr virus infection of human brain microvessel endothelial cells: a novel role in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2011, **230**:173-7.
- Ochoa-Reparaz J, Mielcarz DW, Ditrio LE, et al: Role of gut commensal microflora in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 2009, **183**:6041-50.
- Andersen O, Lygner PE, Bergström T, Andersson M, Vahlne A: Viral infections trigger multiple sclerosis relapses: a prospective seroepidemiological study. *J Neurol* 1993, **240**:417-22.

7. Buljevac D, Flach HZ, Hop WCJ, et al: Prospective study on the relationship between infections and multiple sclerosis exacerbations. *Brain* 2002, **125**:952-60.
8. Correale J, Farez M: Monocyte-derived dendritic cells in multiple sclerosis: the effect of bacterial infection. *J Neuroimmunol* 2007, **190**:177-89.
9. Edwards S, Zvartau M, Clarke H, Irving W, Blumhardt LD: Clinical relapses and disease activity on magnetic resonance imaging associated with viral upper respiratory tract infections in multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1998, **64**:736-41.
10. Nogai A, Siffrin V, Bonhagen K, et al: Lipopolysaccharide injection induces relapses of experimental autoimmune encephalomyelitis in nontransgenic mice via bystander activation of autoreactive CD4+ cells. *J Immunol* 2005, **175**:959-66.
11. Prinz M, Garbe F, Schmidt H, et al: Innate immunity mediated by TLR9 modulates pathogenicity in an animal model of EAE. *J Clin Invest* 2006, **116**:456-64.
12. Serres S, Anthony DC, Jiang Y, et al: Systemic inflammatory response reactivates immune-mediated lesions in rat brain. *J Neuroscience* 2009, **29**:4820-8.
13. Korn T, Oukka M, Bettelli E: Th17 cells: effector T cells with inflammatory properties. *Semin Immunol* 2007, **19**:362-71.
14. Hofstetter HH, Ibrahim SM, Koczan D, et al: Therapeutic efficacy of IL-17 neutralization in murine experimental autoimmune encephalomyelitis. *Cell Immunol* 2005, **237**:123-30.
15. Kroenke MA, Carlson TJ, Andjelkovic AV, Segal BM: IL-12 and IL-23-modulated T cells induce distinct types of EAE based on histology, CNS chemokine profile and response to cytokine inhibition. *J Exp Med* 2008, **205**:1535-41.
16. Luger D, Silver PB, Tang J, et al: Either a Th17 or a Th1 effector response can drive autoimmunity: conditions of disease induction affect dominant effector category. *J Exp Med* 2008, **205**:799-810.
17. Ichikawa TH, Williams LP, Segal BM: Activation of APCs through CD40 or Toll-like Receptor 9 overcomes tolerance and precipitates autoimmune disease. *J Immunol* 2002, **169**:2781-7.
18. Bendigs S, Salzer U, Lipford GB, Wagner H, Heeg K: CpG-oligodeoxynucleotides co-stimulate primary T cells in the absence of antigen-presenting cells. *Eur J Immunol* 1999, **29**:1209-18.
19. Hofstetter HH, Shive CL, Forsthuber TG: Pertussis toxin modulates the immune response to neuroantigens injected in incomplete Freund's adjuvant: induction of Th1 cells and experimental autoimmune encephalomyelitis in the presence of high frequencies of Th2 cells. *J Immunol* 2002, **169**:117-25.
20. Hofstetter HH, Toyka KV, Tary-Lehmann M, Lehmann PV: Kinetics and organ distribution of IL-17-producing CD4 cells in proteolipid protein 139-151 peptide-induced experimental autoimmune encephalomyelitis of SJL mice. *J Immunol* 2007, **178**:1372-8.
21. Segal BM, Dwyer BK, Shevach EM: CpG oligonucleotides are potent adjuvants for the activation of autoreactive encephalitogenic T cells in vivo. *J Immunol* 2000, **164**:5683-90.
22. Tigno-Aranjuez JT, Jaini R, Tuohy VK, Lehmann PV, Tary-Lehmann M: Encephalitogenicity of CFA relative to CpG is linked to induction of Th17 cells. *J Immunol* 2009, **183**:5654-61.
23. Hansen BS, Hussain RZ, Lovett-Racke AE, Thomas JA, Racke MK: Multiple toll-like receptor agonists act as potent adjuvants in the induction of autoimmunity. *J Neuroimmunol* 2006, **172**:94-103.
24. Marta M, Andersson A, Isaksson M, Kämpe O, Lobell A: Unexpected regulatory roles of TLR4 and TLR9 in EAE. *Eur J Immunol* 2008, **38**:565-75.
25. Hermann I, Kellert M, Schmidt H, et al: Streptococcus pneumoniae infection aggravates EAE via toll-like receptor 2. *Infection and Immunity* 2006, **74**:4841-8.
26. Tsunoda I, Tolley ND, Theil DJ, Whitton JL, Kobayashi H, Fujinami RS: Exacerbation of viral and autoimmune animal models for multiple sclerosis by bacterial DNA. *Brain Pathology* 1999, **9**:481-93.
27. Stromnes IM, Cerretti LM, Liggitt D, Harris RA, Gorman JM: Differential regulation of central nervous system autoimmunity by T(H)1 and T(H)17 cells. *Nat Med* 2008, **14**:337-42.
28. Haak S, Croxford AL, Kreyenborg K, et al: IL-17A and IL-17F do not contribute vitally to autoimmune neuro-inflammation in mice. *J Clin Invest* 2008, **119**:61-9.

doi:10.1186/1742-2094-8-59

Cite this article as: Smolianov et al.: Alteration of T cell cytokine production in PLPp-139-151-induced EAE in SJL mice by an immunostimulatory CpG Oligonucleotide. *Journal of Neuroinflammation* 2011 **8**:59.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



CD34+ progenitor cells mobilized by natalizumab are not a relevant reservoir for JC virus

Multiple Sclerosis Journal
17(2) 151–156
© The Author(s) 2011
Reprints and permissions:
sagepub.co.uk/journalsPermissions.nav
DOI: 10.1177/1352458510385834
msj.sagepub.com



Clemens Warnke^{1,*}, Vsevolod Smolianov^{1,*}, Thomas Dehmel¹,
Marcel André², Hartmut Hengel², Fabian Zohren³,
Gabriele Arendt¹, Heinz Wiendl⁴, Rainer Haas³,
Hans-Peter Hartung¹, Ortwin Adams² and Bernd C Kieseier¹

Abstract

Background: Progressive multifocal leukoencephalopathy (PML) is associated with natalizumab treatment in patients with multiple sclerosis (MS). It has been hypothesized that natalizumab mobilizes JC virus (JCV)-infected haematopoietic progenitor cells mediating viraemia and subsequently this disease.

Objective: The objective of this study was to investigate peripheral haematopoietic progenitor cells for evidence of JCV DNA in MS patients treated with natalizumab.

Methods: We assessed JCV and cytomegalovirus (CMV) DNA in magnetically separated CD34+ haematopoietic progenitor cells, peripheral blood mononuclear cells and plasma of 67 natalizumab-treated patients with MS and six PML patients.

Results: Viral DNA was not detectable in CD34+ haematopoietic progenitor or peripheral blood mononuclear cells from any sample. Two plasma samples from patients with MS while undergoing natalizumab treatment were JCV-positive. In one case clinically manifest PML developed 8 months thereafter.

Conclusions: Our findings do not support the hypothesis that natalizumab mobilizes JC virus-infected CD34+ cells from the bone marrow mediating JC viraemia. Notably, JC viraemia was detected in one patient with MS prior to developing clinical PML. This warrants further study.

Keywords

Immunology, multiple sclerosis, natalizumab, progressive multifocal leukoencephalopathy, treatment

Date received: 28th May 2010; revised: 2nd August 2010; 22nd August 2010; accepted: 7th September 2010

Introduction

The bone marrow has been reported to be a reservoir for the JC virus (JCV),¹ which under impaired cellular immunity causes progressive multifocal leukoencephalopathy (PML), an often lethal demyelinating disease of the brain. PML is frequently seen in patients with haematological disorders or acquired immunodeficiency syndrome (AIDS),² but numbers are currently also increasing in patients on immunosuppressive treatments for autoimmune diseases.³ Notably, PML occurs with an estimated risk of 1 in 1000 patients treated with natalizumab for MS. This risk might increase beyond 24 months of treatment.⁴

¹Department of Neurology, Heinrich-Heine-University, Düsseldorf, Germany.

²Institute for Virology, Heinrich-Heine-University, Düsseldorf, Germany.

³Department of Haematology, Heinrich-Heine-University, Düsseldorf, Germany.

⁴Department of Neurology, Julius-Maximilians-University, Würzburg, Germany.

*CW and VS contributed equally to this study.

Corresponding author:

Bernd C Kieseier, MD, Clinical and Experimental Neurology, Department of Neurology, Heinrich-Heine-University, Moorenstrasse 5, 40225 Düsseldorf, Germany
Email: bernd.kieseier@uni-duesseldorf.de

Natalizumab is a humanized monoclonal immunoglobulin G4 (IgG4) antibody binding the $\alpha 4$ integrin that interferes with the extravasation of leukocytes into the central nervous system (CNS).⁵ A recent study suggests that shedding of JCV in the urine increases after 12 months of treatment with natalizumab for MS, followed by JC viraemia in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) after 18 months,⁶ prompting the hypothesis that viraemia might precede viraemia ultimately causing CNS infection with JCV and subsequently PML. However, these results remain controversial.^{7–9} The bone marrow has been reported to be a site of JCV latency and has been suggested as a convenient environment for neurotropic transformation of this virus.¹ We and others demonstrated that natalizumab mobilizes CD34+ haematopoietic progenitor cells out of the bone marrow into the peripheral blood.^{10–12} Thus, such a mobilization could possibly induce JC viraemia, CNS (re)infection by JCV and potentially development of PML.¹³ We therefore addressed this hypothesis by studying the

presence of JCV DNA in CD34+ haematopoietic progenitors.

