



**„Die Rolle der CD8⁺ T-Zellen in der Pathogenese der
Experimentellen Autoimmunen Enzephalomyelitis der Lewis-
Ratte“**

**„The role of CD8⁺ T cells in the pathogenesis of experimental
autoimmune encephalomyelitis in Lewis rats“**

Dissertation zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Graduate School of Life Sciences,
Julius-Maximilians-Universität Würzburg,

vorgelegt von

Monika Camara

aus

Buchen (Odenwald)

Würzburg 2014

Eingereicht am:
Bürostempel

Mitglieder des Promotionskomitees:

Vorsitzende/r: Prof. Dr. med. Thomas Dandekar

1. Betreuer: PD Dr. Thomas Kerkau

2. Betreuer: Prof. Dr. Thomas Hünig

3. Betreuer: Prof. Dr. Thomas Müller

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunden ausgehändigt am:

1 INHALTSVERZEICHNIS

2	ZUSAMMENFASSUNG	5
3	SUMMARY	6
4	MATERIAL UND METHODEN.....	7
4.1	Chemikalien und Reagenzien	7
4.1.1	Medien	7
4.1.2	Versuchstiere.....	8
4.1.3	Zelllinien und Bakterien.....	8
4.1.4	Vektoren und Restriktionsendonukleasen	9
4.1.5	Oligonukleotide	9
4.1.6	Antikörper	10
4.1.7	Kommerziell erhältliche Kits	11
4.1.8	Tierexperimente.....	11
4.2	Immunologische Methoden.....	13
4.2.1	Herstellung von Einzelzellsuspensionen aus Lymphknoten oder Milz	13
4.2.2	Zellzahlbestimmung mit Trypanblau.....	13
4.2.3	Isolierung von mononukleären Leukozyten aus Rückenmark und Gehirn	13
4.2.4	Aufreinigung von T-Zellen mittels magnetischer Zellsortierung	14
4.2.5	Durchflusszytometrie (FACS).....	14
4.2.6	Proliferationsassay/ Recall assay.....	15
4.2.7	Detektion von Zytokinen in Zellkulturüberständen	16
4.2.8	ELISpot zur Detektion von gpMBP-spezifischen CD8 ⁺ T-Zellen	16
4.2.9	ELISA zur Detektion von RT1.A ^I -Ig Dimer-sezernierenden Zell-Klonen.....	16
4.3	Histologie und Immunistochemie	17
4.3.1	Aufbereitung der Schnitte für die immunhistochemischen Analysen	17
4.3.2	Immunhistochemie.....	18
4.4	Molekularbiologische Methoden.....	20
4.4.1	Generierung von gpMBP-cDNS mittels der Reversen Transkriptase-Polymerase Ketten Reaktion (RT-PCR)	20
4.4.2	Polymerase-Ketten-Reaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR)	21
4.4.3	Restriktionsverdau von PCR-Produkten und Vektoren.....	22
4.4.4	Ligation	22
4.4.5	Transformation von <i>E. coli</i> Bakterien.....	22
4.4.6	Bakterienkultur, Kolonie-PCR, Plasmid-Gewinnung, Sequenzierung	23
4.4.7	Retrovirale Transduktion von eukaryotischen Zellen	24
4.4.8	Generierung von RT1.A ^I -Ig Dimeren	25
4.5	Biochemische Methoden	26
4.5.1	Aufreinigung von RT1.A ^I -Ig Dimeren	26
4.5.2	Beladung von RT1.A ^I -Ig Dimeren mit gpMBP-Peptiden.....	26
4.5.3	Statistik	27
5	EINLEITUNG	28
5.1	Verhinderung von Autoimmunität durch Immunologische Toleranz.....	28
5.2	Störungen der Selbsttoleranz führen zu Autoimmunerkrankungen.....	32
5.3	Ätiologie von Autoimmunerkrankungen.....	34
5.4	Multiple Sklerose	35
5.4.1	Epidemiologie	35
5.4.2	Klinik und Verlaufsformen der Multiplen Sklerose	35
5.4.3	Ätiologie der Multiplen Sklerose.....	36
5.4.4	Immunopathogenese der Multiplen Sklerose	39

5.5	Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis (EAE) der Lewis-Ratte	42
5.5.1	Aktive EAE	42
5.5.2	Passive EAE (adoptive Transfer EAE, AT-EAE)	43
5.6	T-Zell-Subpopulationen und ihre Rolle bei der MS und EAE	43
5.7	Fragestellung	51
6	ERGEBNISSE	52
6.1	Reduzierte Krankheitsaktivität der EAE in Abwesenheit von CD8 ⁺ T-Zellen	52
6.2	Reduzierte Infiltration von T-Zellen und Makrophagen in das ZNS in Abwesenheit von CD8 ⁺ T-Zellen.....	60
6.3	CD8-Defizienz beeinträchtigt die Generierung enzephalitogener CD4 ⁺ T-Zellen	65
6.4	Myelinspezifische CD4 ⁺ T-Zellen expandieren in CD8-defizienten Lewis-Ratten aber differenzieren nicht zu zytokinsezernierenden TH1-Effektorzellen aus.....	67
6.5	CD8 ⁺ T-Zellen produzieren Interferon- γ zu einem früheren Zeitpunkt nach Immunisierung mit gpMBP als CD4 ⁺ T-Zellen.....	70
6.6	Detektion von gpMBP-spezifischen CD8 ⁺ T-Zellen in Lewis-Ratten, die mit gpMBP in CFA s.c. immunisiert wurden	71
6.6.1	Detektion gpMBP-spezifischer CD8 ⁺ T-Zellen mittels IFN- γ ELISpot	71
6.6.2	Detektion von gpMBP-spezifischen CD8 ⁺ T-Zellen in Lewis-Ratten mittels Durchflusszytometrie.....	77
7	DISKUSSION	80
8	LITERATURVERZEICHNIS	85
9	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	104
10	TABELLENVERZEICHNIS	105
11	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	106
12	EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG (englisch/ deutsch)	108
13	DANKSAGUNG.....	109
14	LEBENS LAUF	110

2 ZUSAMMENFASSUNG

Die Multiple Sklerose (MS) und ihr Tiermodell, die Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis (EAE), sind Autoimmunerkrankungen des Zentralen Nervensystems (ZNS). Neben myelinspezifischen CD4⁺ T-Zellen tragen auch CD8⁺ T-Zellen zur Pathogenese dieser Erkrankungen bei. Allerdings ist die Rolle der CD8⁺ T-Zellen während der Induktionsphase der Erkrankung außerhalb des ZNS noch unklar. In dieser Arbeit wurde daher der Beitrag der CD8⁺ T-Zellen in der EAE der Lewis-Ratte näher untersucht.

Dazu wurde die Krankheitsaktivität der aktiven EAE in normalen Lewis-Ratten mit Tieren verglichen, in denen die CD8⁺ T-Zellen durch CD8-spezifische monoklonale Antikörper depletiert wurden. Die CD8-depletierten Tiere zeigten dabei eine verminderte Krankheitsaktivität im Vergleich zu den Kontrolltieren. Ebenso entwickelten CD8 knockout Ratten, die durch die Abwesenheit funktionsfähiger CD8⁺ T-Zellen gekennzeichnet sind, deutlich reduzierte Krankheitssymptome im Vergleich zu wildtypischen Tieren. Die reduzierte Krankheitsaktivität in den CD8-defizienten Tieren war von einer verminderten Infiltration von T-Zellen und Makrophagen in das ZNS begleitet. Zwar konnten aktivierte gpMBP-spezifische CD4⁺ T-Zellen in den drainierenden Lymphknoten von CD8-depletierten Ratten detektiert werden, diese produzierten jedoch in deutlich reduziertem Umfang pro-inflammatorische Zytokine wie beispielsweise Interferon- γ . Offensichtlich können in der aktiven EAE myelinspezifische CD4⁺ T-Zellen in Abwesenheit von CD8⁺ T-Zellen nicht vollständig zu Effektorzellen differenzieren und infolgedessen das ZNS nicht infiltrieren. Umgekehrt konnten nach adoptivem Transfer von voll ausdifferenzierten enzephalitogenen CD4⁺ Effektorzellen sowohl in normalen als auch CD8-defizienten Empfängertieren gleich starke Symptome einer AT-EAE beobachtet werden. Die Entfaltung des pathogenen Potentials voll ausgereifter CD4⁺ Effektorzellen scheint somit nicht von der Präsenz von CD8⁺ T-Zellen abzuhängen.

Mit Hilfe eines Ratten-IFN- γ ELISpots gelang erstmals die Detektion Interferon- γ -produzierender gpMBP-spezifischer CD8⁺ T-Zellen in Tieren, die zuvor mit gpMBP immunisiert wurden. Zum direkten Nachweis von gpMBP-spezifischen CD8⁺ T-Zellen wurden RT1.A^I-Ig Dimere generiert und mit verschiedenen gpMBP-Peptiden beladen. Tatsächlich konnten in den drainierenden Lymphknotenzellen von Ratten, die zuvor mit gpMBP in CFA immunisiert wurden, CD8⁺ T-Zellen detektiert werden, die gpMBP₁₂₅₋₁₃₃-beladene RT1.A^I-Ig Dimere erkennen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit legen insgesamt den Schluss nahe, dass bei der EAE der Lewis-Ratte Interferon- γ -produzierende CD8⁺ T-Zellen in der Peripherie mit myelinspezifischen CD4⁺ T-Zellen interagieren und damit deren Differenzierung zu ZNS-infiltrierenden Effektorzellen ermöglichen.

3 SUMMARY

Multiple Sclerosis (MS) and its corresponding animal model Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE) are autoimmune diseases of the central nervous system (CNS). Besides CD4⁺ T cells specific for myelin-derived antigens CD8⁺ T cells additionally contribute to the pathogenesis of that disease. However, the role of CD8⁺ T cells during the induction phase of the disease outside the CNS has not been clarified so far. Thus the contribution of CD8⁺ T cells to the immunopathogenesis of EAE in the Lewis rat was investigated in this work.

For that purpose active EAE was induced in normal Lewis rats and animals that were deficient for CD8⁺ T cells due to the application of CD8-specific monoclonal antibodies. The CD8-depleted animals showed diminished disease activity in comparison to control rats. Equally, CD8-knockout rats, characterized by the absence of functional CD8⁺ T cells, developed clearly reduced symptoms of the disease in comparison to wild type littermates. Reduced disease activity of the CD8-deficient animals was accompanied by reduced infiltration of T cells and macrophages into the CNS. In the draining lymph nodes activated gpMBP-specific CD4⁺ T cells could be detected in the absence of CD8⁺ T cells, but they produced less amounts of proinflammatory cytokines like interferon- γ than CD4⁺ T cells of normal rats. Obviously in the active EAE, myelin-specific CD4⁺ T cells are not able to differentiate completely into effector cells and invade the CNS upon absence of CD8⁺ T cells. In contrast fully differentiated encephalitogenic CD4⁺ effector cells equally potently induced EAE upon transfer into either normal or CD8-deficient rats. Hence, the pathogenic potential of completely differentiated CD4⁺ effector cells does not depend on the presence of CD8⁺ T cells.

With the help of a rat-IFN- γ ELISpot interferon- γ -producing gpMBP-specific CD8⁺ T cells were detected in animals immunized with gpMBP. To directly detect gpMBP-specific CD8⁺ T cells, RT1.A¹-Ig dimeres were generated and loaded with different gpMBP-derived peptides. Indeed, CD8⁺ T cells specifically recognizing RT1.A¹-Ig dimeres loaded with gpMBP₁₂₅₋₁₃₃ could be detected in the draining lymph nodes of rats, immunized with gpMBP in CFA.

The results of this work allow the conclusion that in the EAE of the Lewis rat interferon- γ -producing CD8⁺ T cells interact with myelin-specific CD4⁺ T cells, thus licensing these cells to differentiate into CNS invading effector cells.

4 MATERIAL und METHODEN

4.1 Chemikalien und Reagenzien

Sofern nicht anders vermerkt, wurden verwendete Substanzen von den Firmen AppliChem GmbH, Carl Roth GmbH, GE Healthcare, Gibco BRL/Life Technologies oder Sigma-Aldrich bezogen.

4.1.1 Medien

Kulturmedia für eukaryotische Zellen:

- RPMI⁺: RPMI 1640 mit L-Glutamin (PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland bzw. GibcoInvitrogen, Darmstadt, Deutschland), das mit 5% FCS (Fötale Kälberserum) und 10% SC (supplement complete), versetzt wurde.
- DMEM: DMEM mit Glukose und L-Glutamin (GibcoInvitrogen, Darmstadt, Deutschland), versetzt mit 10% FCS und Antibiotika (Penezillin und Streptomycin).
- DMEM⁺: DMEM + GlutaMAXTM-1 (mit Glukose und 25mM HEPES, GibcoInvitrogen, Darmstadt, Deutschland), versetzt mit 10% FCS und Antibiotika (Penezillin und Streptomycin).
- ISF-1: ISF-1 Medium (Biochrom, Berlin, Deutschland), versetzt mit Antibiotika (Penezillin und Streptomycin) sowie 10mM HEPES.
- Einfriermedium: 50% FCS, 40% RPMI⁺, 10% DMSO
- SC-supplement: 500ml Hitze-deaktiviertes FCS, 100ml Na-Pyruvat 100mM, 100ml nicht-essentielle Aminosäuren, 100ml Penizillin-Streptomycin (100µg/ml) und 5ml β-Merkaptoethanol 50mM.

Kulturmedia für prokaryotische Zellen:

- LB-Medium: 20g LB mit Wasser auf 1Liter auffüllen, autoklavieren und bei 4°C lagern.

Pufferlösungen:

- PBS (1x): 4mM KH₂PO₄, 16mM Na₂HPO₄, 115mM NaCl (pH 7,3)
- FACS-Puffer: PBS mit 0,1% BSA und 0,05% NaN₃

- BSS (Hank`s balanced salt solution): zu 125ml BSS I noch 125ml BSS II hinzufügen und mit Wasser auf 1Liter auffüllen.
BSS I: 50g Glukose, 3g KH_2PO_4 , 11,9g NaH_2PO_4 , 0,4g Phenylrot, alles mit Wasser auf 5Liter auffüllen.
BSS II: 9,25g CaCl_2 , 20g KCl, 320g NaCl, 10g MgCl_2 , 10g MgSO_4 , mit Wasser auf 5Liter auffüllen.
- BSS/BSA: BSS versetzt mit 0,2% BSA
- 2xHBS: 50mM HEPES (pH 7,2), 10mM KCl, 12mM Glukose, 280mM NaCl, 1,5mM NaH_2PO_4
- TBS (1x): 25mM Tris-HCl (pH 7,5), 150mM Glycin, 0,1% NaN_3 (w/v)
- ATV: 0,05% Trypsin, 0,02% EDTA in PBS

4.1.2 Versuchstiere

Für die Experimente wurden weibliche Lewis-Ratten von dem Zuchtlabor Charles River (Sulzfeld, Deutschland) mit einem Gewicht von 100-120g, was einem Alter von 6-8 Wochen entspricht, bezogen.

CD8 knockout (CD8KO) Lewis-Ratten (Zan et al, 2003) wurden von Joel David Taurog M.D. (University of Texas Southwestern Medical Center, Dallas) zur Verfügung gestellt. Für die Experimente wurden die Tiere im Tierstall des Instituts für Virologie und Immunbiologie der Universität Würzburg gezüchtet.

Aller Experimente wurden durch die Regierung von Unterfranken genehmigt und von den autorisierten Personen überwacht.

4.1.3 Zelllinien und Bakterien

- HEK 293T:
 - humane, embryonale Nierenzellen (ATCC# CRL-11268)
 - exprimiert das "SV40 large T-Antigen", welches die DNS Replikation von Plasmiden mit "SV40 origin of replication" ermöglicht
- Raji:
 - B-Zelllinie des humanen Burkitt' s Zell Lymphoma (ATCC# CCL-86)
- J558L β 2m
 - Myelomzelllinie, Zellen isoliert aus BALB/c Mäusen (Lundblad et al., 1972)
 - transduziert mit β 2-Mikroglobulin der Ratte
- kompetente *E.coli* Bakterien

4.1.4 Vektoren und Restriktionsendonukleasen

- pEGZ: retroviraler Vektor für Murine Leukemia Virus (MuLV) getriebene konstitutive Expression eines Gens von Interesse, inseriert in die Multiple Kloning Site gefolgt von einer IRES vermittelten Expression eines EGFP-Zeo Fusionsproteins.

- pHit60: ist ein MuLV-basiertes, retrovirales Expressionsplasmid, bei dem die Expression von *gag-pol* über den Promotor des Cytomegalovirus (CMV) getrieben werden. Es enthält einen SV40 ori (Soneoka et al., 1995).

- VSV: kodiert für das *env* Protein des Vesikulären Stomatitis Virus (Pietschmann et al., 1999).

- pXlg: Vektor, der Restriktionsstellen für MluI und XhoI enthält. Der Vektor kodiert für die Signalsequenz der schweren Kette des IgG1, die nach der XhoI Restriktionsstelle beginnt (Dal Porto et al., 1993).

Die benutzen Restriktionsendonukleasen sowie die dazugehörigen Puffer stammen alle von der Firma Fermentas (wurde mittlerweile von Thermo Scientific aufgenommen). Ebenfalls von der Firma Fermentas kamen die verwendeten DNA-Leitern und der Ladepuffer.

4.1.5 Oligonukleotide

Übersicht über die verwendeten Primer. Die Oligonukleotide, die in ihrer Bezeichnung MHC I, gpMBP oder RT1.A¹ enthalten, wurden von der Firma Sigma Aldrich bezogen. Alle anderen wurden freundlicherweise von der Arbeitsgruppe von Herrn Professor Thomas Herrmann, Würzburg, zur Verfügung gestellt.

Primer für die Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Primer	Sequenz	Interne Schnittstelle
LEW MHC I - fwd	ATATCCATGGGCCGCCACCATGGGGGCGATGGCACC	Nco I
LEW MHC I - rev	ATATGGATCCTCATGCTTTACAATCTGGGA	BamH I
gpMBP - fwd	ATATTCATGAGCCGCCACCATGGCGTCACAGAAGAGAC	BspH I
gpMBP - rev	ATATAGATCTTCAGCGTCTTGCCATGGGA	Bgl II
gpMBP - fwd2	ATATGAATTCGCCGCCACCATGGCGTCACAGAAGAGAC	EcoR I
LEW MHC I - fwd2	ATATGAATTCGCCGCCACCATGGGGGCGATGGCACC	EcoR I
RT1A ¹ - Ig Dimere - fwd	CTGCACGCGTCGGGCTCTCACTCGATG	Mlu I
RT1A ¹ - Ig Dimere - rev	CACCTCGAGCCATCTCTGGGTAAGCGGCTC	Xho I

Primer für die Sequenzierung

SFG-S65T fow	CAAAGTAGACGGCATCGCAGCTTG
SFG-S65T rev	TGATATTGTTGAGTCAAACTAGAGC
gpMBP - rev	ATATAGATCTTCAGCGTCTTGCCATGGGA
gpMBP - fwd2	ATATGAATTCGCCGCCACCATGGCGTCACAGAAGAGAC
LEW MHCI - intern fwd2	TCCAGAGGATGTATGGCTGTGACG
PSI	ACCGCCCTCAAAGTAGACG
IRES II	TGGAAAATAACATATAGA
EGN rev I	GCCTTATTCCAAGCGGCT
Polyhedrin - fwd	AAATGATAACCATCTCGC
Polyhedrin - rev	GTCCAAGTTTCCCTGTAG
RT1AI intern - rev	CTCACTCGGTAATTCTGCTCGTTTC
RT1AI intern - fwd	AGACCTGAAGGTGATGTCACCCT
pX/Ig fow	CAGGTCCAACCTGCACGCG
pX/Ig rev	GACCTGGCTCACCTCGAG

4.1.6 Antikörper

Fluoreszenzgekoppelte Antikörper für FACS-Analysen (gegen Ratte gerichtet)

Antigen	Klon	Konjugat	Isotyp	Bezugsquelle
CD4	OX35	PECy5, APC, Alexa 647, bio	Maus IgG2a, κ	BioLegend bzw. BD Pharmingen
CD8alpha	OX8	PerCP, FITC, bio	Maus IgG1, κ	BioLegend bzw. BD Pharmingen
CD8alpha	G28	FITC, bio	Maus IgG1, κ	BD Pharmingen
CD8beta	341	FITC	Maus IgG1, κ	BD Pharmingen
αβTZR	R73	PE, FITC, bio	Maus IgG1, κ	BD Pharmingen
CD25	OX39	FITC	Maus IgG1, κ	BD Pharmingen
γδTZR	V65	bio	Maus IgG1, κ	BD Pharmingen
RT1.A ^I	OX18	PE	Maus IgG1, κ	BioLegend
CD11b/c	OX42	bio	Maus IgG2a, κ	BD Pharmingen
NKR-P1A/B	10/78	bio	Maus IgG1, κ	BD Pharmingen
IgG1 κ light chain		FITC	Ratte IgG1, κ	BD Pharmingen
Ki 67	16A8	PE	Ratte IgG2A, κ	BioLegend
Foxp3	150D	PECy5	Maus IgG1, κ	BioLegend
IFN-γ	DB-1	FITC	Maus IgG1, κ	BD Pharmingen
IL-17	TC11- 18H10.1	PE	Maus IgG1, κ	BioLegend
Ig	212-065- 082 (Code)/ 95647 (Lot)	bio		Jackson ImmunoResearch

Antikörper für die *in vivo* Anwendung (gegen Ratte gerichtet)

Anti-CD8α	(Klon OX8; BioXcell, West Lebanon, USA)
Anti-CD8β	(Klon 341; InVivo BioTech Services GmbH, Hennigsdorf, Deutschland)
PPV06	Isotypkontrolle Maus IgG1 (Klon PPV06; EXBIO, Prag, Tschechien)
MOPC-21	Isotypkontrolle Maus IgG1 (Klon MOPC-21; InVivo BioTech Services GmbH, Hennigsdorf, Deutschland)

4.1.7 Kommerziell erhältliche Kits

QIAquick® PCR Purification Kit (50)	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
JETsorb Gel Extraction Kit/ 150	Genomed GmbH, Löhne, Deutschland
QIAquick Gelextraction Kit 250	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
JETSTAR 2.0 Plasmid Miniprep Kit	Genomed GmbH, Löhne, Deutschland
GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit	Fermentas GmbH, St. Leon Rot, Deutschland
JETSTAR 2.0 Plasmid Midiprep Kit	Genomed GmbH, Löhne, Deutschland
DNA Clean Up Kit	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Rat-IFN- γ ELISpot	MABTECH AB, Nacka Strand, Schweden
Streptavidin MicroBeads	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland

4.1.8 Tierexperimente

4.1.8.1 Depletion von CD8-exprimierenden Zellen *in vivo*

Zur Depletion von CD8-exprimierenden Zellen wurden den Ratten zwei Tage vor Immunisierung mit gpMBP in CFA 0,45mg/Ratte des monoklonalen Antikörpers OX8 oder 341 in PBS in die Schwanzvene injiziert. Der mAk OX8 erkennt CD8 α -exprimierende Zellen. Der mAk 341 ist gegen CD8 β -exprimierende Zellen gerichtet. Kontrolltiere wurden auf gleiche Weise mit je 0,45mg/Ratte des monoklonalen Antikörpers der IgG1 Isotyp Kontrolle (PPV06 oder MOPC-21) in PBS behandelt.

4.1.8.2 Induktion einer Experimentellen Autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE)

Aktive EAE durch Injektion von gpMBP in CFA s.c.

Die aktive EAE wurde induziert indem den Tieren subkutan (s.c.) je 50 μ l einer Emulsion bestehend aus gpMBP (25-75 μ g; eigene Herstellung, Weishaupt et al., 2000) und CFA (0,1-1mg/ml) in die Sohlen beider Hinterpfoten injiziert wurden (Weishaupt et al., 2000). Der Tag der Immunisierung wurde als Tag 0 gelistet. Nach 9-12 Tagen kommt es zu ersten Krankheitssymptomen. Das klinische Bild der EAE Symptome sind Lähmungserscheinungen, die an der Schwanzspitze beginnen, Richtung Kopf aufsteigen und von einem Gewichtsverlust begleitet werden. Die Schwere der Lähmungen wird in einen Score von 0-10 (King et al., 1983) eingeordnet (siehe Tab. 1).

Tabelle 1: Einteilung der EAE-Symptome in einen Stärkegrad von 0-10

Krankheitsgrad (Score)	Klinische Symptome
0	Keine
1	Läuft normal, proximal 2/3 des Schwanzes waagrecht, Schwanzspitze hängt runter
2	Läuft normal, gesamter Schwanz schleift auf dem Boden
3	Zusätzlich etwas breitbeiniger Gang, geringe Ataxie
4	Breitbeiniger ataktischer Gang, Hinterbeine nicht mehr ganz durchgestreckt, Hintern tiefer als bei 3
5	zusätzlich klappt beim Laufen öfter oder immer ein Hinterbein nach hinten weg, kann jedoch wieder vollständig für den nächsten Schritt nach vorne gebracht werden (geringe Paraparese der Hinterbeine)
6	ein Bein konstant hinten, kann für den Schritt nicht mehr unter den Körper gebracht werden; oder beide Beine inkonstant hinten, können noch unter den Körper gezogen werden; oder (häufig in der Rückbildungsphase) seitliches Wegrutschen beider Beine, Gang im Spagat
7	beide Hinterbeine fast völlig oder völlig gelähmt, können nicht mehr bis zur Spagatstellung vorgezogen werden (schwere Paraparese oder Paraplegie)
8	Schwäche auch der Vorderbeine, zieht sich nicht mehr gerade und zügig voran, Aufstützen des Oberkörpers nur auf die Unterarme (Tetraparese)
9	Tetraparese und Atemnot, moribund
10	wegen des Zustandes getötet; gestorben

Nach der Immunisierung wurden die Tiere täglich gewogen und der Grad der Krankheitsaktivität (Score) notiert.

Induktion einer Adoptiven Transfer-EAE (AT-EAE, passive EAE)

CD4⁺ T-Zellen, die am Tag 10 nach Immunisierung mit gpMBP in CFA aus den drainierenden Lymphknoten von wildtypischen oder CD8KO Ratten isoliert wurden, wurden vor dem Transfer *ex vivo* für fünf Zyklen mit 10µg/ml gpMBP restimuliert (Weishaupt et al., 2004).

Für die Induktion einer passiv induzierten AT-EAE wurden 8x10⁶ der *ex vivo* aktivierten, gpMBP-spezifischen CD4⁺ T-Zellen (Weishaupt et al., 2000) in die Schwanzvene von weiblichen wildtypischen bzw. CD8KO Lewis-Ratten injiziert.

Die Tiere wurden wie bei der aktiven EAE jeden Tag gewogen und der Score notiert.

4.2 Immunologische Methoden

4.2.1 Herstellung von Einzelzellsuspensionen aus Lymphknoten oder Milz

Die zu untersuchenden Organe wurden nach Tötung der Tiere durch Begasung mit CO₂ entnommen. Zur Analyse von Lymphknotenzellen wurden von unbehandelten Tieren aus den oberflächlichen Lymphknoten bzw. von immunisierten Tieren aus den poplitealen und inguinalen Lymphknoten Einzelzellsuspensionen hergestellt. Die Organe wurden dazu mit einem Spritzenstempel einer 10ml Spritze durch ein Zellsieb (70µm, BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland) in eine Petrischale gerieben. Für eine optimale Gewinnung der Zellen wurde das Sieb zwischendurch mit BSS/BSA gespült. Anschließend wurde die Einzelzellsuspension in ein 50ml Tube überführt und mit BSS/BSA aufgefüllt. Die Zellen wurden dann bei 1600rpm für 3min bei 4°C gewaschen. Die Lymphknotenzellen wurden danach in BSS/BSA resuspendiert und in einer Neubaukammer gezählt und weiter analysiert. Milzzellen wurden zur Lyse der Erythrozyten auf dem Vortexer in 6ml ddH₂O resuspendiert. Anschließend wurde die gleiche Menge an 1,8% NaCl hinzugefügt. Die Zellen wurden erneut mit BSS/BSA gewaschen, ebenfalls gezählt und weiter analysiert.

4.2.2 Zellzahlbestimmung mit Trypanblau

Zur Zellbestimmung wurden 10µl der jeweiligen Zellsuspension mit 90µl Trypanblau (0,04% in PBS; Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) verdünnt. Trypanblau wird von toten Zellen aufgenommen und zeigt damit die Zellviabilität der analysierten Zellen an. Von der Zell-Trypanblaulösung wurden 10µl in die Neubauerzählkammer gegeben und die Zellen in den vier Großquadraten ausgezählt. Die Bestimmung der Zellzahl/ml erfolgte nach der folgenden Formel: (gezählte Zellzahl/4) x Verdünnung x 10⁴ (Kammerfaktor).

4.2.3 Isolierung von mononukleären Leukozyten aus Rückenmark und Gehirn

Zunächst wurde das Rückenmark bzw. das Gehirn mit dem Stempel einer 10ml Spritze durch ein Eisendrahtsieb durchgerieben und in 20ml Rückenmarkresuspensionspuffer (PBS, 0,1% BSA, 1% Glukose, 100µg/ml DNaseI) aufgenommen. Nach einem Zentrifugationsschritt (1600rpm, 10Min, 4°C) wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 6ml 30%igem Percoll (GE Healthcare, Uppsala, Schweden) resuspendiert. Für die Isolierung der Leukozyten wurde ein Percollgradient hergestellt, indem das Percoll unterschiedlich stark mit Percollverdünnungspuffer (PBS, 0,1% BSA, 1% Glukose) verdünnt wurde. Zunächst wurden 4ml 45%igem Percoll in ein 15ml Zentrifugenröhrchen pipettiert und mit 2ml 70%igem Percoll unterlegt. Die Rückenmarksuspension wurde vorsichtig auf das 45%ige Percoll aufgeschichtet und der Ansatz bei 2300rpm für 20 Minuten bei 4°C ohne Bremse zentrifugiert. Das Myelin setzte sich dabei an der

Luft-Percoll-Grenze des Gradienten ab und wurde verworfen. Die Leukozyten sammelten sich in den beiden Interphasen an und wurden mit einer Glaspasteurpipette in ein 15ml Röhrchen überführt, das mit PBS und 0,1% BSA aufgefüllt wurde. Es folgte ein erneuter Zentrifugationsschritt (1600rpm, 10Min, 4°C). Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 1ml BSS/BSA resuspendiert und gezählt. Danach standen die Zellen für weitere Analysen zur Verfügung.