Patients and methods

Sixty-seven patients with relapsing–remitting MS (RRMS; 46 females/21 males) and six PML patients (3 males/3 females) were studied (Table 1) after informed consent was obtained following the guidelines of the local ethics committee of the Heinrich-Heine-University, Düsseldorf, Germany. Blood samples of all six PML patients were collected within 4 weeks of first positive cerebrospinal fluid (CSF) findings to ensure that those patients suffered from active PML. Blood samples of MS patients were taken before natalizumab infusion. For all patients, 18 ml ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA)-anticoagulated venous blood was available for isolation of PBMCs. PBMCs were isolated by density gradient centrifugation using Ficoll-Paque™ (GE Healthcare, Munich, Germany). The number of CD34+ cells was assessed by

Table 1. Patients' characteristics and JCV DNA and CMV DNA PCR results in different blood compartments

MS patients				PML patients			
Age [years]		Natalizumab infusions [#]			Age [years]	Underlying disease	Associated treatment
Mean ± SD	37 ± 9	Mean ± SD	12.23 ± 7.85	Patient #1	52	AIDS, HAART naive	None
Median	38	Median	12	Patient #2	39	AIDS, on HAART	None
Range	18–59	Range	1–35	Patient #3	72	NHL	R-CHOP
EDSS		Previous treatment ^a [%]		Patient #4	49	AIDS, HAART naive	None
Mean ± SD	3.05 ± 1.65	Interferon beta	61	Patient #5	46	RRMS	29 infusions of natalizumab
Median	3	Glatiramer acetate	31	Patient #6	41	RRMS	27 infusions of natalizumab
Range	1–6.5	Mitoxantrone	12				
		Other or NA	19				
		None	4				
JCV PCR		Plasma	PBMCs	CD34+ cells			
[# positive/# tested]							
MS patients on natalizumab		2/104	0/113	0/51			
PML patients		2/6	0/6	0/6			
CMV PCR							
MS patients on natalizumab		0/51	0/51	0/51			
PML patients		0/6	0/6	0/6			

^aMultiple pre-treatments were possible. JCV and CMV DNA loads were assessed by PCR in CD34+ progenitors magnetically purified from PBMCs, PBMCs after magnetically CD34+ isolation and plasma.

AIDS: acquired immunodeficiency syndrome, CHOP: cyclophosphamide, hydroxydaunomycin, Oncovin® and prednisone, CMV: cytomegalovirus, EDSS: Expanded Disability Status Scale, HAART: highly active antiretroviral therapy, JCV: Jakob-Creutzfeldt virus, MS: multiple sclerosis, NA: data not available, NHL: non-Hodgkin's lymphoma, PBMC: peripheral blood mononuclear cell, PML: progressive multifocal leukoencephalopathy, R-CHOP: CHOP plus rituximab, RRMS: relapsing–remitting multiple sclerosis.

fluorescence-activated cell sorter (FACS) analysis as previously published.¹¹ For CD34+ separation, all PBMCs were labelled with anti-CD34 microbeads and separated using mass spectrometry (MS) columns and a OctoMACS™ Separator (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) according to the manufacturer's guidelines. DNA was extracted from CD34+ cells, the CD34+ negative fraction (defined as PBMCs) and plasma using the EZ1 Virus Mini Kit v2.0 and the EZ1 DNA Blood Kit (QIAGEN, Hilden, Germany). PCR for the detection of JCV DNA was conducted by two different protocols. Using the first protocol, a 67 bp amplicon in the conserved *VP2* gene was amplified and detected. Sensitivity was determined as 473 JCV copies/ml for plasma samples (95% probit analysis). The second protocol, amplifying a 78 bp product in the large *T* gene region was used as an internal control for sensitivity and specificity and is identical to that published by Chen et al.^{6,14}

External validation was performed within the Quality Control of Molecular Diagnostics (Glasgow, Scotland) for the JCV detection assay (JCBKDNA09) as part of an international effort to standardize JCV quantitative PCR (qPCR) assays. The sensitivity of this assay was determined as 3.9 copies/assay and 117 copies/ml, respectively (95% probit analysis). To determine the efficiency of JCV DNA extraction in cell populations, spiking experiments with a JCV large *T* gene coding plasmid in suspensions of peripheral blood lymphocytes/ml were carried out. The lower limit of detection was assessed as 15.9 copies/assay (95% probit analysis) and 43.2 copies/ μ g of cellular DNA, respectively. While initial testing was performed using the first protocol, samples of 52/67 MS patients on natalizumab and 4/6 PML patients (including both natalizumab PML patients) were retested with the second protocol to be able to directly compare data to the results published by Chen et al.⁶ No additional samples tested positive when applying the second protocol. Cytomegalovirus (CMV) DNA was measured in parallel in all samples as previously published.¹⁵

For statistical analysis, Spearman's correlation and the Kruskal–Wallis test with post hoc analysis were performed where appropriate.

Results

Mobilization of CD34+ progenitors

At the time of investigation our MS patients had received a median number of 12 natalizumab infusions at 300 mg intravenously every 4 weeks. We could confirm significant mobilization of CD34+ haematopoietic stem cells by natalizumab, as previously reported.^{10–12} Here we were able to follow up 13

patients of our originally published cohort.¹¹ The median time between first and second assessment was 20 months (range 10–24 months) and the median count of CD34+ cells in the peripheral venous blood did not change between the two time points (see Figure 1).

JCV DNA assessment

JCV DNA load in the peripheral venous blood of natalizumab-treated MS patients was assessed by repeated measurements at different time points. In all PBMCs studied (113 samples from 67 patients) JCV DNA was not detectable. In addition, JCV DNA was not detected in the magnetically purified CD34+ cell subpopulation (purity: >90%, data not shown) from any of the 51 samples studied. In plasma, however, JCV DNA was found in two out of 104 samples (Table 1). The first positive result (374 viral copies/ml, CD34+ cell count: 14.3/ μ l) was observed in a patient before receiving the 18th infusion of natalizumab. Measurements were negative 2 and 5 months later under continued therapy. The second patient (120 viral copies/ml, CD34+ count: 22.6/ μ l) revealed positive findings before the 20th course of treatment. No plasma JCV DNA was detected 1 month later while on continued therapy. Neither of the two patients showed

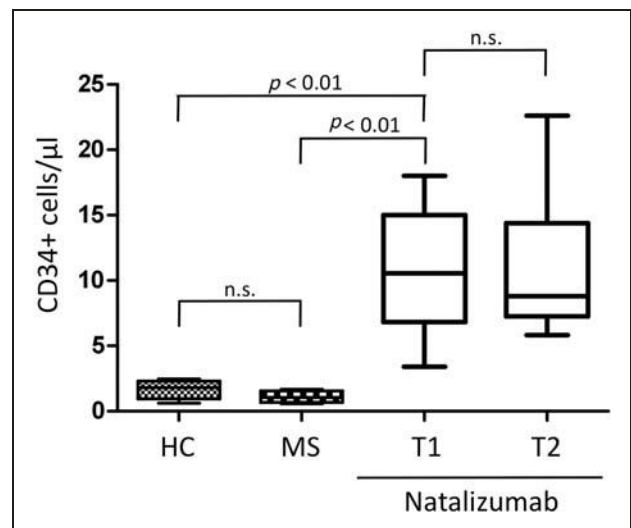


Figure 1. CD34+ progenitors in the peripheral venous blood of natalizumab-treated patients. The CD34+ cell count was followed in 13 patients over a median time period of 20 months (range 10–24 months). The median CD34+ cell count in MS patients treated with natalizumab was 8.8 cells/ μ l (range 5.83–22.61) at time of the second measurement (T2) compared to 10.56 cells/ μ l (range 4.4–18) at time of the first measurement (T1). Healthy individuals (HC) exhibited a CD34+ cell count of 1.81 cells/ μ l (median, range 0.61–2.46), whereas in untreated MS patients 1.06 cells/ μ l were assessed (median, range 0.57–1.68). n.s. = not significant.

any clinical signs of PML at the time of positive plasma findings and changes on MRI were not suggestive of PML. However, the second patient developed PML 8 months after positive plasma results while continuing treatment.

As a control group, the presence of JCV DNA was assessed in six patients with confirmed PML (see Table 1). In all these patients, neither mobilized CD34+ haematopoietic progenitors nor PBMCs harboured JCV DNA. JCV PCR was positive in the plasma of three of these patients: in one of the highly active antiretroviral therapy (HAART)-naive HIV patients (660 viral copies/ml), in the rituximab-treated, non-Hodgkin's lymphoma patient (6000 viral copies/ml) and in one of the two natalizumab-treated PML patients (210 viral copies/ml).

Cytomegalovirus assessment

As an internal control for virus reactivation, CMV DNA was also measured by PCR in all samples. CMV DNA was not detected in any of the samples from MS and PML patients (see Table 1).

Discussion

The bone marrow has been reported to be a reservoir of JCV latency, where neurotropic transformation of the virus could possibly occur.¹ We, and others, recently demonstrated in cross-sectional studies that natalizumab mobilizes CD34+ haematopoietic progenitor cells out of the bone marrow into the peripheral blood.^{10–12} Mobilization of JCV-infected bone marrow cells has been suggested to be a critical step in the development of PML in MS patients treated with natalizumab.¹³ We addressed this hypothesis by studying the presence of JCV DNA in CD34+ haematopoietic progenitors, but also in the PBMCs and plasma of natalizumab-treated MS patients as well as in patients with confirmed PML. We were able to demonstrate that CD34+ haematopoietic progenitor cells are mobilized in a constant and sustained manner in patients on long-term natalizumab treatment. However, this mobilization was not accompanied by an increase in JC viraemia in general, neither cell-free nor cell-bound. We could not detect JCV in any of the CD34+ cell samples or PBMCs studied. Negative findings in PBMCs clearly contrast with recently published data by others,⁶ although we applied the same PCR protocol for JCV DNA detection. In addition, we looked for signs of a more general, not JCV-specific subclinical viral reactivation. CMV has been detected in CD34+ of bone marrow samples of seropositive individuals in the past.¹⁶ Thus, we also studied CMV expression in plasma, PBMCs and in the CD34+

fraction of our patients. CMV DNA was not detectable in any of the samples studied.

There are limitations to this study. The authors are aware of the fact that the value of negative data critically depends on the quality of methods applied, and differences in methodology might account for conflicting findings by various authors. We decided to sample immediately before the next infusion of natalizumab. This was based on the fact that we observed a significant increase in circulating CD34+ 24 h after infusion which was sustained throughout the 1 month of treatment.¹¹ Thus, we had no evidence that additional sampling would significantly augment the probability of detecting JCV in CD34+ cells. We used 18 ml EDTA blood for isolation of CD34+ cells. Given the fact that the CD34+ cell count is increased to an average of 7.6 cells/ μ l in natalizumab-treated MS patients, approximately 100,000 CD34+ cells/sample were available for the assessment for presence of JCV DNA. By not detecting JCV or CMV in any of the 57 assessed samples of CD34+ cells, we can exclude a prevalent infection of the CD34+ subpopulation. For DNA extraction and PCR methods, established routine procedures for clinical diagnostics were used and our PCR assay was externally validated as a part of an international effort to standardize JCV qPCR assays and by applying two different protocols.