4.2.4 Aufreinigung von T-Zellen mittels magnetischer Zellsortierung

Für die Isolierung einzelner T-Zellpopulationen (CD4⁺ bzw. CD8⁺) wurden diese aus den Gesamtymphknotenzellen bzw. Gesamtmilzzellen negativ isoliert. Für die Aufreinigung von CD4⁺ T-Zellen wurde die Einzelzellsuspension der gesamten Lymphknotenzellen in 1ml BSS/BSA aufgenommen und mit biotinylierten Antikörpern gegen CD8 (G28), IgG, NKR-P1 (10/78), $\gamma\delta$ TZR (V65) und CD11b/c (WT.5) inkubiert. Zur Aufreinigung von CD8⁺ T-Zellen wurde statt des G28 der biotinylierte Antikörper OX35 eingesetzt. Nach einer 15minütigen Inkubation auf Eis wurden die Antikörper durch dreimaliges Waschen mit BSS/BSA entfernt, die Zellen erneut in BSS/BSA resuspendiert und Streptavidin-Beads (1:10) hinzugefügt. Die Lymphknotenzellen wurden mit den Streptavidin-Beads für 15 Min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zellen erneut dreimal mit BSS/BSA gewaschen und im Anschluss auf 1×10^8 Zellen/ml BSS/BSA eingestellt. Während der letzten Waschschriffe wurden MACS® LD Separierungssäulen (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland) in Magnethalterungen eingespannt und mit 2ml BSS/BSA äquilibriert. Pro Säule wurden 1×10^8 Zellen aufgetragen und die CD4⁺ bzw. CD8⁺ T-Zellen in einem 15ml Zentrifugenröhrchen aufgefangen. War die Zellsuspension durchgelaufen wurden die Säulen mit jeweils 3ml BSS/BSA gespült. Diese 3ml wurden ebenfalls in dem 15ml Zentrifugenröhrchen aufgefangen in dem bereits die angereicherten T-Zellen vorlagen. Nach einem letzten Waschschriff wurde die Reinheit der CD4⁺ bzw. CD8⁺ T-Zellen mittels FACS-Färbung überprüft.

4.2.5 Durchflusszytometrie (FACS)

Mittels der Durchflusszytometrie können zu analysierende Zellen hinsichtlich Vitalität, Größe, Struktur, der Expression von Molekülen auf der Zelloberfläche und auch im Zellinnern differenziert werden. Zur Erfassung bestimmter Oberflächenmoleküle (extrazelluläre Färbung) bzw. von Proteinen, die im Zellinnern vorlagen (intrazelluläre Färbung) war es erforderlich, dass diese Strukturen mit Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Antikörpern markiert wurden.

Bei der extrazellulären Färbung wurden 2×10^5 Zellen für Reinheitsfärbungen bzw. 1×10^6 Zellen für sonstige Färbungen von Molekülen auf der Zelloberfläche in einer

96-Well-VB-Platte eingesetzt. Um eine unspezifische Bindung an Oberflächenmoleküle abzublocken, wurden die Zellen für 15 Min auf Eis mit normalem Maus Immunglobulin (nmlg) inkubiert, das in 25µl FACS-Puffer vorlag. Anschließend wurden nochmals 25µl FACS-Puffer zu den Ansätzen gegeben, in denen die jeweiligen Antikörper zur Markierung der Oberflächenmoleküle enthalten waren. Die Ansätze wurden erneut für 15 Min auf Eis im Dunkeln inkubiert. Danach wurden die Zellen mit 150µl FACS-Puffer gewaschen. Wenn zuvor biotinylierte Antikörper zum Einsatz kamen, wurde statt einmal, dreimal mit FACS-Puffer gewaschen.

Für eine sich anschließende Färbung von intrazellulären Molekülen wurden die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend in 100µl Fixierungs/Permeabilisierungslösung (eBioscience, Frankfurt, Deutschland) für 30min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Danach wurde die Lösung von den Zellen gewaschen. Es folgte ein weiterer Inkubationsschritt für 15min bei RT im Dunkeln mit Antikörpern gegen Ki-67 (für die Proliferation) oder Foxp3 (Transkriptionsfaktor) die zuvor in einem Endvolumen von 50µl Permeabilisierungspuffer (eBioscience, Heidelberg, Deutschland) pro Probe angesetzt wurden. Nach der Inkubationszeit wurden je 150µl FACS-Puffer pro Well hinzugefügt, die Proben zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Ansätze wurden nochmals mit FACS-Puffer gewaschen. Abschließend wurden die Zellen in 150-200µl FACS-Puffer aufgenommen und am FACS gemessen.

Für die Analysen der IFN- γ Expression von T-Zellen wurden je 1×10^6 Zellen mit 5ng/ml PMA (Calbiochem, Merck, Darmstadt, Deutschland), 500ng/ml Ionomycin (Sigma Aldrich, München, Deutschland) in Anwesenheit von Brefeldin A (10µg/ml, Sigma Aldrich, München, Deutschland) in einer 48-well-Platte mit in einem Endvolumen von 1ml RPMI für 4 Stunden bei 37°C restimuliert. Anschließend wurden die Oberflächenmoleküle gefärbt, gefolgt von der intrazellulären Färbung mit anti-IFN- γ in Permeabilisierungspuffer.

Bei der Färbung von 50µl Vollblut wurden nach der Anfärbung der Oberflächenmoleküle und dem folgenden Waschschrift ebenfalls 100µl der Fixierungs/Permeabilisierungslösung zu den Zellen gegeben um die Erythrozyten zu lysieren. Die maximal 30minütige Inkubation erfolgte ebenfalls bei Raumtemperatur im Dunkeln. Anschließend wurden die Zellen mit FACS-Puffer gewaschen und konnten am Durchflusszytometer gemessen werden.

4.2.6 Proliferationsassay/ Recall assay

In dieser Arbeit wurde die Proliferation von Zellen nach Stimulation mit Antigen durch den Einbau von [3 H]-Thymidin gemessen. Dabei ist die Menge an eingebautem [3 H]-Thymidin ein indirekter Nachweis für die Zellproliferation. Zur Erhöhung der Genauigkeit der Analysen wurden Triplikate angesetzt. Pro Well

wurden 1×10^5 CD4⁺ oder CD8⁺ T-Zellen, die aus den drainierenden Lymphknoten von mit gpMBP immunisierten Lewis-Ratten aufgereinigt wurden, mit 1×10^6 bestrahlten Thymozyten als antigenpräsentierende Zellen (APZ) in einer 96-Napfboden Platte für zwei Tage (48 Stunden) in 200µl RPMI in Kultur genommen. Zur Stimulation der Zellen wurden 10µg/ml gpMBP zu den Kulturen gegeben. Als Kontrollen dienten Ansätze ohne Antigen. Nach 48 Stunden wurden 1,25 µCi [³H]-Thymidin (Hartmann Analytik GmbH, Braunschweig, Deutschland) dazu gegeben. 16 Stunden nach Zugabe des [³H]-Thymidins wurden die Zellen auf Glasfaserfiltern geerntet. Die Radioaktivität wurde schließlich mit einem Beta Counter gemessen.

4.2.7 Detektion von Zytokinen in Zellkulturüberständen

Zur Messung von IFN-γ wurden von den zuvor beschriebenen Zellkulturen 50µl des Überstandes vor der Zugabe von [³H]-Thymidin abgenommen und mit einem Cytometric Bead Array (BD, Heidelberg, Deutschland) bzw. ELISA (Bender MedSystems, Frankfurt, Deutschland) nach Herstellerangaben analysiert.

4.2.8 ELISpot zur Detektion von gpMBP-spezifischen CD8⁺ T-Zellen

Die ELISpot Analysen wurden nach den Angaben des Herstellers MABTECH AB (Mabtech AB, Nacka Strand, Schweden) für den Ratten-IFN-γ ELISpot^{PLUS} durchgeführt. Als Stimulatorzellen dienten pro Ansatz 5×10^4 normale Rajizellen bzw. Rajizellen, die mit RT1.A^I, gpMBP oder RT1.A^I und gpMBP retroviral transduziert waren. Zu den Stimulatorzellen wurden jeweils 1×10^5 Gesamtlymphknotenzellen gegeben, die am Tag 10 nach Immunisierung mit gpMBP in CFA aus den drainierenden Lymphknoten von Lewis-Ratten gewonnen wurden. Zur Überprüfung des generellen Potentials der T-Zellen, IFN-γ zu sezernieren, wurde zusätzlich eine Spalte an Näpfen angelegt, die mit 2µg/ml ConA versetzt wurden. Nach der Entwicklung des ELISpots wurden die Spots mit dem Auge ausgezählt.

4.2.9 ELISA zur Detektion von RT1.A^I-Ig Dimer-sezernierenden Zell-Klonen

Zur Detektion von sezernierten RT1.A^I-Ig Dimeren wurden ELISA-Platten über Nacht bei 4°C mit dem unkonjugierten monoklonalen Antikörper anti-Ratte β2-Mikroglobulin (BD Bioscience Pharmingen, Heidelberg, Deutschland) beschichtet (1:500 in 50µl/well Karbonatpuffer, 5,26g/l wasserfreies Na₂CO₃, pH 10,4) um die RT1.A^I-Ig Dimere zu binden. Am nächsten Tag wurden die Wells 6mal mit 200µl/Well Waschpuffer (PBS enthält 1% FCS und 0,5% Tween 20) gewaschen. Danach wurden in jedes Well 200µl Blockpuffer (1% FCS in Karbonatpuffer) gefüllt und die Ansätze für 1 Stunde bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Im Anschluss wurden die Wells erneut 6x mit 200µl Waschpuffer gewaschen und pro Well wurden 50µl Diluentpuffer (1% FCS in PBS) vorgelegt auf die jeweils 50µl

Probenüberstand gegeben wurden. Zusätzlich wurde eine Standardverdünnungsreihe angelegt. Alle Ansätze wurden für eine Stunde bei RT inkubiert und danach wieder mit Waschpuffer gewaschen. Als Detektionsantikörper wurde biotinylierter monoklonaler anti-Maus λ 1-light chain Antikörper (1:1000, BD Bioscience Pharmingen) in Diluentpuffer (50 μ l/Well) auf die Proben gegeben. Die Ansätze wurden erneut für eine Stunde bei RT inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift (je 6x 200 μ l/Well Waschpuffer) wurden 50 μ l/Well der Avidin-Meerrettichperoxidase (1:1000, Avidin-HRP, BD Pharmingen) in Diluentpuffer in die Wells gegeben. Avidin erkennt und bindet das Biotin. Die HRP bewirkt eine Blaufärbung, wenn sie mit dem Entwicklungssubstrat (50 μ l/Well der 1:1 Mischung aus BD OptEIATM-TMB Substrat Reagenz Set, BD, Heidelberg, Deutschland) reagiert, das nach 6maligem Waschen mit dem Finalen Waschpuffer (200 μ l/well; 0,5% Tween 20 in PBS) in die Wells gegeben wird. Die Entwicklung findet im Dunkeln bei RT statt. Nach 2-10 Minuten wurde die Lösung in den Wells blau. Zum Stoppen der Reaktion werden 25 μ l/Well Stopplösung (1M H₃PO₄) hinzugefügt, wodurch ein gelber Farbumschlag erfolgte. Die Platten wurden in einem ELISA Auslesegerät bei 405nm gemessen.

4.3 Histologie und Immunhistochemie

Die Entnahme von Rückenmark und Gehirn erfolgte am Tag 14 nach der Immunisierung der Ratten mit gpMBP in CFA. Dazu wurden die Lewis-Ratten durch kurzzeitige Begasung mit CO₂ betäubt und mit PBS oder 4%igem Paraformaldehyd (PFA) in PBS perfundiert. Rückenmark und Gehirn wurden entnommen (lumbaler Bereich des Rückenmarks bzw. terminaler Bereich des Gehirns) und mit 4%igem PFA fixiert und nach einer aufsteigenden Isopropanolreihe (80-100%), sowie der Inkubation in Xylol als Intermedium in Paraffin eingebettet oder die Proben wurden direkt in Tissue-Tek (Miles, Elkart, USA) eingebettet und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Das Gewebe wurde bei -80°C aufbewahrt.

Mit Hilfe eines Kryotoms wurden acht μ m dicke Gefrierschnitte angefertigt und auf L-Lysin beschichtete Objektträger gezogen. Zur Anfertigung von 8 μ m dicken Paraffinschnitten wurden die Paraffinblöcke in ein Mikrotom eingespannt und geschnitten. Da es dabei zur Wellung der Schnitte kommt, wurden sie mit der glänzenden Seite nach unten in ein warmes Wasserbad gelegt, wodurch sie sich wieder glätten. Anschließend wurden die Schnitte auf mit L-Lysin beschichtete Objektträger aufgezogen und im Brutschrank über Nacht getrocknet.

4.3.1 Aufbereitung der Schnitte für die immunhistochemischen Analysen

Um Paraffinschnitte färben zu können wurde zunächst das Paraffin durch eine 30minütige Inkubation mit Xylol ersetzt. Danach folgte eine absteigende

Alkoholreihe bis hin zu Aqua dest wobei die Proben immer 3min in dem jeweiligen Alkohol verweilten. Am Ende wurden die Proben in TBS (Dako, Glostrup, Dänemark) gewaschen und konnten gefärbt werden. Die Gefrierschnitte wurden 1 Stunde aufgetaut. Danach wurden sie für 5-10min in 4% PFA bei RT inkubiert. Nach dem Waschen mit TBS (Dako, Glostrup, Dänemark) konnten die Schnitte ebenfalls gefärbt werden.

4.3.2 Immunhistochemie

Für die immunhistochemischen Analysen wurde die indirekte Färbemethode angewandt, da diese wesentlich sensitiver ist als die direkte Methode. Bei der indirekten Färbemethode wird zunächst ein spezifisch gegen das zu detektierende Antigen gerichteter Primärantikörper auf das Präparat aufgebracht. Es folgt ein Sekundärantikörper, der gegen den Fc-Teil des Primärantikörpers gerichtet ist und mit einem Enzym gekoppelt vorliegt. Durch die Zugabe eines Substrates erfolgt die Enzym-Substrat-Reaktion bei der ein sichtbarer Farbstoff entsteht, der als Indikator für den Antigen-Antikörper-Komplex steht.

Zur Visualisierung von T-Zell Infiltraten wurden die Schnitte mit Primärantikörpern gefärbt, die gegen den Pan-T-Zellmarker B115-1 (anti-Ratte; Holland Biotechnology, Leiden, Niederlande) gerichtet sind. Dazu wurden die Schnitte zunächst für 30 min bei RT mit Schweineserum (Biochrom, Berlin, Deutschland) geblockt, um unspezifische Bindungen des Primärantikörpers zu vermeiden. Danach wurden die Schnitte für 1 Stunde bei RT mit dem anti-Ratten B115-1 Antikörper (1:500 in 1% BSA) inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit TBS wurde der biotinylierte Sekundärantikörper anti-Maus IgG (H+L) (1:100 in 1% BSA) für 45 Minuten bei RT auf die Schnitte gegeben. Anschließend wurde erneut dreimal mit TBS gewaschen und die Schnitte für 35 Minuten bei RT mit dem Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex (ABC) inkubiert. Das Streptavidin erkennt Biotin wodurch der Komplex an gebundenen Zweitantikörpern anhaftet. Der Nachweis bei den Methoden, die mit Peroxidase (POD) oder alkalischer Phosphatase (AP) arbeiten, erfolgt durch das Zugeben des jeweiligen Substrates. Die Enzyme katalysieren das Substrat zu einem farbigen Niederschlag, wodurch die Strukturen visualisiert werden, an die der Primärantikörper gebunden hat. Nach der Inkubation mit dem AB-Komplex folgten wiederum drei Waschschrte mit TBS wonach die Proben für 5-7 Minuten mit dem Substrat New Fuchsin inkubiert wurden. Es erfolgt eine Farbmarkierung der detektierten Zellen die im Lichtmikroskop rot erscheinen. Die Schnitte wurden mit Aqua dest gewaschen und mit Aquatex (Merck, Darmstadt, Deutschland) eingedeckt.

Für die Färbung von Makrophagen wurde der Antikörper ED-1 (AbD SeroTec, Düsseldorf, Deutschland) als Primärantikörper verwendet. Dieser ist gegen CD68 (Transmembranprotein in den Lysosomen von Makrophagen, Funktion unbekannt) gerichtet. Die Schnitte wurden wie vor der T-Zell-Färbung für 30 Minuten bei RT

mit Schweineserum (Biochrom, Berlin, Deutschland) geblockt. Anschließend folgte die Färbung mit dem Primärantikörper ED-1 (Maus anti-Ratte IgG, 1:500 in 1% BSA) für eine Stunde bei RT. Nach drei Waschschritten mit TBS wurde für 15 Minuten bei RT die endogene Peroxidase geblockt (200ml Methanol + 3,5ml 30% H₂O₂), erneut dreimal mit TBS gewaschen und für 45 Minuten bei RT der biotinylierte Zweitantikörper anti-Maus IgG (H+L) (1:100 in 1% BSA) zugegeben. Es wurde erneut gewaschen und der AB-Komplex für 35 Minuten bei RT auf die Proben aufgebracht. Es wurde erneut mit TBS gewaschen und für maximal 10 Minuten Diaminobenzidin (DAB) auf die Schnitte gegeben. DAB wird durch die Peroxidase oxidiert. Es entsteht ein Präzipitat brauner Farbe, so dass die Makrophagen für das Auge sichtbar angefärbt sind. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Aqua dest gestoppt. Nach einmaligem Waschen in Aqua dest wurden die Schnitte dehydriert (aufsteigende Isopropanolreihe je 3 min, 10 min Xylol) und in Eukitt (Kindler, Freiburg, Deutschland) eingedeckt.

Zur Detektion apoptotischer Zellen wurde die TUNEL-Methode (TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling) angewandt. Bei der TUNEL-Methode werden selektiv Strangbrüche erkannt und markiert, die durch Apoptose entstanden sind. Dazu wurden die Schnitte für eine Stunde bei 37°C mit 35µl/Schnitt des „in situ cell death detection AP Kits“ (Roche, Deutschland) inkubiert. Die im Kit enthaltene terminale deoxinukleotidyl Transferase katalysiert die Polymerisation von Fluoreszin-markierten UTPs an freie 3' OH-DNS-Enden von Einzelsträngen, ohne dazu eine Matrize zu benötigen. Im Anschluss an die Inkubation wurden die Schnitte drei Mal mit TBS gewaschen und für 30 Minuten bei 37°C mit anti-FITC, konjugiert mit Alkaliner Phosphatase (50µl/Schnitt), behandelt. Danach wurde erneut dreimal mit TBS gewaschen. Am Ende wurde NBT/BCIP für 6 Minuten zu den Schnitten gegeben. NBT/BCIP wird von der Alkalinen Phosphatase prozessiert und es kommt dort zu einem dunklen Farbton, wo der anti-FITC Antikörper an markierte 3' OH-Enden gebunden hat, also in den Zellkernen apoptotischer Zellen. Ganz zum Schluss wurde nochmals mit Aqua dest. gewaschen.

Für die Albuminfärbung wurden die Schnitte für 30 Minuten bei RT mit Hydroxylamin vorbehandelt, dreimal mit 1xPBS gewaschen und die endogene Peroxidase wurde für 15 min bei RT geblockt (wie in der Makrophagenfärbung). Nach viermaligem Waschen mit 1xPBS wurde für 30 min bei RT mit 10% BSA geblockt.

Anschließend wurde der Peroxidase-konjugierte Erstantikörper (Sheep IgG, POD konjugierte anti-Ratte Albumin; 1:200 in 1% BSA) für zwei Stunden bei RT auf die Schnitte gegeben. Es folgten drei weitere Waschschrritte mit 1xPBS wonach die Schnitte so lange mit DAB inkubiert wurden, bis sich eine Braunfärbung zeigte. Gestoppt wurde die Reaktion mit Aqua dest. Mit den Schnitten wurde anschließend so verfahren, wie mit den Schnitten der Makrophagenfärbung. Am Ende wurden sie ebenfalls mit Eukitt eingedeckt.

4.4 Molekularbiologische Methoden

4.4.1 Generierung von gpMBP-cDNS mittels der Reversen Transkriptase Polymerase Ketten Reaktion (RT-PCR)

Zur Umschreibung von RNS in cDNS wurde eine RT-PCR durchgeführt. Mit dieser Methode sollte die cDNS von gpMBP gewonnen werden. Dazu wurden von einem tiefgefrorenen Meerschweinchenhirn 1mm dünne Scheibchen mit einer Rasierklinge abgeschabt, in 1ml Trizol aufgetaut und mit Hilfe eines zuvor mit 75%igem Ethanol gereinigten Homogenisators homogenisiert (der Homogenisator wurde danach erneut mit 75%igem Ethanol und dH₂O gereinigt). Zu einem 1ml Ansatz wurden 400µl Chloroform zur Fällung der RNS gegeben. Der Ansatz wurde gevortext, für 3min bei RT inkubiert und im Anschluss für 15min mit 12.000rpm bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und 500µl Isopropanol hinzugefügt. Erneut wurde der Ansatz gevortext, für 10min bei RT inkubiert und anschließend mit 12.000rpm für 10min bei 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 75%igem Ethanol gewaschen, für 5min mit 7500rpm bei 4°C zentrifugiert und nach vorsichtiger Abnahme des Überstandes unter der Sicherheitswerkbank getrocknet. Zur Resuspension des Pellets wurden 10µl steriles Wasser hinzugefügt und der Ansatz für 10min bei 55°C in einem Thermoblock inkubiert. Am Ende wurde der RNS-Gehalt mit Hilfe eines NanoDrop gemessen.

Für die Reverse Transkriptase-Polymerase Ketten Reaktion (RT-PCR) wurden 1000ng RNS eingesetzt. Der Ansatz mit einem Endvolumen von 100µl sah wie folgt aus:

2µl	RNS (entsprach 1000ng)
34µl	H ₂ O
10µl	RT-Puffer
20µl	NTPs
5µl	Random Primer
2µl	RNAse Inhibitor
6µl	Reverse Transkriptase
22µl	MgCl ₂

Von der so generierten cDNS konnte die gpMBP-cDNS durch die Verwendung spezifischer Primer (siehe Tab. 3) detektiert, amplifiziert und für subsequente Klonierungen eingesetzt werden.

4.4.2 Polymerase-Ketten-Reaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR)

Die Polymerase-Ketten-Reaktion dient der Amplifikation von gewünschten DNA-Sequenzen. Sämtliche PCR wurden mit „hotstart“ (auf 92°C vorgeheizter Block) begonnen, da dies die Sensitivität der Polymerasen sowie die Amplikonausbeute erhöht.

Die durchgeführten 3-stufigen Protokolle sahen für 25-35 Zyklen (Wiederholung der Schritte 2-4) folgendermaßen aus:

1. Initiation	98 °C	30 Sekunden
2. Denaturierung des Templates	98 °C	5-10 Sekunden
3. Anlagerung der Primer (Annealing)	63 °C	30 Sekunden
4. Elongation der Primer	72 °C	30 Sekunden
5. Extension	72 °C	5 – 10 Minuten
6. Ende	4 °C	halten

Ein Beispiel für einen 20µl PCR-Ansatz ist wie folgt:

Amplifikation von RT1.A¹ cDNA

PCR-Ansatz:	5x Phusion Puffer	4µl
	10mM dNTP	0,4µl
	Primer (Lew MHC-fwr, Lew MHC l-rev)	1µl
	DNS Vorlage	1µl
	Phusion DNS Polymerase (Finnzymes)	0,2µl
	H ₂ O	<u>13,4µl</u>
		20µl Endvolumen

Waren die vom Hersteller angegebenen Schmelztemperaturen für beide Primer gleich, wurden diese als Annealing Temperatur genommen. Bei leicht voneinander abweichenden Angaben wurde die höhere Schmelztemperatur verwendet.

Variationen des Protokolls betrafen die unterschiedlichen Annealing Temperaturen der Primer, die Elongationszeit, die sich nach der Länge des zu synthetisierenden Fragmentes und dem Leistungsvermögen der DNS-Polymerase richtete und die eingesetzte Menge an Template.

Zur Überprüfung, ob die Reaktion erfolgreich war, wurden 5µl der Probe mit 6x Ladepuffer vermengt und in die Taschen eines 1%igen Agarosegels (350g Agarose in 35ml TAE Puffer) aufgetragen. Als Größenindex wurden 5µl GeneRuler (1kb DNA-Leiter von Fermentas) in eine Tasche gegeben.

4.4.3 Restriktionsverdau von PCR-Produkten und Vektoren

Nach Aufreinigung des PCR-Produkts mit einem DNS-Extraktionskit wurde dieses, sowie der Vektor S65T, in den es eingebracht werden sollte, mit den Restriktions-Endonukleasen NcoI und BamHI für 3 Stunden bei 37°C verdaut. Der Verdau diente der Generierung kompatibler Enden, die nach Aufreinigung der Produkte ligiert wurden.

Verdau:	Vektor	RT1.A ^l
	14µl H ₂ O	48µl PCR-Produkt
	2µl 10x Tangopuffer	5,8µl 10xTangopuffer
	2µl Vektor	2µl NcoI
	1µl NcoI	2µl BamHI
	1µl BamHI	

4.4.4 Ligation

Die verdauten Produkte wurden in einem Elutionsgel aufgetragen, im Gel aufgetrennt und anschließend eluiert. Nach der Aufreinigung aus dem Gel (Kit) wurden die Produkte über Nacht bei 15°C nach folgendem Ansatz ligiert.

Ligation:	30µl Insert DNA
	10µl linearer Vektor
	4,6µl 10x Puffer T4
	1µl T4 DNA Ligase

Das ligierte Plasmid wurde im Folgenden in kompetente *E.coli* Bakterien eingebracht.

4.4.5 Transformation von *E.coli* Bakterien

Nach erfolgter Klonierung wurden die fertigen Plasmide in kompetente *E.coli* Bakterien transformiert.

Die kompetenten Zellen und der Ligationsansatz wurden zusammengeführt und für eine halbe Stunde auf Eis gestellt (zeitgleich werden Ampicillin versetzte Agarplatten zum Aufwärmen in den Brutschrank gelegt). Nach einem Hitzschock bei 42°C für 90 Sekunden wurden die Proben erneut für 5-30 Minuten auf Eis ruhen gelassen. Anschließend wurden 500µl S.O.C Medium zu den Ansätzen gegeben und alles zusammen für eine halbe Stunde bei 37°C im Schüttler inkubiert. Im Anschluss wurden jeweils 200µl bzw. 50µl der Ansätze auf eine Agarplatte ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

4.4.6 Bakterienkultur, Kolonie-PCR, Plasmid-Gewinnung, Sequenzierung

Für die Klonierungen wurden kompetente *E.coli* Bakterien verwendet. Nach der Transfektion wurden die Bakterien auf mit Ampicillin versetzten Agarplatten ausplattiert.

Von den gewachsenen Kolonien wurden einzelne gepickt und mittels PCR analysiert, ob sie das gewünschte Plasmid mit dem Gen von Interesse tragen.

Kolonie-PCR Ansatz (1x): 10µl 2xPCR Master Mix (Fermentas)
 2µl Primer (fwr+rev)
 18µl H₂O
Mit einer 10µl Pipettenspitze wurde etwas von der zu analysierenden Kolonie in den Ansatz geben.

Die Zyklus-Konditionen wurden an die Schmelztemperatur der Primer und die Länge der zu amplifizierenden Sequenz angepasst. Kolonien, die das vollständige Plasmid mit inserierter Gensequenz trugen, zeigten im Analysegel eine positive Bande.

Diese Kolonien wurden dann in 3ml LB-Medium (Volumen entspricht einem Miniansatz), versetzt mit Ampicillin auf dem Schüttler (150-200rpm) bei 37°C über Nacht hochgezogen. Aus den Bakterien der positiven Kolonie konnten die Plasmide mit Hilfe eines Minipräparations-Kit (Quiagen) isoliert und anschließend sequenziert werden.

Sequenzieransatz: 0,5µl 10x Sequenzierpuffer
 3µl Plasmid
 0,5µl Primer (immer nur einer!)
 1µl BDT

Zyklusprogramm: 30sec 96 °C
 15sec 50 °C
 4min 60 °C

War die Sequenz des Inserts korrekt und auch richtig im Plasmid inseriert, wurde von der Kolonie ein Midiansatz (50ml Endvolumen mit Ampicillin versetzt) hochgezogen und die Plasmide daraus mit Hilfe des Jet Star Präparations-Kits (Genomed GmbH, Löhne, Deutschland) isoliert. Die Plasmide standen dann weiteren Anwendungen zur Verfügung.

Für Midikulturen wurden 50ml LB-Medium (mit Ampicillin versetzt) mit 100µl der Minikultur angeimpft und ebenfalls bei 37°C über Nacht auf dem Schüttler inkubiert.

4.4.7 Retrovirale Transduktion von eukaryotischen Zellen

Tag 1: Vorbereitung der zu transfizierenden Zellen

1,5x10⁶ HEK 293T-Zellen wurden in 5ml DMEM⁺ (versetzt mit Antibiotikum und 5% FCS) in Petrischalen mit 6cm Durchmesser ausgesät und zu einer Dichte von 3x10⁵ Zellen/ml hochgezogen. War die Dichte erreicht, wurden 5ml von dieser Suspension abgenommen und in eine frische Petrischale überführt um eine gleichmäßige Verteilung der Zellen zu haben, was entscheidend für die Effektivität der Transfektion ist. Die Zellen würden über Nacht bei 37°C inkubiert.

DNS Präzipitation und Sterilisation:

Es wurden jeweils 5µg pro Plasmid (gewünschtes Plasmid mit entsprechendem Konstrukt, VSV und pHit) in ein 1,5ml Eppendorfgefäß überführt und mit 500µl Isopropanol aufgefüllt. Der Ansatz wurde mit 13.000rpm für 30min bei 4°C zentrifugiert und der Überstand vorsichtig verworfen.

Zur Sterilisation wurde das Pellet mit 500µl Ethanol 70% gewaschen. Dazu wurde das Eppendorfgefäß mehrmals invertiert, um sterile Bedingungen herzustellen. Anschließend wurde erneut mit 13.000rpm für 30min bei 4°C zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Eppendorfgefäß wurde invertiert unter der Hood aufgestellt, um das Pellet zu trocknen. Danach wurde die DNS in 100µl sterilem Wasser resuspendiert und bei 4°C aufbewahrt, wenn die DNS am nächsten Tag verwendet wurde. Zur längeren Aufbewahrung wurden die Ansätze bei -20°C eingefroren.