Our negative findings are supported by results in a PML control group which included one MS patient who developed clinical PML 8 months after a positive sample of peripheral blood within our study. If the primary reservoir for JCV is in PBMCs, then one would expect PBMCs from patients with JCV positive plasma to be enriched with the virus. However, CD34+ progenitors or PBMCs assessed from two MS and four non-MS patients with confirmed and active PML were JCV negative. Interestingly, JCV DNA was detected in two out of 104 MS plasma samples studied, while PBMCs or CD34+ cells were negative for the same patients at the time of these findings. JCV in plasma has been reported in up to 40% of HIV positive individuals, and rarely in healthy controls or patients with MS treated with or without natalizumab.^{2,17–19} JC viraemia appears to have no established predictive value for the risk of developing PML. However, its appearance has been noted in few instances prior to clinical PML.^{20,21} Both patients with positive JCV plasma findings in our cohort did not reveal any clinical signs of PML or typical changes on MRI at the time of viral DNA detection. Reanalyses by PCR several weeks later were negative. However, one of these patients developed clinically frank PML 8 months after the positive plasma finding. Still, given the frequency of positive plasma findings in healthy individuals, it remains speculative whether or not transient JC viraemia precedes

the development of clinical PML in general. This clearly warrants further investigation in large and diverse patient populations applying standardized PCR protocols. As our study failed to further define the origin of JCV DNA in plasma (e.g. PBMCs), the underlying mechanism for the reported periodic JCV re-expression remains obscure. Perhaps even endogenous (re)activation of the JC virus within the CNS may promote development of PML in some patients treated with natalizumab, triggered by drug-specific immunological mechanisms, such as a disturbed, JC virus-specific T-cell immune response.²²

To conclude, our study does not provide evidence for CD34+ cells as a relevant reservoir for JCV DNA or CMV DNA in MS patients treated with natalizumab. Alternative sites or mechanisms of JCV infection of the brain should be considered in the pathogenesis of PML. For the safety of patients treated with natalizumab, future studies are warranted to shed light on these highly relevant questions.

Acknowledgments

The technical assistance of Tatjana Males is gratefully acknowledged.

Funding

Part of this study was supported by the Forschungskommission of the Heinrich-Heine-University, Düsseldorf (to CW). This work was supported by grants from the German Ministry for Education and Research (BMBF, 'German Competence Network Multiple Sclerosis' (KKNMS), Natalizumab-Pharmakovigilanzstudie, 01GI1002 to BCK).

Conflict of interest

HPH, BCK and HW have received honoraria for lecturing, travel expenses for attending meetings and financial support for research from Bayer Health Care, Biogen Idec, Merck Serono, Novartis, Sanofi Aventis, and TEVA. GA, MA, OA, TD, HH, RH, VS, CW and FZ report no conflict of interest.

References

1. Tan CS, Dezube BJ, Bhargava P, Autissier P, Wüthrich C, Miller J, et al. Detection of JC virus DNA and proteins in the bone marrow of HIV-positive and HIV-negative patients: implications for viral latency and neurotropic transformation. *J Infect Dis* 2009; 199: 881–888.
2. Cinque P, Koralnik IJ, Gerevini S, Miro JM and Price RW. Progressive multifocal leukoencephalopathy in HIV-1 infection. *Lancet Infect Dis* 2009; 9: 625–636.
3. Carson KR, Evens AM, Richey EA, Habermann TM, Focosi D, Seymour JF, et al. Progressive multifocal leukoencephalopathy after rituximab therapy in HIV-negative patients: a report of 57 cases from the Research on Adverse Drug Events and Reports project. *Blood* 2009; 113: 4834–4840.
4. Clifford DB, De Luca A, Simpson DM, Arendt G, Giovannoni G and Nath A. Natalizumab-associated progressive multifocal leukoencephalopathy in patients with multiple sclerosis: lessons from 28 cases. *Lancet Neurol* 2010; 9: 438–446.
5. von Andrian UH and Engelhardt B. Alpha4 integrins as therapeutic targets in autoimmune disease. *N Engl J Med* 2003; 348: 68–72.
6. Chen Y, Bord E, Tompkins T, Miller J, Tan CS, Kinkel RP, et al. Asymptomatic reactivation of JC virus in patients treated with natalizumab. *N Engl J Med* 2009; 361: 1067–1074.
7. Major EO. Reemergence of PML in natalizumab-treated patients – new cases, same concerns. *N Engl J Med* 2009; 361: 1041–1043.
8. Rudick RA, O'Connor PW, Polman CH, Goodman AD, Ray SS, Griffith NM, Jurgensen SA, Gorelik L, Forrestal F, Sandrock AW and Goelz S. Assessment of JC virus DNA in blood and urine from natalizumab-treated patients. *Ann Neurol* 2010; 68: 304–310.
9. Warnke C, Adams O and Kieseier BC. Asymptomatic reactivation of JC virus in patients treated with natalizumab. *N Engl J Med* 2009; 361: 2489; author reply 2489–2490.
10. Bonig H, Wundes A, Chang K, Lucas S and Papayannopoulou T. Increased numbers of circulating hematopoietic stem/progenitor cells are chronically maintained in patients treated with the CD49d blocking antibody natalizumab. *Blood* 2008; 111: 3439–3441.
11. Zohren F, Toutzaris D, Klärner V, Hartung HP, Kieseier B and Haas R. The monoclonal anti-VLA-4 antibody natalizumab mobilizes CD34+ hematopoietic progenitor cells in humans. *Blood* 2008; 111: 3893–3895.
12. Jing D, Oelschlaegel U, Ordemann R, Hölig K, Ehninger G, Reichmann H, et al. CD49d blockade by natalizumab in patients with multiple sclerosis affects steady-state hematopoiesis and mobilizes progenitors with a distinct phenotype and function. *Bone Marrow Transplant* 2010; 45: 1489–1496.
13. Ransohoff RM. Natalizumab and PML. *Nat Neurosci* 2005; 8: 1275.
14. Ryschkewitsch C, Jensen P, Hou J, Fahle G, Fischer S and Major EO. Comparison of PCR-southern hybridization and quantitative real-time PCR for the detection of JC and BK viral nucleotide sequences in urine and cerebrospinal fluid. *J Virol Methods* 2004; 121: 217–221.
15. Müller BT, Huber R, Henrich B, Adams O, Berns G, Siebler M, et al. Chlamydia pneumoniae, herpes simplex virus and cytomegalovirus in symptomatic and asymptomatic high-grade internal carotid artery stenosis. Does infection influence plaque stability? *Vasa* 2005; 34: 163–169.
16. Mendelson M, Monard S, Sissons P and Sinclair J. Detection of endogenous human cytomegalovirus in CD34+ bone marrow progenitors. *J Gen Virol* 1996; 77: 3099–3102.
17. Iacobaeus E, Ryschkewitsch C, Gravel M, Khademi M, Wallstrom E, Olsson T, et al. Analysis of cerebrospinal

- fluid and cerebrospinal fluid cells from patients with multiple sclerosis for detection of JC virus DNA. *Mult Scler* 2009; 15: 28–35.
18. Verbeeck J, Van Assche G, Ryding J, Wollants E, Rans K, Vermeire S, et al. JC viral loads in patients with Crohn's disease treated with immunosuppression: can we screen for elevated risk of progressive multifocal leukoencephalopathy? *Gut* 2008; 57: 1393–1397.
 19. Sadiq SA, Puccio LM and Brydon EW. JCV detection in multiple sclerosis patients treated with natalizumab. *J Neurol* 2010; 257: 954–958.
 20. Fedele CG, Ciardi MR, Delia S, Contreras G, Perez JL, De Oña M, et al. Identical rearranged forms of JC polyomavirus transcriptional control region in plasma and cerebrospinal fluid of acquired immunodeficiency syndrome patients with progressive multifocal leukoencephalopathy. *J Neurovirol* 2003; 9: 551–558.
 21. Van Assche G, Van Ranst M, Sciot R, Dubois B, Vermeire S, Noman M, et al. Progressive multifocal leukoencephalopathy after natalizumab therapy for Crohn's disease. *N Engl J Med* 2005; 353: 362–368.
 22. Jilek S, Jaquiéry E, Hirsch HH, Lysandropoulos A, Canales M, Guignard L, et al. Immune responses to JC virus in patients with multiple sclerosis treated with natalizumab: a cross-sectional and longitudinal study. *Lancet Neurol* 2010; 9: 264–272.

5 Diskussion

5.1 Das Zytokin IL-6 ist für eine Ex-vivo-Aktivierung von natürlich vorkommenden, IL-17 produzierenden T-Zellen (nTh17) nicht notwendig

Im Laufe des letzten Jahrzehnts gewannen das Zytokin IL-17 und IL-17 produzierende Zellen für die immunologische Forschung im Allgemeinen und für die neuroimmunologische Forschung im Speziellen an Bedeutung. Im Lichte der Rolle der IL-17 produzierenden Zellen bei Infektionen und Autoimmunerkrankungen wurden exogene, Th17-Zellen aktivierende Faktoren und für die Entwicklung dieser Zellen essentielle Transkriptionsfaktoren aufgezeigt (Dong, 2009; Korn, 2007). Neben den Th17-Zellen wurden ferner andere, seltene Arten von IL-17 produzierenden Zellen wie iNKT-Zellen und $\gamma\delta$ -T-Zellen identifiziert (Michel, 2007; Roark, 2008). Die meisten Studien beschäftigten sich bis dato allerdings vornehmlich mit sogenannten induzierten Th17-Zellen (iT17). Diese Zell-Subpopulation entsteht entweder nach erfolgter Selektion im Thymus in der Immunperipherie in einem inflammatorischen Milieu *in vivo* oder in einem kontrollierten Umfeld mit polarisierenden Bedingungen *in vitro*. Zum Zeitpunkt der Veröffentlichung der hier diskutierten Studie gab es jedoch nur wenige Arbeiten, die natürlich vorkommende, IL-17 produzierende T-Zellen im Thymus (nTh17-Zellen) genauer charakterisiert und beschrieben haben (Hofstetter, 2006; Marks, 2009; Roark, 2008).