Tag 2: Transiente Transfektion von HEK 293T-Zellen mittels Calciumchlorid

Bei der Transfektion mittels Calciumchlorid werden DNS-Chlorid-Komplexe auf die Zellmembran präzipitiert, die viralen Überstand produzieren soll. Vermutlich werden die DNS-Chlorid-Komplexe über Endozytose von den Zellen aufgenommen. Zur Vorbereitung der Zellen wurde das Medium von den Zellen abgenommen und durch 4ml frisches DMEM (auf 37°C vorgewärmt) langsam von der Seite eintropfend ersetzt. Die Zellen wurden nochmals für 1h im Brutschrank (37°C, 5% CO₂) inkubiert.

Um DNS-Chlorid-Präzipitate herzustellen wurden 500µl 2xHBS (pH 7,1) in einem sterilen 1,5ml Eppendorfgefäß vorgelegt zu denen 100µl DNS, sowie 338µl H₂O und 62µl CaCl₂ (2M) tropfend zugeben wurden. Das Eintropfen erfolgte bei zeitgleicher konstanter Luftzufuhr über eine Glaspasteurpipette zu dem 2xHBS. Der Ansatz wurde ½ Stunde bei RT stehen gelassen um die Formation von Präzipitaten zu ermöglichen.

Die Plasmid-Präzipitate wurden im Anschluss langsam tropfend auf die HEK 293T-Zellen verteilt, die Petrischale vorsichtig geschwenkt und die Zellen für 6 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Nach den 6 Stunden wurde das Medium abgesaugt und durch 5ml vorgewärmtem DMEM⁺ ersetzt.

Tag 3: Mediumwechsel

Das Medium der HEK 293T-Zellen wurde durch 5ml DMEM⁺ das 10mM Na-Butyrat enthält, ersetzt und wiederum alles für 6h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Für die Inkubation der Zellen über Nacht wurde das Medium durch 5ml DMEM⁺ ersetzt.

Tag 4: Infektion der Zielzellen

Von jeder zu infizierenden Zelllinie wurden 200.000 Zellen abgeerntet und mit 500µl RPMI in eine 12-well Platte geben. Es wurden jeweils zwei zu infizierende Ansätze und eine Kontrolle verwendet. Mit einer sterilen Spritze wurde der virale Überstand von den HEK 293T-Zellen abgenommen und durch einen 0,45µm Filter in ein 15ml Tube geben.

Die Zielzellen wurden mit viralem Überstand, der 4µg/ml Polybren (Stock:100mg/ml) enthielt, versetzt, wobei das Endvolumen nicht mehr als 3ml betrug (die Kontrolle wurde nur mit RPMI aufgefüllt). Anschließend wurden die Ansätze nochmals für ½ h im Brutschrank inkubiert. Es folgte dann eine Zentrifugation für 3h bei 37°C und 2000rpm (Zentrifuge wurde zuvor auf 37°C aufgeheizt). Danach wurden die Zellen nochmals für eine halbe Stunde im Brutschrank inkubiert. Am Ende wurde der virale Überstand von den Zellen entfernt und durch 3ml frisches, vorgewärmtes RPMI ersetzt. Nach der Sortierung standen die retroviral transduzierten Rajizellen für den Ratten-IFN-γ ELISpot zur Verfügung.

4.4.8 Generierung von RT1.A^I-Ig Dimeren

Die RT1.A^I-IgG Dimere wurden nach den "Current Protocols in Immunology (2000) 17.2.1-17.2.17" generiert. In Kürze: die α1 bis α3 Domänen des RT1.A^I Gens der Lewis-Ratte (Pubmed, Genbank: L26224.1) wurden in den Leserahmen der multiplen Klonierstelle (durch Verwendung der MluI und XhoI Restriktionsstellen) des Expressionsvektors pXIg kloniert. Das Plasmid wurde in kompetente *E. coli* Bakterien transfiziert. Nach Isolierung der Plasmide aus einer Minikultur und ihrer Überprüfung mittels Sequenzierung wurden korrekte

Plasmide aus einer großen Bakterienkultur isoliert und durch die Restriktionsendonuklease PvuI linearisiert. 4µg des linearisierten Vektors mit der RT1.A^I-Ig DNS wurden durch Elektroporation (960µF, 0,35kV, Bio-Rad Gene Pulser) in J558L-Zellen transfiziert, die bereits ein Plasmid trugen, welches das Gen für Ratten β2-Mikroglobulin enthielt (Monzon-Casanova et al., 2012). Positive Klone wurden durch die Zugabe des Antibiotikums G418 (Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland) selektioniert. G418 hat eine Neomycin-ähnliche Struktur, weshalb nur solche Zellen überleben, die das Plasmid pXIg mit der

Neomycinresistenz aufgenommen haben. Von resistenten Klonen wurde der Überstand mittels ELISA auf das Vorhandensein von Ig-Dimeren überprüft.

4.5 Biochemische Methoden

4.5.1 Aufreinigung von RT1.A^I-Ig Dimeren

Für RT1.A^I-Ig Dimere positive Zellklone wurden in serumfreies ISF-1 Medium (Biochrom AG, Berlin, Deutschland) überführt und auf ein Volumen von 1 bis 1,5 Liter hochgezogen. Wenn die Zellen eine Dichte von $1,5-1,8 \times 10^6$ Zellen/ml erreichten und zu 70-80% vital waren, wurden sie abzentrifugiert (10 min, 300g, 4°C) und der Überstand über einen 0,45µm Filter gegeben. Die RT1.A^I-Ig Dimere wurden durch eine mit Protein G (Protein G Sepharose Fast Flow, Sigma Aldrich, Deutschland) beladene Säule aufgereinigt, die zuvor mit 10ml Diethylamin (50mM, pH11, 1ml/min Durchflussgeschwindigkeit) und anschließend 10ml PBS gewaschen wurde. Der Überstand wurde auf eine Durchflussgeschwindigkeit von 1ml/min eingestellt. Nachdem der Überstand über die Säule gelaufen war, wurde sie mit 15ml PBS und 8ml PBS, das 1M NaCl enthält, gewaschen. Die Dimere wurden mit 5ml Diethylamin (50mM, pH11) eluiert und in 1,5ml Eppendorfgefäßen aufgefangen, in denen je 62µl einer 2M Trislösung (pH 6) zur Neutralisierung des pH-Wertes vorgelegt waren. Die Säule wurde durch nochmaliges Waschen mit 20ml PBS gereinigt und für die Lagerung mit 8ml PBS, das 0,9% NaN₃ enthält, aufgefüllt. Die Konzentration der Dimere wurde mit dem Nanodrop bestimmt.

4.5.2 Beladung von RT1.A^I-Ig Dimeren mit gpMBP-Peptiden

Die Beladung der RT1.A^I-Ig Dimere wurde ebenfalls nach den "Current Protocols in Immunology (2000) 17.2.1-17.2.17" durchgeführt.

Zur passiven Beladung wurden zunächst 5-10 Volumen von Peptide-Stripping Puffer (150mM NaCl, 15mM Na₂CO₃, pH 11,5) zu den MHC-Ig Dimeren gegeben, so dass die finale Konzentration der Dimere 100 bis 400µg/ml betragen. Die Ansätze wurden für 20min bei RT inkubiert. Im Anschluss daran wurde ein 40facher molarer Überschuss an gewünschtem gpMBP-Peptid₃₇₋₄₅, ₃₇₋₄₆, ₂₆₋₄₆, ₁₂₅₋₁₃₃ oder ₁₄₆₋₁₅₄ (PANATecs GmbH, Heilbronn bzw. Charité, Berlin; Deutschland) zugegeben und der pH-Wert auf 7,2 eingestellt. Danach wurden die Dimere für 24-48 Stunden bei 4°C inkubiert um ein langsames Rückfalten der Bindungstaschen um gebundene Peptide zu ermöglichen.

Die beladenen Dimere wurden im Anschluss ankonzentriert, erneut im ELISA auf ihre richtige Konformation getestet und im NanoDrop wurde nochmals die Konzentration gemessen. Anschließend wurden die RT1.A^I-Ig Dimere zur Färbung von CD8⁺ T-Zellen eingesetzt.

4.5.3 Statistik

Bei der Zusammenfassung von Daten zu einem Einzelwert wurden stets arithmetisches Mittel und Standardabweichung bestimmt. Bei der Darstellung einzelner Werte diente der Median als Durchschnittsmaß pro Gruppe. Die statistischen Analysen der Daten wurden mit dem zweiseitigen Mann-Whitney Test (nur für die Analyse der Abb. 25B wurde ein einseitiger Mann-Whitney Test durchgeführt) bzw. Pearson's r Test (Prism 4 für Macintosh, Version 4.0c, GraphPad Software, Inc.) durchgeführt. $p < 0.05$ wurde als signifikanter *P* Wert angenommen. Vorhandene Signifikanzen sind in den Diagrammen mit einem * verzeichnet.

5 EINLEITUNG

Die Multiple Sklerose (Multiple = an verschiedenen Stellen, Sklerose = narbige Verhärtung; MS) oder auch Encephalomyelitis (= Gehirn und Rückenmark betreffende Entzündung) disseminata (= verstreut auftretend) ist die häufigste chronisch-entzündliche Autoimmunerkrankung des zentralen Nervensystems (ZNS), deren Immunpathogenese noch nicht vollständig aufgeklärt ist. Während bereits viele Erkenntnisse über die Rolle autoreaktiver CD4⁺ T-Zellen bei dieser Erkrankung vorliegen, ist der Beitrag der CD8⁺ T-Zellen weitgehend ungeklärt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde im Tiermodell der „Experimentellen Autoimmunen Enzephalomyelitis“ im Speziellen untersucht, welchen Beitrag die CD8⁺ T-Zellen vor allem während der Induktionsphase dieser Erkrankung leisten.

5.1 Verhinderung von Autoimmunität durch Immunologische Toleranz

Die Hauptaufgabe des Immunsystems ist es, den Organismus vor Krankheitserregern wie z.B. Bakterien, Viren, Parasiten oder Pilzen zu schützen, sowie maligne körpereigene Zellen zu eliminieren.

Unter bestimmten Bedingungen können jedoch fehlgeleitete Immunreaktionen induziert werden. Zu diesen gehören:

- 1) Überschießende Immunreaktionen, die gegen an sich harmlose Substanzen gerichtet sind und als Allergien bezeichnet werden.
- 2) Autoimmunreaktionen, die zum Angriff körpereigener Strukturen und schließlich zu Autoimmunerkrankungen wie beispielsweise der Multiplen Sklerose führen können.

Unter physiologischen Bedingungen werden Autoimmunreaktionen durch verschiedene Mechanismen der immunologischen Selbsttoleranz verhindert. Die Mechanismen, die in den primär lymphatischen Organen Thymus und Knochenmark ablaufen, fallen unter den Sammelbegriff zentrale Toleranz (1). Die Mechanismen der peripheren Toleranz (2) finden sich außerhalb dieser Organe in der Peripherie.

1) Zentrale Toleranz:

Die Reifung der T-Zellen findet im Thymus statt. Während dieses Prozesses werden den im doppelt positiven Stadium (CD4⁺ CD8⁺) befindlichen Thymozyten Selbst-Peptide, gebunden an körpereigene Haupthistokompatibilitätskomplexe (Major Histocompatibility Complex; MHC) auf den medullären Epithelzellen des Thymus (medullary thymic epithelial cell; mTEC) und in der Medulla lokalisierten

dendritischen Zellen (dendritic cells, DC), präsentiert (Anderson und Takahama, 2012). Dabei werden speziell von den mTEC auch solche Peptide präsentiert, die sonst nur in peripheren Geweben zu finden sind. Die ektopische Expression dieser Selbstantigene in den mTEC wird durch die Aktivität des Transkriptionsfaktors AIRE (autoimmune regulator) bewerkstelligt (Anderson et al., 2002; Hubert et al., 2011; Palmer, 2003). Können die T-Zell-Rezeptoren (TZR) der Thymozyten die Peptid-MHC-Komplexe nicht oder nur sehr schwach erkennen, gehen sie auf Grund fehlender Überlebenssignale zu Grunde („death by neglect“). Thymozyten, deren TZR die Peptid-MHC-Komplexe mit einer intermediären Affinität erkennt, erhalten hingegen Überlebenssignale und werden dadurch positiv selektioniert (Anderson und Takahama, 2012). Zusätzlich bewirkt die positive Selektion, dass sich $CD4^+ CD8^+$ T-Zellen in der Rinde (Cortex) des Thymus zu einfach positiven T-Zellen mit einer spezifischen MHC-Restriktion entwickeln. T-Zellen, deren TZR Selbstpeptide im Kontext von MHC II Molekülen erkennt, werden zu $CD4^+$ T-Zellen. Die Erkennung von MHC I Molekülen führt dagegen zur Entstehung von $CD8^+$ T-Zellen (Laky et al., 2006; Klein et al., 2009; Anderson und Takahama, 2012).

Bindet der TZR von T-Zellen mit einer zu hohen Affinität/Avidität an eigene Peptid:MHC Komplexe werden die Zellen durch Apoptose deletiert. Dieser Vorgang wird als negative Selektion bezeichnet. Dadurch werden potentiell autoreaktive T-Zellen eliminiert und ein peripheres T-Zell-Repertoire gebildet, das größtenteils selbsttolerant ist (Palmer, 2003).

Für B-Zellen, die im Knochenmark heranreifen, sind die Selektionsprozesse der zentralen Toleranz ähnlich. Erkennen unreife B-Zellen Selbstantigene mit zu hoher Affinität wird der B-Zellrezeptor internalisiert und neu arrangiert („receptor editing“) (Tiegs et al., 1993; Gay et al.; 1993; Edry and Melamed, 2004). Bindet er danach immer noch zu stark an körpereigene Strukturen, kann die B-Zelle in Apoptose getrieben werden. Eine zu schwache Erkennung führt dagegen eher zur Anergie der B-Zelle, als zum Zelltod (Nemazee, 2006).

2) Periphere Toleranz:

Allerdings werden im Rahmen der negativen Selektion nicht alle autoreaktiven T-Zellen deletiert (Bouneaud et al., 2000). Um zu verhindern, dass diese T-Zellen Schaden anrichten, gibt es Mechanismen in der Peripherie, die autoreaktive T-Zellen unter Kontrolle halten sollen. Sie werden unter dem Begriff „periphere Toleranz“ zusammengefasst.

Zu den Mechanismen der peripheren Toleranz gehören:

- Anergie:

Für die antigenspezifische Aktivierung einer naiven T-Zelle sind zweierlei Signale notwendig. Zum einen die Erkennung von Peptid-MHC-Komplexen durch den T-Zell-Rezeptor (Signal 1), zum anderen die Interaktion zwischen kostimulatorischen Proteinen (z.B. CD28) auf den T-Zellen und den entsprechenden Liganden (z.B. CD80/86) auf APZ (Signal 2). Erkennt jedoch eine naive T-Zelle ein präsentiertes Selbstantigen mit dem TZR, ohne die zusätzlichen kostimulatorischen Signale durch die APZ zu erhalten, wird die T-Zelle nicht aktiviert, sondern geht in einen Ruhezustand über, der als Anergie bezeichnet wird (Mahnke et al., 2002; Schwartz, 2003; Zheng et al., 2008). Anstatt jedoch in Apoptose getrieben zu werden, verbleiben anerge Zellen vermutlich im Körper.

- Suppression durch regulatorische T-Zellen:

Zu den am besten untersuchten regulatorischen T-Zellen gehören die sogenannten natürlichen regulatorischen T-Zellen, die im Thymus reifen und deren Aufgabe unter anderem darin besteht, in der Peripherie Autoimmunreaktionen durch unterschiedliche Mechanismen der Suppression zu unterdrücken (Jordan et al., 2001; Kawahata et al., 2002; Cools et al., 2007; André et al., 2009). Natürliche regulatorische T-Zellen zeichnen sich durch den X Chromosom kodierten Transkriptionsfaktor Foxp3 aus. Seine Funktion ist für die Entwicklung der Zellen, ihren Erhalt und ihre Funktion essentiell (Hori et al., 2003; Fontenot et al., 2005; Williams und Rudensky, 2007; Wan und Flavell, 2007). Charakteristisch für natürliche regulatorische T-Zellen ist auch die Expression der α -Kette des Interleukin-2-Rezeptors (CD25) sowie die konstitutive Expression des hochaffinen Interleukin-2-Rezeptors (bestehend aus α -, β - und γ -Kette) (Takahashi et al., 2000), weshalb sie auch als CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Treg-Zellen bezeichnet werden (Takahashi et al., 2000).

Mechanismen der Suppression:

Wie bereits erwähnt, zeichnen sich regulatorische T-Zellen durch unterschiedliche Mechanismen der Suppression aus. Zu den zellkontaktunabhängigen Mechanismen gehört die Suppression durch Zytokin-Mangel. Im vorigen Abschnitt wurde bereits beschrieben, dass regulatorische T-Zellen den hochaffinen Interleukin-2-Rezeptor exprimieren (Fontenot et al., 2005; Malek et al., 2008). Im Gegensatz dazu exprimieren konventionellen T-Zellen diesen Rezeptor erst nach antigenspezifischer Aktivierung. Entsprechend haben regulatorische T-Zellen einen Vorsprung durch bereits aktiv vorliegende IL-2 Rezeptoren und können so das IL-2 aus der Umgebung den aktivierten konventionellen T-Zellen wegfangen. Diese werden dadurch in ihrer Proliferation gehemmt (Pandiyani et al., 2007).

Regulatorische T-Zellen können zudem über zellkontaktabhängige Mechanismen supprimieren. So exprimieren regulatorische T-Zellen das zytotoxischen T-Zellen assoziierte Antigen 4 (CTLA-4) auf ihrer Oberfläche. Als inhibitorischer Interaktionspartner von B7-Molekülen auf APZ bindet CTLA-4 mit einer etwa 50-100fach höheren Affinität an die B7-Moleküle als der kostimulatorische Rezeptor CD28. Durch trans-Endozytose werden die B7-Moleküle von der Oberfläche der APZ entfernt (Qureshi et al., 2011). Das führt dazu, dass die APZ kaum noch konventionelle T-Zellen aktivieren können (Friedline et al., 2009). Neben CTLA-4 gibt es weitere Transmembranproteine, durch die regulatorische T-Zellen bei Zell-Zell-Interaktionen immunsupprimierend wirken können.

Des Weiteren können regulatorische T-Zellen durch die Sekretion anti-inflammatorischer Zytokine (z.B. von IL-10), sowie zytotoxischer Substanzen (Perforine) pathologische Immunreaktionen unterdrücken (Shevach et al., 2001; von Boehmer, 2005).

- Deletion autoreaktiver T-Zellen durch Aktivierungs-induzierte Apoptose

Im Rahmen adaptiver Immunantworten kommt es zunächst zur klonalen Expansion von antigenspezifischen T-Zellen, die nach Eliminierung des Erregers wieder eine klonale Kontraktion erfahren. Man spricht hier auch von peripherer Deletion der antigenspezifischen T-Zellen (Green et al., 2003). Die Deletion reifer T-Zellen erfolgt durch die sogenannte aktivierungsinduzierte Apoptose (activation-induced cell death) und wird z.B. durch die Interaktion zwischen den Proteinen Fas und Fas-Ligand (FasL) bewerkstelligt. Fas und sein Ligand FasL werden durch wiederholte Aktivierung von T-Zellen auf diesen coexprimiert. FasL kann nun an Fas auf der gleichen oder einer benachbarten T-Zelle binden, was den apoptotischen Zelltod bewirkt (Strasser et al., 2009). Dieser Mechanismus trägt auch zur Deletion aktivierter autoreaktiver T-Zellen in der Peripherie bei (Krammer, 2000). FasL kann aber auch im Verlauf einer Entzündungsreaktion auf peripheren Geweben exprimiert werden. Es wird angenommen, dass dies ebenfalls zum Schutz vor autoreaktiven T-Zellen oder auch zur Terminierung einer bestehenden Immunantwort beiträgt (Green et al., 2003).

Neben des Mechanismus über Fas/FasL, wurde eine Aktivierungs-induzierte Apoptose in CD8⁺ T-Zellen gezeigt, die von der Expression des Rezeptors 2 für Tumor Nekrosefaktoren (TNFR2) und dessen Interaktion mit TNF abhängt (Twu et al., 2011).

- Periphere Toleranzmechanismen gegenüber autoreaktiven B-Zellen

Auch für reife B-Zellen, die Selbstantigene erkennen können, bestehen Mechanismen der peripheren Toleranz. Die Hauptmechanismen sind hierbei das „receptor editing“, die klonale Deletion und die Anergie (Cambier et al., 2007; Cambier und Getahun, 2010).

Trotz der zahlreichen Möglichkeiten zur Eliminierung bzw. Kontrolle autoreaktiver T- und B-Zellen kommt es in einigen Individuen zum Versagen der Selbsttoleranz und eine Autoimmunerkrankung wie z.B. Multiple Sklerose (MS) kann auftreten. Bei dieser Erkrankung erkennen T-Zellen Strukturen im zentralen Nervensystem (ZNS) und lösen dort Entzündungsreaktionen aus (Stinissen et al., 1997; Weissert, 2013). Zusätzlich können von autoreaktiven B-Zellen Antikörper sezerniert werden (Kinnunen et al., 2013). Beides führt zu akkumulierenden Schädigungen der Zellen des ZNS, was dieses in seiner Funktion zunehmend beeinträchtigt. Ein Ausbruch der Krankheit hängt letztendlich auch von der genetischen Komposition und dem gesundheitlichen Gesamtzustand eines Menschen, sowie den Umwelteinflüssen, denen er ausgesetzt ist, ab.

5.2 Störungen der Selbsttoleranz führen zu Autoimmunerkrankungen

Autoimmunerkrankungen können entstehen, wenn die Mechanismen der immunologischen Toleranz versagen. Dies kann sowohl die zentrale Toleranz als auch die periphere Toleranz betreffen. Im Folgenden sind einige Beispiele hierzu kurz beschrieben.

- Beeinträchtigte negative Selektion in der zentralen Toleranz:

Beispiel: mutiertes AIRE-Gen

Eine beeinträchtigte negative Selektion liegt vor, wenn z.B. das AIRE-Gen mutiert ist. Durch die Aktivität von AIRE werden in den medullären Epithelzellen des Thymus ektopisch Peptide exprimiert, die normalerweise auf periphere Gewebe beschränkt sind. Dies dient der Toleranzinduktion in T-Zellen gegenüber körpereigenen Strukturen. Ist AIRE in seiner Funktion beeinträchtigt, kommt es im Thymus zur verminderten oder keiner Präsentation dieser Peptide. Dadurch werden T-Zellen, die für dieses Peptid autoreaktiv sind, nicht negativ selektioniert und die ausgereiften autoreaktiven T-Zellen werden nach dem Verlassen des Thymus körpereigene Strukturen in der Peripherie angreifen können. Die daraus resultierende Autoimmunerkrankung wird als Autoimmunes Polyendokrines Syndrom (APS) bezeichnet (Andersen et al., 2002; Mathis und Benoist, 2009).

- Versagen der peripheren Toleranz:

Beispiel: mutiertes Foxp3-Gen

Eine Mutation im Foxp3-Gen bewirkt, dass kein intakter Transkriptionsfaktor Foxp3 gebildet wird. Dieser ist jedoch für die Entwicklung von CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatorischen T-Zellen, die an der Regulierung und Terminierung von T-Zellantworten beteiligt sind, essenziell (Ohkura et al., 2013). Dadurch, dass die Zellen im von der Mutation betroffenen Organismus fehlen, sind die peripheren Toleranzmechanismen zur Unterdrückung autoreaktiver T-Zellen stark vermindert, wodurch autoreaktive T-Zellen zahlreiche Organe angreifen können. Es kommt zum „immunodysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X linked (IPEX) syndrome“ (Bennett et al., 2001; Wildin et al., 2002). In der Multiplen Sklerose ist das Foxp3-Gen zwar nicht mutiert, aber auch hier wird eine beeinträchtigte Funktion von Treg-Zellen in der Peripherie diskutiert (Fletcher et al., 2009).

Beispiel: mutiertes CTLA-4-Gen

CTLA-4 ist ein inhibitorischer Rezeptor auf T-Zellen, der eine höhere Affinität zu den Molekülen der B7-Familie auf APZ hat, als der kostimulatorische Rezeptor CD28. Wenn CTLA-4 Moleküle nicht mehr auf den Zelloberflächen von CD4⁺ T-Zellen exprimiert werden, kann es zu keiner Inhibierung der Zellen über diesen Weg kommen. Es kommt zu einer Lymphoproliferation, die mit verschiedenen Autoimmunerkrankungen assoziiert ist (Gough et al., 2005, Kavvoura und Ioannidis, 2005). Die Expression von CTLA-4 auf regulatorischen T-Zellen, ist für deren Homöostase wichtig und trägt zu ihren supprimierenden Funktionen bei (Takahashi et al., 2000). Für den Diabetes Typ 1 konnte gezeigt werden, dass der Polymorphismus im CTLA-4-Gen zu einer verstärkten Proliferation von regulatorischen T-Zellen führt, die jedoch nicht mehr in der Lage sind, autoreaktive T-Zellen mit Spezifität für Inselzellenantigene, zu unterdrücken (Schmidt et al., 2009; Kavvoura und Ioannidis, 2005).

Beispiel: mutierte Fas/FasL-Gene

Normalerweise bewirkt eine Fas/FasL Interaktion die Induktion der Apoptose in der Fas-tragenden T- oder B-Zelle (Strasser et al., 2009). Durch Mutationen in Fas oder FasL werden autoreaktive T- und B- Zellen jedoch nicht mehr deletiert, was das Autoimmune lymphoproliferative Syndrom (ALPS) zur Folge hat (Fischer et al., 2000).

5.3 Ätiologie von Autoimmunerkrankungen

Zu den Hauptfaktoren, welche die Entstehung von Autoimmunerkrankungen begünstigen, gehören die genetische Prädisposition sowie exogene Faktoren wie z.B. Infektionen.

- Genetische Prädisposition

Assoziation mit MHC-Allelen:

Die meisten Autoimmunerkrankungen sind polygen und die betroffenen Personen tragen oftmals genetische Polymorphismen in sich, die den Ausbruch einer Autoimmunerkrankung begünstigen. Insbesondere konnten bestimmte Allele von MHC Molekülen der Klasse I und II mit einem erhöhten Risiko zur Entwicklung einer Autoimmunerkrankung in Verbindung gebracht werden. Beispielsweise ist der Ausbruch der Rheumatischen Arthritis (RA) (entzündliche Erkrankung der Gelenke) mit verschiedenen Allelen des Gens HLA-DRB1 (Kurkó et al., 2013) assoziiert. Für den Diabetes Typ 1 (Autoimmune Reaktion gegen die beta-Zellen des Pankreas) konnten die Allele HLA-DR3/4-DQ8 oder HLA-DR4/DR4 (Steck und Rewers, 2011) als hohe Risikofaktoren identifiziert werden. Auch für die Multiple Sklerose konnte der Zusammenhang zwischen der Präsenz des Gens HLA-DRB1*15 und einem erhöhten Risiko, an MS zu erkranken, gezeigt werden (Mohme et al., 2013; Leone et al., 2013; Mero et al., 2013).

- Exogene Faktoren

Des Weiteren können exogene Faktoren, die negativ auf einen Organismus einwirken, den Ausbruch einer Autoimmunerkrankung fördern. Hier werden vor allem virale und bakterielle Infektionen diskutiert.

Im Folgenden sind kurz die Mechanismen aufgeführt, die von viralen oder bakteriellen Erregern getriggert werden können.

Mechanismen:

- 1) Bystander-Aktivierung

Im Rahmen von Infektionen wird in APZ die Expression kostimulatorischer Proteine sowie T-Zell-aktivierender Zytokine induziert, sodass auch autoreaktive T-Zellen in der Umgebung aktiviert werden können. Eine Infektion kann somit zusätzlich zur Aktivierung von T-Zellen führen, die nicht für den entsprechenden Erreger

spezifisch sind. Eine solche Reaktion wird als Bystander-Aktivierung bezeichnet (Chervonsky, 2010).

2) Molekulares Mimikry

Pathogene Erreger können Antigene exprimieren, die körpereigenen Strukturen sehr ähneln oder identisch mit diesen sind. Somit kann eine Immunreaktion gegen den Erreger gleichzeitig gegen Selbstantigene gerichtet sein (Chervonsky, 2010; Fourneau et al., 2004). Solche kreuzreaktiven Antigene spielen auch bei der Multiplen Sklerose eine Rolle. So konnten T-Zellen nachgewiesen werden, deren TZR sowohl ein Peptid des basischen Myelin Proteins, als auch ein Peptid des Epstein Barr Virus (EBV) erkennen kann (Lang et al., 2002; Wekerle und Hohlfeld, 2003).

Durch Infektionen kann es im Zuge von Gewebsschädigungen zur Freisetzung weiterer Antigene kommen. Dieses neue Auftreten von Epitopen, die von autoreaktiven T-Zellen erkannt werden können, wird als „epitope spreading“ bezeichnet (Delogu et al., 2011). Das könnte eine Erklärung für den chronischen Verlauf von Autoimmunerkrankungen sein.

5.4 Multiple Sklerose

5.4.1 Epidemiologie

Die Multiple Sklerose des Menschen tritt in den westlichen Ländern mit einer Prävalenz von 1 pro 1000 Einwohner auf (Sadovnick und Ebers, 1993). Dabei setzt die Krankheit zumeist schon im jungen Erwachsenenalter ein, wobei Frauen zwei- bis dreimal häufiger betroffen sind als Männer (Voskuhl und Gold, 2012). Im Vergleich zu gesunden Individuen ist die Lebenserwartung von MS-Patienten in Industrieländern in der Regel nur leicht verringert. Vermutlich auf Grund der dort herrschenden guten medizinischen Versorgung.