In dieser Arbeit wurde die Rolle des Zytokins IL-6 für die Aktivierung von nTh17-Zellen genauer unter die Lupe genommen. Dieses Zytokin lenkt bei gleichzeitiger Anwesenheit von TGF- β die Entwicklung von naiven CD4⁺ Zellen in Richtung der induzierbaren IL-17 produzierenden Zellen und verhindert die Bildung von regulatorischen T-Zellen, die unter TGF- β in Abwesenheit von IL-6 *in vitro* entstehen (Bettelli, 2006). Eine wichtige Rolle kann hierbei die Anwesenheit von mikrobiellen Pathogenen spielen (Fang, 2009; Torchinsky, 2009). Um einen solchen mikrobiellen Reiz in einem simplifizierten murinen *ex vivo* Thymus-Modell zu simulieren, wurden die TLR-Liganden Lipopolysaccharide (LPS) und CpG verwendet.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigen, dass sowohl CpG als auch LPS in zwei unterschiedlichen Mausstämmen zu einem unterschiedlichen Zytokinaktivierungsmuster führen. CpG führte zu einer wesentlichen stärkeren IL-6 Produktion durch Thymozyten sowohl nach alleiniger Gabe als auch in Kombination mit CD3-Stimulation ohne Korrelation mit

IL-17 Produktion. Andererseits war die Induktion der IL-17 Produktion nach alleiniger CD3-Stimulation und die Potenzierung der IL-17 Produktion nach zusätzlicher LPS-Stimulation nicht durch eine relevante IL-6 Produktion durch Thymozyten begleitet. Daraus folgt, dass es keine strikte Korrelation zwischen der Produktion von IL-6 und IL-17 im Thymus gibt. In anderen Worten ausgedrückt, die Expression dieser beiden proinflammatorischen Zytokine im Thymus folgt keinem strikten gegenseitigen Abhängigkeitsverhältnis. Diese Schlussfolgerung findet ihre Bestätigung in den Untersuchungen der Thymozyten von IL-6-KO Mäusen auf dem genetischen Hintergrundstamm C57BL/6, in denen die Anzahl der nTh17-Zellen nach CD3-Stimulation nahezu identisch mit nTh17-Zellen in den Thymozyten des Wildtyps C57BL/6 unter den gleichen Stimulationsbedingungen war. Das für die Entstehung von iTh17-Zellen unentbehrliche Zytokin IL-6 ist für die Genese und Aktivierung von nTh17-Zellen im Thymus demnach nicht zwingend notwendig. Es ist anzunehmen, dass dieser Unterschied zwischen nTh17-Zellen und iTh17-Zellen einer von vielen ist.

Aus einer früheren Arbeit ergaben sich Hinweise für eine inhibitorische Wirkung des Zytokins IL-2 in Bezug auf die Genese der Th17-produzierenden Zellen in der Immunperipherie (Laurence, 2007). In der vorliegenden Arbeit zeigte sich hingegen keine Herunterregulation der nTh17-Zellen im Thymus. In den Thymozyten des BALB/c-Stamms konnte sogar eine statistisch signifikante Frequenzerhöhung der nTh17-Zellen im Thymus nach Stimulation mit IL-2 und CD3-Aktivierung verglichen mit alleiniger CD3-Stimulation nachgewiesen werden. Dieser Aspekt bestätigt Daten aus einer früher publizierten Arbeit, die keine nennenswerte Migration von iTh17-Zellen aus der Immunperipherie in den Thymus zeigten (Hofstetter, 2007).

Um einen möglichen Beitrag der IL-6 unabhängigen, IL-17 produzierenden, im Thymus maturierenden und im Verlaufe zum Teil residenten Population von invarianten natürlichen Killerzellen (iNKT-Zellen) (Brennan, 2013; Rachitskaya, 2008) in unserem experimentellen System zu überprüfen, verwendeten wir α -Galaktosylceramid (α -GalCer), ein Agens mit potenter aktivierender Wirkung auf iNKT-Zellen. Die entsprechende Stimulation mit α -GalCer führte zu einer sehr geringen IL-17 Produktion und hatte keinen zusätzlichen potenzierenden Effekt in Bezug auf IL-17 Produktion im Thymus nach kombinierter Stimulation mit einem anti-CD3-Antikörper. iNKT-Zellen können zwar formell nicht gänzlich als mögliche IL17-Produzenten im Thymus ausgeschlossen werden, doch deuten Ergebnisse dieser Arbeit und andere Untersuchungen (Marks, 2009) darauf hin, dass die iNKT-Zellen als mögliche Produzenten von IL-17 im Thymus zu vernachlässigen sind.

Eine andere IL-6 unabhängige IL-17 produzierende T-Zellsubpopulation im Thymus wurde beschrieben. Es handelt sich hierbei um sogenannte $\gamma\delta$ -T-Zellen. Hierbei wird zwischen CD27⁺, IFN- γ produzierenden $\gamma\delta$ -T-Zellen und CD27⁻, IL-17 produzierenden $\gamma\delta$ -T-Zellen unterschieden, die – wie bereits erwähnt – IL-6 unabhängig sind (Ribot, 2009). In Bezug auf künftige Zytokinproduktion durch $\gamma\delta$ -T-Zellen wird an einer anderen Stelle auf das Antreffen des spezifischen Antigens während der Reifungsperiode im Thymus hingewiesen; hierbei produzieren im weiteren Verlauf Antigen-naïve $\gamma\delta$ -T-Zellen IL-17 und Antigen-erfahrene Zellen IFN- γ (Jensen, 2008). Der Frage nach einer möglichen Kongruenz der oben beschriebenen Subpopulationen muss im Rahmen weiterer Untersuchungen, die nicht Gegenstand dieser Arbeit waren, nachgegangen werden. Wie aus früheren Arbeiten bekannt, stellen CD3⁺CD4⁻CD8⁻-Zellen, unter denen sich die $\gamma\delta$ -T-Zellen befinden, die zahlenmäßig kleinste Fraktion der Thymozyten dar (Hofstetter, 2006). Ferner konnte gezeigt werden, dass aus dem murinen Thymus *ex vivo* isolierte $\gamma\delta$ -T-Zellen weder nach alleiniger CD3- oder CpG-Stimulation noch nach kombinierter Aktivierung mit einem anti-CD3-Antikörper eine relevante IL-17 Produktion – im Gegensatz zu einer deutlichen Sekretion von IL-6 – aufwiesen (Abb. 1). Es ist also anzunehmen, dass – zumindest im experimentellen Setting dieser Arbeit – der Beitrag der $\gamma\delta$ -T-Zellen zu IL-17 Produktion im Thymus zu vernachlässigen ist. Wie bereits an anderer Stelle gezeigt, befindet sich die Mehrheit der IL-17 produzierenden Zellen im Thymus unter der CD4⁺CD8⁻-Subpopulation (Hofstetter, 2006). Demnach sind nTh17-Zellen als die bedeutendsten und zahlenmäßig am stärksten präsenten Produzenten von IL-17 im Thymus anzusehen. Die Tatsache, dass die Aktivierung der Thymozyten und nachfolgende IL-17 Produktion im Thymus durch TLR-Liganden im Sinne von infektiösen Partikeln verstärkt werden kann, ist im Lichte der Bedeutung dieses Zytokins in einer Reihe von autoimmunologischen Modellen (Marks, 2009; Roark, 2008), speziell in der EAE (Hofstetter, 2005; Komiyama, 2006), von besonderem Interesse und rückt die nTh17-Zellen in den Fokus der weiteren Erforschung.

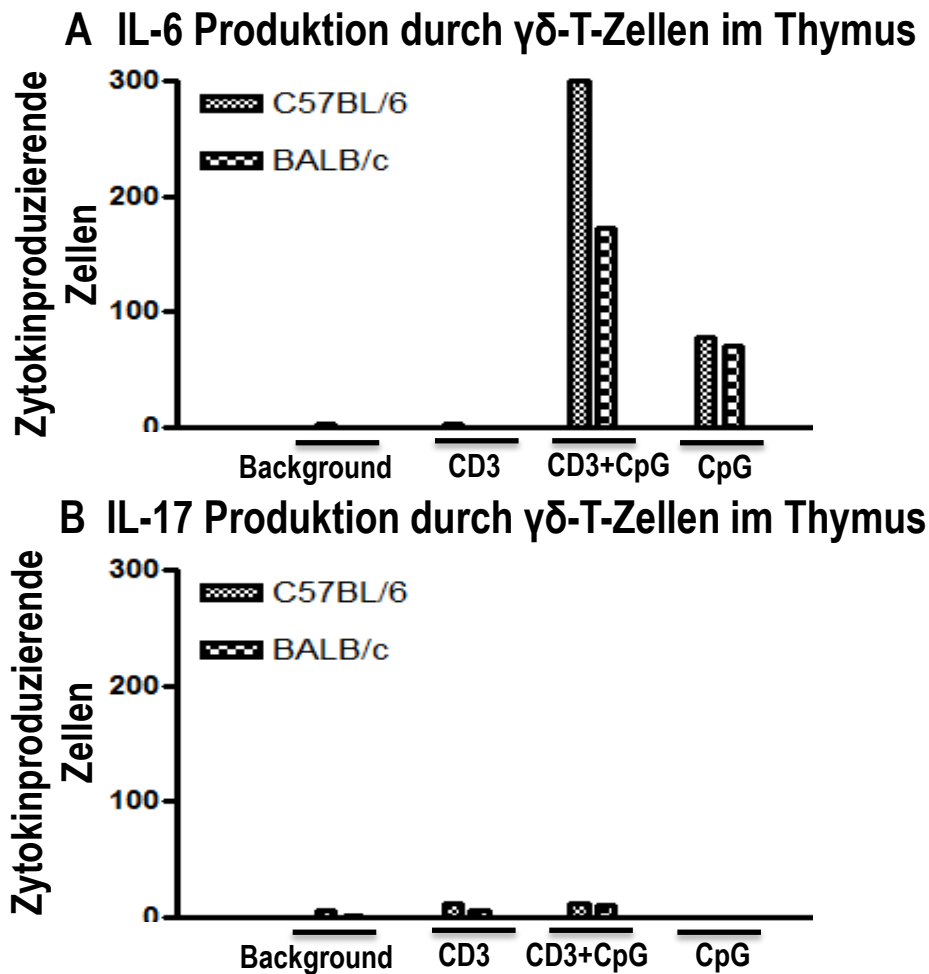


Abbildung 1. Produktion von IL-6 (A) und IL-17 (B) durch $\gamma\delta$ -T-Zellen im Thymus von BALB/c- und C57BL/6-Mäusen nach Stimulation mit einem anti-CD3-Antikörper, CpG und beiden Agenzien. Thymozyten naiver weiblicher BALB/c- oder C57BL/6-Mäuse wurden *ex vivo* isoliert. Anschließend erfolgte eine magnetische Separation sowie Kultivierung der $\gamma\delta$ -T-Zellen für 16 Stunden mit konsekutivem Nachweis einer entsprechenden Zytokinproduktion mittels eines ELISPOT-Assays. Es wurden ungefähr 150.000 Zellen pro Well ausgesät. Die Absolutzahl zytokinproduzierender Zellen bezieht sich auf 100.000 ausgesäte $\gamma\delta$ -T-Zellen. Die Ergebnisse beruhen auf gepoolten Daten von jeweils vier Mäusen, die in einem Experiment erhoben wurden.

Zusammenfassend konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die Stimulation durch bestimmte TLR-Liganden eine starke IL-6 Produktion im Thymus zur Folge hat, jedoch eine CD3-Stimulation keine derartigen Effekte nach sich zieht. Eine Korrelation zwischen der Produktion von IL-6 und IL-17 im Thymus besteht nicht. Ferner ist die IL-17 Produktion im Thymus nicht von IL-6 abhängig und wird nicht durch IL-2 reguliert.

5.2 Wirkung von CpG Oligonukleotiden auf die Produktion von Zytokinen im murinen PLPp-139-151-SJL-EAE-Modell

Das Hauptziel dieser Studie bestand in der Untersuchung der Wirkung einer spezifischen Immunstimulation mittels CpG auf die Zytokinstruktur in verschiedenen Kompartimenten während einer aktiven Immunreaktion im Rahmen einer induzierten murinen Autoimmunerkrankung des ZNS, der EAE. CpG sind synthetisch hergestellte Oligonukleotide mit naher Verwandtschaft zu CpG-Motiven in verschiedenen mikrobiellen Genomen, die als PAMP fungieren und als solche von TLR9 erkannt werden. Sie sind in der Lage, APC und T-Zellen zu aktivieren. Das Augenmerk lag hierbei auf potentiellen Unterschieden zwischen der Immunperipherie und dem Zielorgan der Autoimmunreaktion ZNS sowie auf verschiedenen Effekten bezogen auf autoantigenspezifische Th1- und Th17-Zellen. Die mögliche und bedingte Übertragbarkeit der Ergebnisse dieser EAE-basierten Studie auf die menschliche Erkrankung MS würde die Mechanismen einer klinischen Verschlechterung mit Progress und/oder Schub nach einer systemischen Infektion mit pathogenen mikrobiellen Erregern betreffen (Andersen, 1993; Buljevac, 2002; Correale, 2007; Edwards, 1998). In dieser Arbeit wurden CpG als paradigmatisches Immunstimulans verwendet und ihr co-stimulatorischer Effekt auf das PLPp-spezifische Zytokinmuster im murinen PLPp-SJL-EAE-Modell untersucht. In der vorliegenden Arbeit wurde in der akuten Phase der EAE die Zahl der PLPp-spezifischen IFN- γ -, IL-2- und IL-17-produzierenden Zellen in der Immunperipherie und im Zielorgan ZNS bestimmt. In Analogie zu Vorarbeiten (Segal, 2000; Tigno-Aranjunez, 2009) zeigen die Ergebnisse dieses Projekts, dass eine EAE-Induktion im murinen PLPp-SJL-EAE-Modell nach einem alternativen Protokoll mit PLPp und CpG in IFA im Gegensatz zum klassischen Protokoll, nach dem PLPp in CFA appliziert sowie zusätzlich PTX verwendet wird, keine klinische EAE auslöst, jedoch eine starke PLPp-spezifische Th1-Antwort in der Immunperipherie bei fehlender PLPp-spezifischer Th17-Antwort zur Folge hat. Die zunächst plausibel scheinende Schlussfolgerung einer vermeintlich pathogenen Rolle der Th1-Zellen sowie einer protektiven Rolle der Th17-Zellen in der murinen EAE ist jedoch nicht zutreffend, da EAE mittels autoantigenspezifischer Th1-Zellen auch in Abwesenheit von Th17-Zellen induziert werden kann (Kroenke, 2008).

Unter den Bedingungen der etablierten ZNS-Autoimmunität verstärken CpG die PLPp-spezifische IFN- γ -Antwort in der Immunperipherie – im experimentellen Setting der vorliegenden Arbeit in Splenozyten – deutlich. Die Tatsache, dass CpG die IFN- γ -Produktion auch in Abwesenheit von PLPp auslösen, ist wahrscheinlich dem stimulierenden Effekt auf die APC,

vor allem auf Monozyten und Makrophagen geschuldet. Eine kombinierte Stimulation mit PLPp und CpG führt jedoch zu einem überadditiven Effekt, i.e. die Zahl der PLPp-spezifischen T-Lymphozyten ist nach kombinierter Stimulation höher als die Summe der besagten T-Zellen nach jeweils alleiniger Stimulation mit CpG und PLPp. Dieser Effekt ist völlig unabhängig von klinischer Symptomatik im Verlaufe der EAE; die überadditive Wirkung auf die Zahl der PLPp-spezifischen T-Lymphozyten ließ sich sowohl in gesunden Tieren, die mit PLPp und CpG in IFA immunisiert wurden, als auch in den nach klassischem Protokoll immunisierten Mäusen mit schwerer EAE beobachten. Die autoantigenspezifische Produktion der Zytokine IL-2 und IL-17 wurde weder nach alleiniger Stimulation mit CpG noch nach kombinierter Gabe von CpG und PLPp relevant beeinflusst. Somit können die beobachteten Ergebnisse einer Stimulation von TLR9 in den autoreaktiven Zellen in der Immunperipherie die bekannten Effekte von TLR9 hinsichtlich des klinischen Verlaufs der EAE mit Bedeutung für das Auslösen sowie Aufrechterhaltung der Erkrankung und die histopathologischen Befunde betreffend (Prinz, 2009) nicht hinreichend erklären.

Im Zielorgan ZNS stellt sich ein differentes Bild dar. Bereits nach alleiniger CpG-Stimulation – ohne Zugabe von PLPp – lässt sich eine deutliche Produktion von IL-17 ohne begleitende IFN- γ -Produktion beobachten. Die gleichzeitige Stimulation mit CpG und PLPp führt zu einer deutlichen Verstärkung der Produktion von IFN- γ und IL-17. Die Anzahl der autoantigenspezifischen IL-2 produzierenden Zellen im ZNS ist niedrig und wird unter keiner der Stimulationsbedingungen beeinflusst. Hierbei ist anzumerken, dass im *ex vivo* isolierten entzündeten Rückenmark nicht zu vernachlässigende Menge an endogenem Autoantigen von residenten und eingewanderten APC an die autoantigenspezifischen T-Zellen präsentiert wird. Wenn also von alleiniger Stimulation mit CpG im experimentellen Setting die Rede ist, so ist doch von kombinierter Stimulation mit CpG und PLPp mit niedriger PLPp-Konzentration auszugehen. Diese Tatsache erklärt das Vorhandensein von zytokinproduzierenden Zellen im ZNS – hierbei sind IL-17 produzierende Zellen in der absoluten Mehrheit – bei fehlender Zugabe externer Stimulantien. CpG könnte in der Lage sein, die bereits vorhandene Th17-Antwort zu verstärken; eine Aktivierung der IL-17 produzierenden Zellen des angeborenen Immunsystems ist ebenfalls denkbar. Jedenfalls sind diese Zellen im verwendeten EAE-Modell nur im entzündeten ZNS und nicht in der Immunperipherie zu finden. Eine alternative Erklärung wäre, dass sie nur im ZNS aktiviert werden. Dies deutet darauf hin, dass der gleiche Immunstimulus, hier CpG, vollkommen unterschiedliche Effekte auf das Zytokinmuster in verschiedenen Stadien einer Autoimmunreaktion haben kann. Die al-

leinige Stimulation von TLR9 während der Priming-Phase ist nicht ausreichend zur Induktion von antigenspezifischen Th17-Zellen, aber sie hat einen maßgeblichen Effekt auf die Produktion von IL-17 im entzündeten Zielorgan *in situ* unter verschiedenen lokalen Bedingungen. Diese Überlegungen werden von den Studien gestützt, die keine Veränderung des enzephalitogenen Potentials der PLPp-spezifischen T-Zellen, die peripher geprimt und *in vitro* mit CpG co-stimuliert wurden, nach adoptivem Transfer im Vergleich zu konventionell restimulierten autoantigenspezifischen T-Zellen finden.

Als wichtigste Schlussfolgerung ist festzuhalten, dass mikrobielle Stimuli innerhalb des ZNS heterogene und variierende Effekte auslösen können. Sowohl das Vorhandensein eines infektiösen Stimulus als auch die Menge an ZNS-Autoantigen vor Ort können das Verhältnis zwischen IFN- γ und IL-17 beeinflussen. Die Zugabe von PLPp, die möglicherweise eine unrealistische Situation im Vergleich zu den *in vivo* vorherrschenden Bedingungen bedingt, führt zu einem vollkommen unterschiedlichen IFN- γ /IL-17-Verhältnis im Vergleich zur Kultivierung der Zellen nur mit endogenem PLPp ohne externe Zugabe. Eine wichtige Studie zeigte, dass das lokale Verhältnis zwischen IFN- γ und IL-17 in den Läsionen einen Progress der Erkrankung bestimmen kann (Stromnes, 2008). Folglich können verschiedene inflammatorische Läsionen im selben Zielorgan auf unterschiedliche Art und Weise, abhängig von Vorhandensein und Konzentration des Autoantigens und anderen lokalen Faktoren, moduliert werden. Eine ähnliche Ursache kann auch für intraindividuelle Unterschiede in den MS-Läsionen verantwortlich sein. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deuten darauf hin, dass die entscheidenden Effekte der entzündlichen Mediatoren bezogen auf eine mögliche Verbindung zwischen Infektion und Verschlechterung der bereits laufenden Autoimmunerkrankung des ZNS im entzündeten ZNS selbst erreicht werden. Für die klinische Situation ist ein mit anderen Beobachtungen (Hermann, 2006; Prinz, 2006; Serres, 2009) kongruentes Szenario vorstellbar, in dem Spuren von in der Immunperipherie, beispielsweise im Blut, in der Milz, in den Lymphknoten oder im darmassoziierten lymphatischen Gewebe, im Überfluss vorhandenen niedermolekularen pathogenen Faktoren die Blut-Hirn-Schranke im Zuge einer systemischen Entzündung überwinden. Auf diese Weise könnten sie zusammen mit niederschwellig weiter ablaufenden autoimmunen Prozessen zu einer Reaktivierung inaktiver oder supprimierter autoantigenspezifischer T-Zellen führen. Diese aktivierten Gedächtniszellen könnten andere antigenspezifische und „bystander“-Zellen, also aktivierte und durch Entzündungsmediatoren an den Ort der Inflammation angelockte, für das Zielan-

tigen unspezifische Zellen des angeborenen und/oder adaptiven Immunsystems, aus der Immunperipherie rekrutieren und somit für einen akuten Schub und/oder Progress der Erkrankung verantwortlich sein.