5.4.2 Klinik und Verlaufsformen der Multiplen Sklerose

Bei der MS zeigen sich die ersten Symptome bei jungen Patienten zumeist im Rahmen der ersten Schübe (relapsing-remitting MS), wobei ein Schub durch neu oder wieder auftretende neurologische Symptome charakterisiert ist, die mindestens einen Tag bestehen bleiben und einen zeitlichen Abstand von mindestens einem Monat zum letzten Schub haben müssen (Hoffmann et al., 2009). Anfangs können sich die Symptome noch vollständig zurückbilden. Mit zunehmendem Krankheitsverlauf erfolgt die Rückbildung (Remission) jedoch

immer schlechter und die Schädigungen akkumulieren, wodurch die betroffenen Personen mit immer mehr Symptomen und den damit verbundenen Leiden und Einschränkungen zurechtkommen müssen. Grob werden drei Hauptverlaufsmöglichkeiten unterschieden: 1.) schubförmiger Verlauf, 2.) sekundär progredienter Verlauf und 3.) primär progredienter Verlauf (Lublin et al., 1996) (Abb. 1). Neben dem Alter, mit dem erste MS Symptome auftreten, spielt auch das Geschlecht eine Rolle. So treten bei Frauen häufiger die ersten beiden Verlaufsformen auf, wohingegen Männer eher an der primär progredienten Ausprägung der MS leiden. Wie die Krankheit bei einer Patientin/ einem Patienten verläuft ist individuell sehr unterschiedlich.

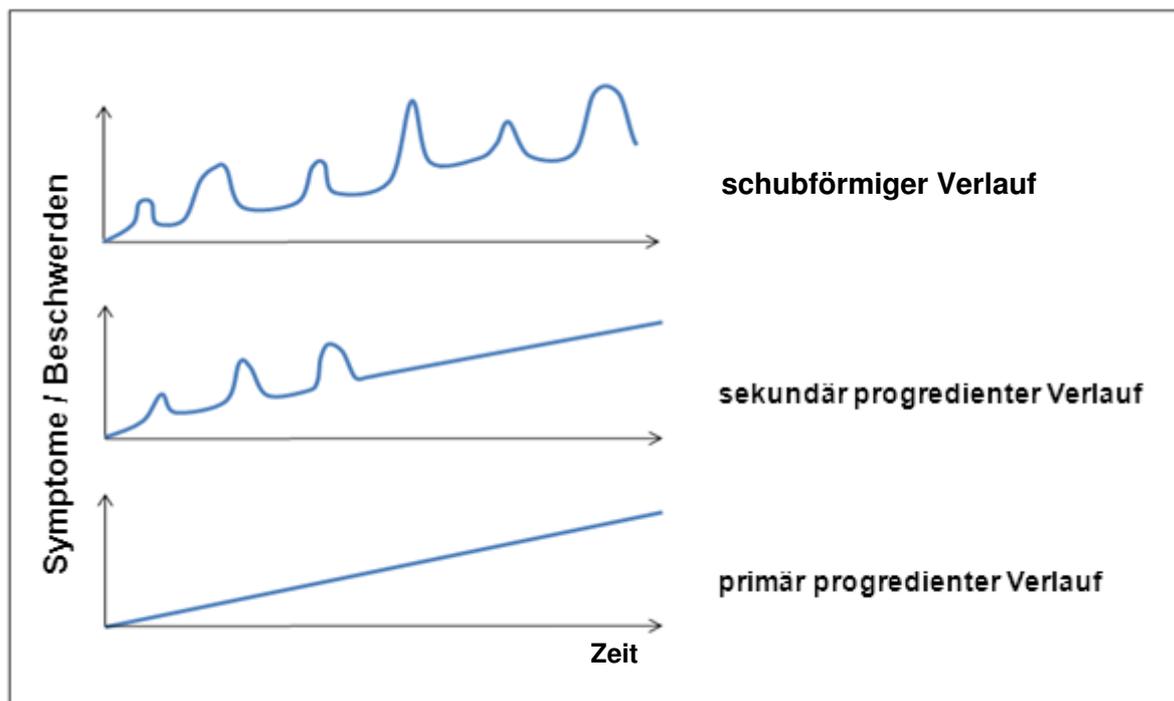


Abbildung 1: unterschiedliche Verlaufsformen der MS (nach Lublin et al., 1996; mit Genehmigung von Lippincott Williams und Wilkins/Wolters Kluwer Health: Journal of Neurology).

5.4.3 Ätiologie der Multiplen Sklerose

Trotz jahrzehntelanger intensiver Forschung ist/ sind die Ursache(n) der Multiplen Sklerose noch nicht geklärt und vermutlich spielen mehrere Faktoren eine Rolle. Als mögliche Auslöser werden die genetische Prädisposition sowie exogene Faktoren wie z.B. virale Infektionen und Umweltfaktoren diskutiert.

Genetische Prädisposition:

- Assoziation mit MHC-Allelen

In zahlreichen Studien wurden genetische Analysen durchgeführt, um Gene zu identifizieren, welche die Wahrscheinlichkeit, an MS zu erkranken, erhöhen bzw. einen Schutz davor darstellen. Die dabei identifizierten Genbereiche sind vor allem dem Haupthistokompatibilitätskomplex (Major histocompatibility complex, MHC) der Klasse II, die Antigene für CD4⁺ T-Zellen präsentieren oder der Klasse I, welche die Antigenpräsentation für CD8⁺ T-Zellen bewerkstelligen, zuzuordnen (Sawcer et al., 2011). Die Studien ergaben, dass insbesondere Träger des humanen Leukozyten Antigens (HLA) HLA-DRB_{1*15:01} und DRB_{5*01:01} ein erhöhtes Risiko haben, an MS zu erkranken, wogegen der HLA Typ HLA-A*02 eher einen Schutz seiner Träger vor der MS bewirkt (Link et al., 2012). Es gibt jedoch auch MHC Moleküle der Klasse I die zur Prädisposition von MS beitragen (Cree et al., 2010). Eine aktuelle Zusammenfassung der Genetik der MS findet sich im immunologischen Review von Gourraud 2012.

- Polymorphismen von Genen außerhalb des MHC-Komplexes

Interleukin-2 ist ein Zytokin, das nicht nur wichtig ist für die klonale Expansion antigenspezifischer konventioneller T-Zellen, sondern auch essentiell ist für die Generierung und das Überleben von regulatorischen T-Zellen. Zusätzlich ist ein funktionierender IL-2/IL-2R Signalweg wichtig für die supprimierende Funktion dieser Zellen in der Peripherie (Malek et al., 2008; Cheng et al., 2011). Einige Polymorphismen, die sich in dem Gen von IL-2R α finden, erhöhen nachweislich das Risiko, an MS zu erkranken (Hafler et al., 2007; Perera et al., 2009).

Exogene Faktoren:

- Virale Infektionen

Neben der genetischen Prädisposition werden bestimmte virale Erkrankungen, mit dem Ausbruch und dem Fortschreiten von Multipler Sklerose in Zusammenhang gebracht. Insbesondere wird dem Epstein-Barr Virus (EBV) eine bedeutende Rolle zugeschrieben. So konnte eine Assoziation zwischen einer EBV-Infektion und der Induktion der Multiplen Sklerose gezeigt werden (Lucas et al., 2011). Ferner lässt sich sowohl für CD4⁺ T-Zellen (Lünemann et al., 2008) als auch CD8⁺ T-Zellen (Jilek et al., 2008; Cheng et al., 2012) eine Kreuzreaktivität zwischen EBV-Antigenen und MBP nachweisen. Des Weiteren gibt es Studien, die belegen, dass Antikörper, die primär gegen EBV-Antigene gerichtet sind, ebenfalls mit MBP kreuz-reagieren können (Gabibov et al., 2011). Als weiteres Virus wird das Humane Herpesvirus – 6 mit der Erkrankung an Multipler Sklerose in Verbindung

gesetzt. Auch hierfür finden sich zu MBP kreuzreaktive CD4⁺ (Tejada-Simon et al., 2003) und CD8⁺ T-Zellen (Cheng et al., 2012).

- Rauchen

Das Risiko einer MS Erkrankung erhöht sich mit dem Einfluss hinzukommender, negativ auf den Organismus einwirkende Umweltfaktoren. Trägt ein Individuum z.B. die genetische Prädisposition an MS zu erkranken und besitzt einen hohen Anteil an Antikörpern, die gegen das nukleäre Antigen des Epstein-Barr Virus gerichtet sind, so wird das Risiko eines MS Ausbruchs nochmals erhöht, wenn die betreffende Person raucht (Simon et al., 2010). Es konnte auch gezeigt werden, dass das Rauchen von Zigaretten den Krankheitsverlauf negativ beeinflusst (Hernán et al., 2005; Healy et al., 2009).

- Vitamin D-Mangel

Hinsichtlich der geographischen Häufigkeit von MS-Fällen konnte gezeigt werden, dass das Risiko, an MS zu erkranken, z.B. in Nordamerika, Kanada und im nördlichen Europa erhöht ist. Diese Gebiete haben gemeinsam, dass dort eine geringere UV-Strahlung herrscht als in südlicheren Regionen (Cantorna, 2008). Unter physiologischen Bedingungen wird die Bildung von Vitamin D, welches wichtig für ein funktionierendes Immunsystem ist (Van Amerongen et al., 2004) im menschlichen Körper durch UV-Strahlung angeregt. Die Prävalenz von MS in den oben genannten Gebieten wurde daher mit einem Vitamin D-Mangel in Zusammenhang gebracht. Tatsächlich konnten im Blut von MS-Patienten geringere Vitamin D Konzentrationen gemessen werden als in gesunden Individuen (Nieves et al., 1994).

Zu therapeutischen Zwecken wird MS-Patienten Vitamin D verabreicht, da es die Bildung von immunsupprimierenden Zellen anregt, die IL-10 produzieren und im Gegenzug pathogene IL-6 und IL-17 sezernierende Zellen inhibieren (Correale et al., 2011).

Für das Ausbrechen einer MS-Erkrankung ist vermutlich eine Kombination aus mehreren Faktoren, sprich genetische Prädisposition und unterschiedliche Umweltfaktoren, verantwortlich (Cantorna, 2008).

5.4.4 Immunopathogenese der Multiplen Sklerose

Die Immunopathogenese der Multiplen Sklerose läuft in verschiedenen Schritten ab, die im Folgenden beschrieben werden.

1.) Aktivierung autoreaktiver T-Zellen in der Peripherie

Durch Studien bei MS-Patienten sowie in verschiedenen Tiermodellen der MS – der später noch zu besprechenden EAE – konnte gezeigt werden, dass die bei dieser Erkrankung auftretenden Schädigungen im ZNS durch autoreaktive T-Zellen mitverursacht werden. In der MS und der EAE nehmen vor allem autoreaktive TH1, TH17, TH9, und CD8⁺ T-Zellen eine pathogene Rolle im ZNS ein, wohingegen Treg-Zellen eine protektive Funktion zugesprochen wird (siehe Punkt 1.4.5). Die myelinspezifischen autoreaktiven T-Zellen werden dabei außerhalb des ZNS z.B. in sekundären lymphoiden Organen (z.B. den zervikalen Lymphknoten) aktiviert (de Rosbo und Ben-Nun, 1998; Bahbouhi et al., 2010; Kaushansky et al., 2010; Weller et al., 2009). Für die Aktivierung der autoraktiven T-Zellen werden zweierlei Szenarien diskutiert: 1) Die autoreaktiven T-Zellen werden in der Peripherie (van Zwam et al., 2009; Weller et al., 2010) im Rahmen einer Infektion durch molekulares Mimikry (Sospedra und Martin, 2005; Libbey et al., 2007) aktiviert. Durch die Aktivierung differenzieren die naiven autoreaktiven CD4⁺ T-Zellen in zytokinproduzierende Effektorzellen (TH1/TH17-Zellen) (McFarland und Martin, 2007) aus. Naive CD8⁺ T-Zellen differenzieren zu zytotoxischen CD8⁺ Effektor T-Zellen aus. Während der Zirkulation durch den Körper erhalten diese aktivierten T-Zellen schließlich in den das ZNS drainierenden Lymphknoten die „Instruktion“, das ZNS zu infiltrieren (Phillips et al., 1997; Lake et al., 1999). Szenario 2) Antigenpräsentierende Zellen wandern aus dem ZNS zu zervikalen Lymphknoten und präsentieren dort ZNS-Antigene den naiven autoreaktiven T-Zellen bzw. es gelangen ZNS-Antigene mit dem Liquor cerebrospinalis in zervikale Lymphknoten und werden präsentiert (Karman et al., 2004; van Zwam et al., 2011).

2.) Transmigration in das ZNS über die Blut-Hirn Schranke

Die Einwanderung von aktivierten autoreaktiven T-Zellen in das ZNS erfolgt wie in andere Gewebe auch in einem dreistufigen Prozess: 1.) Rollen, 2.) Adhärenzen und 3.) Diapedese (Engelhardt und Ransohoff, 2005). Dabei spielen Integrine und Chemokinrezeptoren (CCR) eine wichtige Rolle, denn eine gute Anhaftung an die Adhäsionsmoleküle auf den Endothelzellen ist die Voraussetzung, damit Zellen in das ZNS einwandern können. Nach ihrer Aktivierung werden auf TH1-Zellen z.B. α 4-Integrine (VLA-4) verstärkt exprimiert (Engelhardt, 2008). Im EAE Modell konnte für CD4⁺ T-Zellen zudem gezeigt werden, dass die Expression von CCR1 (Fife et al., 2001) und CCR2 (Rottman et al., 2000) die Zellen wesentlich dazu befähigt, über die Blut-Hirn Schranke (BHS) zu wandern. Auch regulatorische T-

Zellen benötigen $\alpha 4$ -Integrine, um die BHS zu passieren (Stenner et al., 2008). Für TH17-Zellen konnte hingegen gezeigt werden, dass die Transmigration der Zellen mit Hilfe von $\alpha L\beta 2$ Integrinen (Lymphozyten funktionsassoziierten Antigens 1, LFA-1) abläuft (Rothhammer et al., 2011) bzw. auch entscheidend an die Expression von CCR6 auf der TH17-Zelle gekoppelt ist (Yamazaki et al., 2008; Reboldi et al., 2009). Die Einwanderung von $CD8^+$ T-Zellen ist wiederum von der luminalen Expression von MHC I Molekülen auf dem zerebralen Endothel abhängig. Durch die Interaktion zwischen TZR und MHC I Molekülen wird zusätzlich die Avidität des LFA-1 zu dem intrazellulären Adhäsionsmolekül 1 (ICAM-1) auf der Endothelzelle erhöht. Insgesamt entsteht dadurch eine starke Bindung zwischen den zwei Zelltypen, was es der $CD8^+$ T-Zelle ermöglicht, ins ZNS zu migrieren (Galea et al., 2007).

3.) Reaktivierung autoreaktiver T-Zellen im ZNS

Im ZNS angelangt müssen die autoreaktiven T-Zellen reaktiviert werden. Durch das Ausmaß der Reaktivierung wird der weitere Krankheitsverlauf bestimmt (Flügel et al., 2001). Die Reaktivierung erfolgt über die Präsentation von ZNS-Antigenen durch dendritische Zellen (Greter et al., 2005) sowie durch Mikrogliazellen (Sosa und Forsthuber, 2011). Nach ihrer Reaktivierung im ZNS beginnen autoreaktive T-Zellen proinflammatorische Zytokine wie z.B. $IFN-\gamma$ und $TNF-\alpha$ (TH1-Zellen) (Lovett-Racke et al., 2011) oder IL-17 sowie GM-CSF (Wang et al., 2013) zu sezernieren, die das Gewebe schädigen und weitere Zellen des Immunsystems anlocken (Huppert et al., 2009; Kebir et al., 2007).

4.) Schädigung des ZNS

Die Schädigung des ZNS bei der Multiplen Sklerose erfolgt durch verschiedene Komponenten des Immunsystems.