Unter Berücksichtigung der aktuellen Literatur zu EAE und anderen experimentell ausgelösten Autoimmunerkrankungen können die Ergebnisse dieser Studie nicht für eine besondere Pathogenität eines bestimmten Zytokins, sei es IFN- γ oder IL-17, sprechen. Vielmehr können verschiedene Zytokine mannigfaltige Autoimmunpathologien mit unterschiedlichen Charakteristika auslösen. Die beschriebenen und diskutierten Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass (1) CpG imstande sind, autoantigenspezifische Th1-Zellen ohne gleichzeitige Induktion von spezifischen Th17-Zellen zu primen; (2) CpG die autoantigenspezifische Produktion von IFN- γ sowohl in der Peripherie als auch im ZNS in der EAE verstärken und zu einer selektiven Aktivierung der autoantigenspezifischen Th17-Zellen im ZNS führen und (3) die Effekte in der Immunperipherie und im entzündeten ZNS aufgrund differenter Bedingungen im jeweiligen Mikromilieu sich qualitativ und quantitativ unterscheiden.

5.3 Hämatopoietische Vorläuferzellen stellen nach Mobilisation mit Natalizumab kein relevantes Reservoir für das JC-Virus dar

Auf Grundlage von in Querschnittsstudien nachgewiesener Mobilisation von CD 34⁺ hämatopoietischen Vorläuferzellen aus dem Knochenmark ins periphere Blut (Bonig, 2008; Jing, 2010; Zohren, 2008) sowie der Tatsache einer Persistenz von JC-Virus im Knochenmark sowohl HIV-positiver als auch HIV-negativer Patienten mit und ohne PML (Tan, 2009) erfolgte in der vorliegenden Arbeit die Überprüfung einer bislang nicht verifizierten Hypothese, die die PML-Entwicklung in mit Natalizumab behandelten Patienten auf ein Ausschwemmen von mutmaßlich mit dem JC-Virus infizierten CD 34⁺ Zellen aus dem Knochenmark mit konsekutivem Übertritt über die Blut-Hirn-Schranke ins Gehirn annahm.

Mittels Dichtegradientenzentrifugation wurden aus mit EDTA antikoagulierten venösen Proben von 67 mit Natalizumab behandelten RRMS-Patienten sowie 6 Patienten mit definitivem Nachweis einer PML *peripheral blood mononuclear cells* (engl.: mononukleäre Zellen des Bluts; PBMC) isoliert. Nach anschließender Anreicherung von CD 34⁺ Zellen mittels magnetischer Zellseparation und durchflusszytometrischer Quantifizierung der CD 34⁺- und der CD34⁻-Fraktion der jeweiligen Proben erfolgte die DNA-Extraktion aus diesen Fraktionen sowie aus dem zellfreien Plasma mit anschließender Amplifikation von JCV DNA.

Eine in der Vorarbeit festgestellte Mobilisation von CD 34⁺ hämatopoietischen Vorläuferzellen nach Gabe von Natalizumab (Zohren, 2008) konnte bestätigt werden. Im Gegensatz zu einer anderen Publikation (Chen, 2009) konnten trotz Anwendung von zwei unterschiedlichen PCR-Testverfahren für die Detektion von JCV DNA keine JC-Viruspartikel in den Immunzellen (PBMC, CD 34⁺ und CD34⁻ Zellen) in der vorliegenden Arbeit detektiert werden. Auch wurde kein JC-Virus in den zellulären Blutbestandteilen inklusive CD 34⁺ Zellen einer Kontrollgruppe mit zwei MS-Patienten und vier Patienten ohne Diagnose einer MS, die gesichert akut an PML erkrankt waren, festgestellt.

In Übereinstimmung mit der bekannten Literatur, wonach sich JCV in bis zu 40% der Plasmaproben von HIV-positiven Patienten (Cinque, 2009) und selten bei gesunden Probanden und MS-Patienten unabhängig vom Therapiemodus in Plasma nachweisen lässt (Iacobaeus, 2009; Sadiq, 2010), konnte in zwei von 104 Plasmaproben der Kohorte ein JCV-Nachweis erbracht werden. Hierbei wurde zum selben Zeitpunkt in den Immunzellen der betreffenden Patienten kein JCV detektiert. Weder klinisch noch MR-tomographisch ergaben sich Anhalte für das Vorliegen von PML bei den zwei oben erwähnten Patienten. Acht Monate nach Detektion von JCV im Plasma entwickelte einer dieser Patienten jedoch mit PML klinisch vereinbare Symptome, die ein entsprechendes MR-tomographisches Korrelat fanden. Die Frage, inwiefern transiente JC-Virämien mit dem späteren Auftreten von klinisch manifester PML korrelieren, kann aufgrund der begrenzten Patientenzahl der vorliegenden Studie nicht abschließend beantwortet werden.

Zusammenfassend konnte in der vorliegenden Studie die Hypothese einer über die Mobilisierung von CD 34⁺ Zellen aus dem Knochenmark induzierten JC-Virämie mit anschließender Infizierung des ZNS und PML-Entwicklung nicht bestätigt werden. Der genaue Mechanismus der Entwicklung der mit dem JC-Virus assoziierten Erkrankung PML im Zuge der Therapie von an RRMS erkrankten Patienten mittels Natalizumab bleibt weiterhin unklar.

6 Schlussfolgerungen

Die Suche nach dem auslösenden Mechanismus der MS dauert seit der erstmaligen Charakterisierung der klinischen Symptome der Erkrankung vor über 150 Jahren und der bereits früh erfolgten zutreffenden ätiopathogenetischen Zuordnung zu den entzündlichen Krankheiten des ZNS mit räumlicher Assoziation zu den cerebralen Gefäßen durch den deutschen Pathologen Eduard von Rindfleisch an (Lassmann, 1999). Später wurden Hypothesen zur toxischen und infektiösen Genese der MS aufgestellt; letztere spielen auch heute eine Rolle in der Ursachenforschung zur Entstehung der MS, die heutzutage im wissenschaftlichen Konsens als eine Autoimmunerkrankung multifaktorieller Genese definiert wird. Unbestritten ist der Zusammenhang von Infektion und Autoimmunität im Zuge des bereits ablaufenden Autoimmunprozesses, der sowohl im klinischen Alltag als auch im Tierexperiment vielfach beobachtet und beschrieben wurde. Mit Einführung spezifischer immunmodulatorischer Therapien ergaben sich neue Konstellationen, in denen der Zusammenhang zwischen MS und Infektion, die als Folge der Therapie auftritt und nicht als Auslöse- oder Verschlechterungsmechanismus der Autoimmunität im ZNS fungiert, im neuen Licht erscheint.

Durch nähere Charakterisierung der im Thymus vorkommenden nTh17-Zellen in zwei murinen Stämmen mit deren Abgrenzung zu den *in vitro* erzeugten iT17-Zellen sowie die Beschreibung des räumlich und zeitlich differenten Aktivierungsmusters der nTh17-Zellen entstammenden autoantigenspezifischen Th17-Zellen gegenüber den bereits länger bekannten autoantigenspezifischen Th1-Zellen im tierexperimentellen Pendant der MS, der murinen EAE, unter Simulation einer Infektion durch einen synthetisch hergestellten TLR9-Liganden ist diese Arbeit eine Erweiterung vorliegender Erkenntnisse über die Rolle des Mikromilieus und des Zeitpunktes sowie Ort des Kontaktes der Zellen des adaptiven Immunsystems mit ihren spezifischen (Auto-)Antigenen für den weiteren Verlauf der Erkrankung (Siffrin, 2005; Voß, 2013).

Ferner wurde mit einem weiteren Teilprojekt ein Beitrag zur Diskussion hinsichtlich der Ursache der lebensgefährlichen, viral vermittelten Komplikation der Therapie einer hochaktiven RRMS mit dem monoklonalen Antikörper Natalizumab geleistet. Es fanden sich keine Hinweise für den Transport von JCV in mobilisierten hämatopoietischen Stammzellen mit anschließendem Übergang in das ZNS und Entwicklung einer PML, so dass weitere Forschungsarbeiten auf diesem Gebiet notwendig sind, um die Gefahr dieser bedrohlichen Komplikation frühzeitig im Verlaufe der Behandlung besser beherrschen zu können.

Literatur- und Quellenverzeichnis

Buch

Murphy, K.; Travers, P. und Walport, M. **(2008)**: Janeway's Immunobiology, 7. Auflage, ISBN 0-8153-4123-7

Dissertationen

Siffrin, V. **(2005)**: Von der Infektion zur Autoimmunität: Die Bedeutung der Bystander-Aktivierung von Th-Zellen im Modell der experimentellen autoimmunen Enzephalitis, unv. Diss, Charité Universitätsmedizin Berlin

Voß, J. O. H. **(2013)**: Der Einfluss dendritischer Zellen auf den Krankheitsverlauf der Multiplen Sklerose im Tiermodell, unv. Diss, Charité Universitätsmedizin Berlin

Zeitschriften

Andersen, O.; Lygner, P. E.; Bergström, T.; Andersson, M. und Vahlne, A. **(1993)**: Viral infections trigger multiple sclerosis relapses: a prospective seroepidemiological study. J Neurol (Band 240), Nr. 7, Seite 417-422.

Anderson, K. V.; Jürgens, G. und Nüsslein-Volhard, C. **(1985)**: Establishment of dorsal-ventral polarity in the Drosophila embryo: genetic studies on the role of the Toll gene product, Cell (Band 42), Nr. 3, Seite 779-789.

Anderson, K. V.; Jürgens, G. und Nüsslein-Volhard, C. **(1985)**: Establishment of dorsal-ventral polarity in the Drosophila embryo: the induction of polarity by the Toll gene product, Cell (Band 42), Nr. 3, Seite 791-798.

Barcellos, L. F.; Oksenberg, J. R.; Begovich, A. B.; Martin, E. R.; Schmidt, S.; Vittinghoff, E.; Goodin, D.S.; Pelletier, D.; Lincoln, R. R.; Bucher, P.; Swerdlin, A.; Pericak-Vance, M. A.; Haines, J. L. und Hauser, S.L. **(2003)**: HLA-DR2 dose effect on susceptibility to multiple sclerosis and influence on disease course. Am. J. Hum. Genet (Band 72), Nr. 3, Seite 710-716.

Bettelli, E.; Carrier, Y.; Gao, W.; Korn, T.; Strom, T. B.; Oukka, M.; Weiner, H. L. und Kuchroo, V. K. **(2006)**: Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector T_H17 and regulatory T cells, Nature (Band 441), Nr. 7090, Seite 235-238.

Bonig, H.; Wundes, A.; Chang, K.; Lucas, S. und Papayannopoulou, T. **(2008)**: Increased numbers of circulating hematopoietic stem/progenitor cells are chronically maintained in patients treated with the CD49d blocking antibody natalizumab, Blood (Band 111), Nr. 7, Seite 3439-3441.

Brennan, P. J.; Brigl, M. und Brenner, M. B. **(2013)**: Invariant natural killer T cells: an innate activation scheme linked to diverse effector functions, Nat Rev Immunol (Band 13), Nr. 2, Seite 101-117.

Buljevac, D.; Flach, H. Z.; Hop, W. C.; Hijdra, D.; Laman, J. D.; Savelkoul, H. F.; Der Meché, F. G.; van Doorn, P. A. und Hintzen, R. Q. **(2002)**: Prospective study on the relationship between infections and multiple sclerosis exacerbations, Brain (Band 125), Nr. Pt 5, Seite 952-960.

Chen, Y.; Bord, E.; Tompkins, T.; Miller, J.; Tan, C. S.; Kinkel, R.P.; Stein, M. C.; Viscidi, R. P.; Ngo, L. H. und Koralnik, I. J. **(2009)**: Asymptomatic reactivation of JC virus in patients treated with natalizumab, N Engl J Med (Band 361), Nr. 11, Seite 1067-1074.

Cinque, P.; Koralnik, I. J.; Gerevini, S.; Miro, J. M. und Price, R.W. **(2009)**: Progressive multifocal leukoencephalopathy in HIV-1 infection, *Lancet Infect Dis* (Band 9), Nr. 10, Seite 625-636.

Constantinescu, C. S.; Farooqi, N.; O'Brien, K. und Gran, B. **(2011)**: Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) as a model for multiple sclerosis (MS), *Br J Pharmacol* (Band 164), Nr. 4, Seite 1079-1106.

Correale, J. und Farez, M. **(2007)**: Monocyte-derived dendritic cells in multiple sclerosis: the effect of bacterial infection. *J Neuroimmunol* (Band 190), Nr. 1-2, Seite 177-189.

Dong, C. **(2009)**: Differentiation and function of proinflammatory Th17 cells, *Microbes Infect* (Band 11), Nr. 5, Seite 584-588.

Edwards, S.; Zvartau, M.; Clarke, H.; Irving, W. und Blumhardt, L. D. **(1998)**: Clinical relapses and disease activity on magnetic resonance imaging associated with viral upper respiratory tract infections in multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* (Band 64), Nr. 6, Seite 736-741.

Fang, C.; Zhang, X.; Miwa, T. und Song, W. C. **(2009)**: Complement promotes the development of inflammatory T-helper 17 cells through synergistic interaction with Toll-like receptor signaling and interleukin-6 production, *Blood* (Band 114), Nr. 5, Seite 1005-1015.

Ferrante, P.; Caldarelli-Stefano, R.; Omodeo-Zorini, E.; Cagni, A. E.; Cocchi, L.; Suter, F. und Maserati, R. **(1997)**: Comprehensive investigation of the presence of JC virus in AIDS patients with and without progressive multifocal leukoencephalopathy. *J Med Virol* (Band 52), Nr. 3, Seite 235-242.

Frisque, R. J.; Bream, G. L. und Canella, M. T. **(1984)**: Human polyomavirus JC virus genome. *J Virol* 1984 (Band 51), Nr. 2, Seite 458-469.

Hein, T. und Hopfenmüller, W. **(2000)**: Hochrechnung der Zahl an Multiple Sklerose erkrankten Patienten in Deutschland, *Nervenarzt* (Band 71), Nr. 4, Seite 288-294.

Hermann, I.; Kellert, M.; Schmidt, H.; Mildner, A.; Hanisch, U. K.; Brück, W.; Prinz, M. und Nau, R. **(2006)**: Streptococcus pneumoniae infection aggravates EAE via toll-like receptor 2. *Infection and Immunity* (Band 74), Nr. 8, Seite 4841-4848.

Hofstetter, H. H.; Grau, C.; Buttmann, M.; Forsthuber, T. G.; Gaupp, S.; Toyka, K. V. und Gold, R. **(2007)**: The PLPp-specific T-cell population promoted by pertussis toxin is characterized by high frequencies of IL-17-producing cells, *Cytokine* (Band 40), Nr. 1, Seite 35-43.

Hofstetter, H. H.; Ibrahim, S. M.; Koczan, D.; Kruse, N.; Weishaupt, A.; Toyka, K. V. und Gold, R. **(2005)**: Therapeutic efficacy of IL-17 neutralization in murine experimental autoimmune encephalomyelitis, *Cel Immunol* (Band 237), Nr. 2, Seite 123-130.

Hofstetter, H. H.; Lühder, F.; Toyka, K. V. und Gold, R. **(2006)**: IL-17 production by thymocytes upon CD3 stimulation and costimulation with microbial factors, *Cytokine* 2006 (Band 34), Nr. 3-4, Seite 184-197.

Iacobaeus, E.; Ryschkewitsch, C.; Gravell, M.; Khademi, M.; Wallstrom, E.; Olsson, T.; Brundin, L. und Major, E. **(2009)**: Analysis of cerebrospinal fluid and cerebrospinal fluid cells from patients with multiple sclerosis for detection of JC virus DNA, *Mult Scler* (Band 15), Nr. 1, Seite 28-35.

Ip, Y. T.; Reach, M.; Engstrom, Y.; Kadalayil, L.; Cai, H.; González-Crespo, S.; Tatei, K. und Levine, M. **(1993)**: Dif, a dorsal-related gene that mediates an immune response in *Drosophila*, *Cell* (Band 75), Nr. 4, Seite 753-763.

Jensen, K. D.; Su, X.; Shin, S.; Li, L.; Youssef, S.; Yamasaki, S.; Steinman, L.; Saito, T.; Locksley, R.M.; Davis, M. M.; Baumgarth, N. und Chien, Y. H. **(2008)**: Thymic selection determines $\gamma\delta$ T cell effector fate: antigen-naïve cells make interleukin-17 and antigen-experienced cells make interferon- γ , *Immunity* (Band 29), Nr. 1, Seite 90-100.

Jing, D.; Oelschlaegel, U.; Ordemann, R.; Holig, K.; Ehninger, G.; Reichmann H.; Ziemssen, T. und Bornhäuser, M. **(2010)**: CD49d blockade by natalizumab in patients with multiple sclerosis affects steady-state hematopoiesis and mobilizes progenitors with a distinct phenotype and function, Bone Marrow Transplant, (Band 45), Nr. 10; Seite 1489-1496.

Kleinschmidt-DeMasters, B. K. und Tyler, K. L. **(2005)**: Progressive multifocal leukoencephalopathy complicating treatment with natalizumab and Interferon beta-1a for multiple sclerosis. N Engl J Med (Band 353), Nr. 4, Seite 369-374.

Komiyama, Y.; Nakae, S.; Matsuki, T.; Nambu, A.; Ishigame, H.; Kakuta, S.; Sudo, K. und Iwakura, Y. **(2006)**: IL-17 plays an important role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis, J Immunol (Band 177), Nr. 1, Seite 566-573.

Koralnik, I. J. **(2004)**: New insights into progressive multifocal leukoencephalopathy. Curr Opin Neurol (Band 17), Nr. 3, Seite 365-370.

Korn, T.; Oukka, M. und Bettelli E. **(2007)**: Th17 cells: effector T cells with inflammatory properties. Semin Immunol (Band 19), Nr. 6, Seite 362-371.

Kroenke, M. A.; Carlson, T. J.; Andjelkovic, A. V. und Segal, B. M. **(2008)**: IL-12 and IL-23-modulated T cells induce distinct types of EAE based on histology, CNS chemokine profile and response to cytokine inhibition. J Exp Med (Band 205), Nr. 7, Seite 1535-1541.

Langer-Gould, A.; Atlas, S. W.; Green, A. J.; Bollen, A. W und Pelletier, D. **(2005)**: Progressive multifocal leukoencephalopathy in a patient treated with Natalizumab. N Engl J Med (Band 353), Nr. 4, Seite 375-381.

Laurence, A.; Tato, C. M.; Davidson, T. S.; Kanno, Y.; Chen, Z.; Yao, Z.; Blank, R. B.; Meyan, F.; Siegel, R.; Hennighausen, L.; Shevach, E. M. und O'Shea, J. J. **(2007)**: Interleukin-2 signaling via STAT5 constrains T helper 17 cell generation, Immunity (Band 26), Nr. 3, Seite 371-381.

Lappe-Siefke, C.; Goebbels, S.; Gravel, M.; Nicksch, E.; Lee, J.; Braun, P.E.; Griffiths, I.R. und Nave, K.A. **(2003)**: Disruption of Cnp1 uncouples oligodendroglial functions in axonal support and myelination, Nat Genet (Band 33), Nr. 3, Seite 366-374.

Lassmann, H. **(1999)**: The pathology of multiple sclerosis and its evolution, Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci (Band 354), Nr. 1390, Seite 1635-1640.

Lemaitre, B.; Meister, M.; Govind, S.; Georgel, P.; Steward, R.; Reichhart, J. M. und Hoffmann, J. A. **(1995)**: Functional analysis and regulation of nuclear import of dorsal during the immune response in Drosophila, EMBO J (Band 14), Nr. 3, Seite 536-545.

Levin, L. I.; Munger, K. L.; O'Reilly, E. J.; Falk, K. I. und Ascherio A. **(2010)**: Primary infection with the Epstein-Barr virus and risk of multiple sclerosis, Ann Neurol (Band 67), Nr. 6, Seite 824-830.

Marks, B. R.; Nowyhed, H. N.; Choi, J. Y.; Poholek, A. C.; Odegard, J. M.; Flavell, R. A. und Craft, J. **(2009)**: Thymic self-reactivity selects natural interleukin 17-producing T cells that can regulate peripheral inflammation, Nat Immunol (Band 10), Nr. 10, Seite 1125-1132.

Medzhitov, R.; Preston-Hurlburt, P. und Janeway, C. A. Jr. **(1997)**: A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity, Nature (Band 388), Nr. 6640, Seite 394-397.

Michel, M. L.; Keller, A.C.; Paget, C.; Fujino, M.; Trottein, F.; Savage, P.B.; Wong, C. H.; Schneider, E.; Dy, M. und Leite-de-Moraes, M. C. **(2007)**: Identification of an IL-17-producing NK1.1(neg)

iNKT cell population involved in airway neutrophilia, J Exp Med 2007 (Band 204), Nr. 5, Seite 995-1001.

Prinz, M.; Garbe, F.; Schmidt, H.; Mildner, A.; Gutcher, I.; Wolter, K.; Piesche, M.; Schroers, R.; Weiss, E.; Kirschning, C. J.; Rochford, C. D.; Brück, W. und Becher, B. **(2006)**: Innate immunity mediated by TLR9 modulates pathogenicity in an animal model of EAE. J Clin Invest (Band 116), Nr. 2, Seite 456-464.

Rachitskaya, A. V.; Hansen, A. M.; Horai, R.; Li, Z.; Villasmil, R.; Luger, D.; Nussenblatt, R. B. und Caspi, R. R. **(2008)**: NKT cells constitutively express IL-23 receptor and ROR γ t and rapidly produce IL-17 upon receptor ligation in an IL-6-independent fashion, J Immunol (Band 180), Nr. 8, Seite 5167-5171.

Ransohoff, R.M. **(2005)**: Natalizumab and PML. Nat Neurosci 2005 (Band 8), Nr. 10, Seite 1275.

Ransohoff, R.M. **(2007)**: Natalizumab for Multiple Sclerosis. N Engl J Med (Band 356), Nr. 25, Seite 3622-3629.

Ribot, J. C.; deBarros, A.; Pang, D. J.; Neves, J. F.; Peperuzak, V.; Roberts, S. J.; Girardi, M.; Borst, J.; Hayday, A. C.; Pennington, D. J. und Silva-Santos, B. **(2009)**: CD 27 is a thymic determinant of the balance between interferon- γ - and interleukin-17-producing $\gamma\delta$ T cell subsets, Nat Immunol (Band 10), Nr. 4, Seite 427-436.

Rice, G. P.; Hartung, H. P. und Calabresi, P. A. **(2005)**: Anti- α 4 integrin therapy for multiple sclerosis: mechanisms and rationale. Neurology (Band 64), Nr. 8, Seite 1336-1342.

Rivers, T. M. und Schwentker, F. F. **(1935)**: Encephalomyelitis accompanied by myelin destruction experimentally produced in monkeys, J Exp Med (Band 61), Nr. 5, Seite 689-702.

Rivers, T. M.; Sprunt, D. H. und Berry G. P. **(1933)**: Observations on attempts to produce acute disseminated encephalomyelitis in monkeys, J Exp Med (Band 58), Nr. 1, Seite 39-53.

Roach, J. C.; Glusman, G.; Rowen, L.; Kaur, A.; Purcell, M. K.; Smith, K. D.; Hood, L. E. und Aderem, A. **(2005)**: The evolution of vertebrate Toll-like receptors, Proc Natl Acad Sci U S A (Band 102), Nr. 27, Seite 9577-9582.

Roark, C. L.; Simonian, P. L.; Fontenot, A.P.; Born, W. K. und O'Brien, R. L. **(2008)**: $\gamma\delta$ T cells: an important source of IL-17, Curr Opin Immunol (Band 20), Nr. 3, Seite 353-357.

Rodriguez, M. **(2003)**: A function of myelin is to protect axons from subsequent injury: implications for deficits in multiple sclerosis. Brain 1 (Band 26), Nr. Pt 4., Seite 770-782.

Sadiq, S. A.; Puccio, L. M. und Brydon, E. W. **(2010)**: JCV detection in multiple sclerosis patients treated with natalizumab, J Neurol 2010 (Band 257), Nr. 6, Seite 954-958.

Santiago, O.; Gutierrez, J.; Sorlozano, A.; de Dios Luna, J.; Villegas, E. und Fernandez, O. **(2010)**: Relation between Epstein-Barr virus and multiple sclerosis: analytic study of scientific production. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. (Band 29), Seite 857-866.

Serres, S.; Anthony, D. C.; Jiang, Y.; Broom, K. A.; Campbell, S. J.; Tyler, D. J.; van Kasteren, S. I.; Davis, B. G. und Sibson, N. R. **(2009)**: Systemic inflammatory response reactivates immune-mediated lesions in rat brain. J Neuroscience (Band 29), Nr. 15, Seite 4820-4828.

Sibley, W. A.; Bamford, C. R. und Clark, K. **(1985)**: Clinical viral infections and multiple sclerosis, Lancet (Band 1), Nr. 8441, Seite 1313-1315.

Stromnes, I. M.; Cerretti, L. M.; Liggitt, D.; Harris, R. A. und Gorman, J. M. **(2008)**: Differential regulation of central nervous system autoimmunity by T_H1 and T_H17 cells, Nat Med (Band 14), Nr. 3, Seite 337-342.

Smolianov, V.; Dehmel, T.; Kieseier, B. C.; Hemmer, B.; Hartung, H.-P. und Hofstetter, H. H. **(2012)**: Ex vivo activation of naturally occurring IL-17-producing T cells does not require IL-6, Cytokine (Band 58), Nr. 2, Seite 231-237.

Smolianov, V.; Dehmel, T.; Vollmar, P.; Mausberg, A. K.; Kieseier, B. C.; Hemmer, B.; Hartung, H.-P. und Hofstetter, H. H. **(2011)**: Alteration of T cell cytokine production in PLPp-139-151-induced EAE in SJL mice by an immunostimulatory CpG Oligonucleotide, J Neuroinflammation (Band 8), Nr. 59.

Tan, C.S.; Dezube, B.J.; Bhargava, P.; Autissier, P.; Wüthrich, C.; Miller, J. und Koralnik, I. J. **(2009)**: Detection of JC virus DNA and proteins in the bone marrow of HIV-positive and HIV-negative patients: implications for viral latency and neurotropic transformation, J Infect Dis (Band 199), Nr. 6, Seite 881-888.

Torchinsky, M. B.; Garaude, J.; Martin, A. P. und Blander, J. M. **(2009)**: Innate immune recognition of infected apoptotic cells directs T_H17 cell differentiation, Nature (Band 458), Nr. 7234, Seite 78-82.

Tullmann, M. J. **(2013)**: Overview of the epidemiology, diagnosis, and disease progression associated with multiple sclerosis, Am J Manag Care (Band 19), Seite 15-20.

Van Assche, G.; Van Ranst, M.; Sciot, R.; Dubois, B.; Vermeire, S.; Noman, M.; Verbeek, J.; Geboes, K.; Robberecht, W. und Rutgeerts, P. **(2005)**: Progressive multifocal leukoencephalopathy after natalizumab therapy for Crohn's disease, N Engl J Med (Band 353), Nr. 4, Seite 362-368.

Virtanen, J. O. und Jacobson, S. **(2012)**: Viruses and multiple sclerosis, CNS Neurol Disord Drug Targets (Band 11), Nr. 5, Seite 528-544.

von Adrian, U. H. und Engelhardt, B. **(2003)**: Alpha4 integrins as therapeutic targets in autoimmune disease, N Engl J Med (Band 348), Nr. 1, Seite 68-72.

Warnke, C.; Adams, O.; Hartung, H. P.; Gold, R.; Hemmer, B.; Hohlfeld, R.; Stangel, M.; Zipp, F.; Wiendl, H. und Kieseier, B. C. **(2011)**: Risikostratifizierung einer progressiven multifokalen Leukenzephalopathie unter Natalizumab, Der Nervenarzt (Band 82), Nr. 10, Seite 1314-1319.

Warnke, C.; Smolianov, V.; Dehmel, T.; Andrée, M.; Hengel, H.; Zohren, F.; Arendt, G.; Wiendl, H.; Haas, R.; Hartung, H.-P.; Adams, O. und Kieseier, B. C., **(2011)**: CD34+ progenitor cells mobilized by natalizumab are not a relevant reservoir for JC virus. Mult Scler (Band 17), Nr. 2, Seite 151-156.

Zohren, F.; Toutzaris, D.; Klärner, V.; Hartung, H. P.; Kieseier, B. und Haas, R. **(2008)**: The monoclonal anti-VLA-4 antibody natalizumab mobilizes CD34+ hematopoietic progenitor cells in humans, Blood (Band 111), Nr. 7, Seite 3893-3895.

Danksagung

Manche Unternehmungen im Leben erfordern mehrere Anläufe, Beharrlichkeit und Geduld. Sie werden erst durch das Mitwirken vieler wohlwollend gestimmter Wegbegleiter zu einem erfolgreichen Abschluss gebracht. Genauso verhielt es sich mit diesem Promotionsvorhaben, das vor fünfzehn langen Jahren im Neuroimmunologischen Labor der Arbeitsgruppe von Professor Bernd C. Kieseier durch Experimente zur Klärung einer Hypothese zur PML-Entstehung in MS-Patienten, die mit Natalizumab behandelt wurden, seinen Anfang nahm. Anschließend führte ich nach einer minutiösen und behutsamen Einführung in die magische ELISPOT-Welt durch meinen Betreuer Professor Harald H. Hofstetter spannende tierexperimentelle Studien durch, um dem Wesen der vielgestaltigen Th17-Zellen einen kleinen Schritt näher zu kommen. Mit dem Zusammenführen der entstandenen und publizierten Originalarbeiten in dieser Dissertationsschrift kann das Projekt nun endlich finalisiert werden.

Ich danke meinem Betreuer und Senior Partner Professor Hofstetter für das Heranführen an das Projekt, die Vermittlung des notwendigen Handwerkszeugs sowie die Förderung und Unterstützung. Professor Kieseier und Professor Clemens Warnke danke ich für die Überlassung eines spannenden Themas, ein stets offenes Ohr sowie sinnvolle Vorschläge bei aufkommenden Schwierigkeiten. Thomas Dehmel danke ich für seine tatkräftige Hilfe bei den Experimenten sowie seine ruhige und empathische Art im Arbeitsalltag. Allen Mitarbeitern im Neuroimmunologischen Labor danke ich für ihre Freundlichkeit und Hilfsbereitschaft. Meinem Freund PD Dr. David Kremer danke ich für das kritische Korrekturlesen der Dissertation und im besonderen Maße für die anregenden Gespräche im gemütlichen Ambiente.

Ein außerordentlicher Dank gilt meiner geliebten Frau Sofia, die auf dem manchmal schwierigen und steinigen Weg stets zu mir gehalten und sehr viel auf sich genommen hat, damit diese Arbeit zu Ende geführt werden konnte. Meinen Schwiegereltern danke ich für die bedingungslose Rückendeckung im turbulenten Alltag. Meinen beiden Töchtern Elisa und Milena danke ich dafür, dass sie da sind – sie sind das Licht in meinem Leben. Meinem Bruder Vladyslav danke ich für seinen Sinn für Humor. Der größte Dank gilt meinen Eltern. Sie haben mir das Medizinstudium ermöglicht und waren stets für mich da. Ihnen ist diese Arbeit gewidmet.