Die T-Zellen, die in den Läsionen im ZNS zu finden sind, setzen sich sowohl aus $CD4^+$ als auch aus $CD8^+$ T-Zellen zusammen, wobei insbesondere die $CD8^+$ T-Zellen eine klonale Expansion aufweisen (Babbe et al., 2000). Die im ZNS auftretenden Läsionen sind nicht homogen, sondern unterscheiden sich bei genauer Betrachtung hinsichtlich der Zellen, welche die Oligodendrozyten und Axonen schädigen (Lucchinetti et al., 2000). Durch die Sezernierung von Chemokinen werden weitere Komponenten des Immunsystems wie Makrophagen, Granulozyten, NK-Zellen, B-Zellen, Komplement und auch weitere T-Zellen angezogen. Letztendlich werden die Oligodendrozyten und die von ihnen gebildeten Myelinscheiden durch Antikörper (Cepok et al., 2005) oder von B-Zellen und Makrophagen gebildetem Stickstoffmonoxid geschädigt. Zusätzlich werden Neurone und Oligodendrozyten direkt von den aktivierten autoreaktiven T-Zellen

angegriffen und das Myelin von Makrophagen phagozytiert (Höftberger et al., 2004; McFarland und Martin, 2007).

Aufgrund der im ZNS ablaufenden Entzündungsreaktionen zeichnet sich die MS in der Pathologie durch Entmarkungsherde mit unterschiedlich starkem Verlust an Axonen sowie reaktiver Gliose aus, die vorwiegend im Nervus opticus, in der periventrikulären weißen Substanz sowie im Kleinhirn und im Rückenmark lokalisiert sind. Je nach Art und Schweregrad der Entzündungen resultiert eine Vielzahl an Symptomen. Betroffene Personen leiden z.B. unter Lähmungserscheinungen, Parästhesien, Sehstörungen, Müdigkeit und/oder psychischen Problemen (Jones et al., 2013).

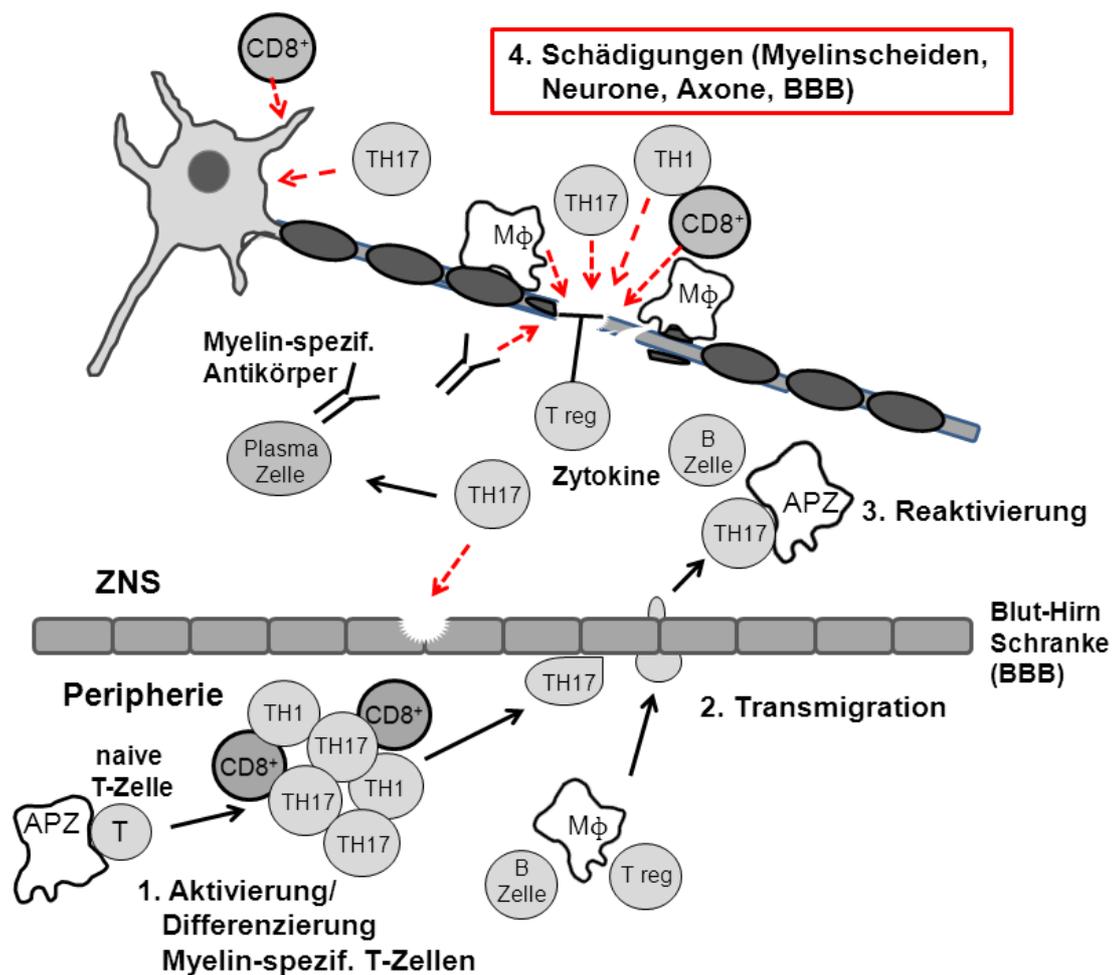


Abbildung 2: Immunopathogenese der Multiplen Sklerose (nach Aktas et al., 2006; genehmigt durch SAGE Publications). (1.) In der Peripherie werden naive myelinspezifische T-Zellen aktiviert und differenzieren zu Effektorzellen aus. (2.) Durch Hochregulierung von Adhäsionsmolekülen können die T-Zellen die Blut-Hirn-Schranke überschreiten. (3.) Reaktivierung der T-Zellen durch lokale APZ, Sekretion proinflammatorischer Zytokine (4.) Im Zuge der ablaufenden Entzündungsreaktionen werden die Oligodendrozyten, Myelinscheiden, Neurone und zugehörige Axone über direkten Zell-Zell Kontakt geschädigt. Weitere Schäden werden durch sezernierte Antikörper, Zytokine und weitere Moleküle verursacht.

5.5 Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis (EAE) der Lewis-Ratte

Die Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis (EAE) dient als etabliertes Tiermodell zur Erforschung der Immunopathogenese der MS (Wekerle, 2008). Die EAE kann aktiv oder passiv in gewissen Inzuchtstämmen induziert werden (Racke, 2001).

5.5.1 Aktive EAE

Zur Auslösung einer aktiven EAE werden susceptible Tiere (vorwiegend Maus- oder Rattenstämme) durch subkutane Injektion von Bestandteilen des Myelins emulgiert in CFA (komplettes Freund'sches-Adjuvans) immunisiert. Rattenmodelle haben hier den Vorteil, dass die Blut-Hirn-Schranke nicht wie bei Mäusen artifiziell durch die Gabe von Pertussis Toxin geöffnet werden muss. Die Art der Immunisierung induziert eine CD4⁺ T-Zell-getriebene Immunantwort (Gold et al., 2006). Bei Lewis-Ratten, die mit gpMBP in CFA immunisiert wurden, zeigt die EAE einen monophasischen Krankheitsverlauf, der einem einzelnen MS-Schub ähnelt. Die ersten Symptome der aktiven EAE zeigen sich zehn bis zwölf Tage nach der Immunisierung mit Lähmungen des Schwanzes. Die Lähmungen können mit dem Fortschreiten der Erkrankung über die Hinterpfoten hinaus Richtung Kopf aufsteigen. Der Höhepunkt der Erkrankung wird 13 bis 14 Tage nach der Immunisierung erreicht. Danach erholen sich die Tiere und sind am Tag 19/20 wieder vollständig gesund. Die Krankheitssymptome werden von einem Gewichtsverlust begleitet, wobei die Intensität der Symptome mit dem Verlust an Gewicht positiv korreliert. Die vollständige Erholung von Lewis-Ratten nach der Erkrankung ist darauf zurück zu führen, dass in der Lewis-Ratte der humorale Arm des Immunsystems während der EAE nicht beteiligt ist. Das heißt, es werden keine Antikörper gegen Bestandteile des Myelins gebildet, wodurch es nicht zu demyelinisierenden Angriffen von Antikörpern kommt. Die zu- und abnehmenden Lähmungserscheinungen sind in diesem Modell vielmehr auf an- und abschwellige Ödeme in den entzündeten Bereichen des Rückenmarks zurück zu führen, welche die Nervenbahnen vorübergehend abdrücken (Shin et al., 2012). Ein polyphasischer Krankheitsverlauf, der einer schubweisen „relapsing-remitting“ Erkrankung an MS ähnelt, lässt sich hingegen in Dark Agouti (DA)-Ratten induzieren, wenn man die Tiere z.B. mit Myelin Oligodendrocyten Glykoprotein (MOG) in CFA oder einer Emulsion aus DA-Rückenmark in CFA immunisiert (Beeton et al., 2007; de Graaf et al., 2012). In diesem Modell werden die Myelinscheiden durch Antikörper angegriffen und trotz teilweise stattfindender Remyelinisierung bleiben schon nach ein bis zwei Schüben dauerhafte Schäden zurück. Entsprechend verschlimmern sich die Lähmungserscheinungen in diesen Tieren von Schub zu Schub. Eine aktiv induzierte EAE ist insbesondere hilfreich

zur Erforschung der immunologischen Vorgänge während der Induktionsphase der EAE Erkrankung.

5.5.2 Passive EAE (adoptive Transfer EAE, AT-EAE)

Zur Induktion einer passiven EAE, auch als adoptive Transfer (AT-EAE) bezeichnet, werden enzephalitogene CD4⁺ T-Zellen aus den drainierenden Lymphknoten eines an EAE erkrankten Tieres entnommen, für mehrere Runden *ex vivo* mit gpMBP stimuliert und im Anschluss einem naiven Tier in die Schwanzvene injiziert. Die behandelten Tiere zeigen bereits zwei bis drei Tage nach adoptivem Zelltransfer erste Symptome. Stärke und Gesamtdauer der AT-EAE-Symptome sind mit denen der aktiven EAE vergleichbar. Die passive EAE ist zur Analyse der Vorgänge, die in der Effektorphase ablaufen, hilfreich.

5.6 T-Zell-Subpopulationen und ihre Rolle bei der MS und EAE

Wie soeben gezeigt sind an der Immunpathogenese der Multiplen Sklerose/EAE verschiedenen Subpopulationen von T-Zellen maßgeblich beteiligt (Weiner, 2004; Wang et al., 2013; Jäger et al., 2009; Fletcher et al., 2010; Lowther und Hafler, 2012; Denic et al., 2013). In diesem Kapitel werden nun die wesentlichen Funktionen der T-Zellen unter physiologischen Bedingungen sowie schwerpunktmäßig ihr Beitrag zur Immunpathogenese der MS/EAE näher beleuchtet.

Naive T-Zellen benötigen zu ihrer vollständigen Aktivierung zwei Signale. Signal 1 erhalten sie über die Erkennung von Peptid-MHC-Komplexen auf der Oberfläche von APZ über den T-Zell-Rezeptor (Bretcher, 1970). Signal 2 erfolgt durch die Interaktion zwischen kostimulatorischen Proteinen (z.B. CD28) auf T-Zellen und entsprechenden Liganden (z.B. CD80/86) auf APZ (Bretcher, 1999; Trikudanathan und Sayegh, 2007). Die so aktivierten T-Zellen werden nun zur Proliferation angetrieben und können entsprechend dem sie umgebenden Zytokinmilieu zu unterschiedlichen Effektor-T-Zellen differenzieren (Abb. 3).

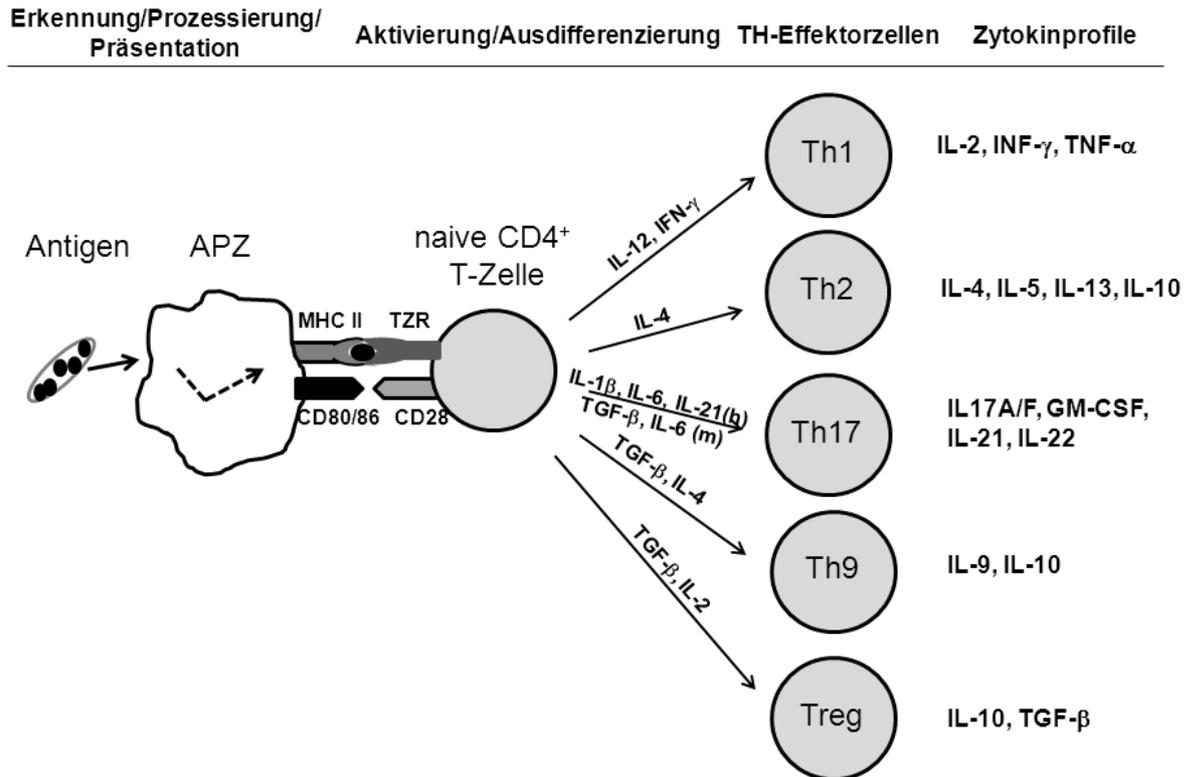


Abbildung 3: Differenzierung von naiven CD4⁺ T-Zellen nach ihrer Aktivierung durch antigenpräsentierende Zellen zu unterschiedlichen Effektorzellen. Gezeigt sind die Zytokine, welche die Differenzierung der T-Zellen beeinflussen (h=human, m=Maus), sowie die Leitzytokine der entsprechenden Effektorzellen (in Anlehnung an Deenick et al., 2011).

TH1-Zellen

Durch Antigenkontakt aktivierte CD4⁺ T-Zellen differenzieren in Anwesenheit von IL-12 und IFN- γ zu TH1-Zellen und produzieren als Leitzytokin Interferon- γ . IFN- γ aktiviert Makrophagen, wodurch diese phagozytierte Krankheitserreger besser lysieren können (Sypek et al., 1993; Hsieh et al., 1993; Gazzinelli et al., 1994; Shiloh und Nathan, 2000). TH1-Zellen sind somit unter physiologischen Bedingungen wesentlich an der Eliminierung bzw. Kontrolle von intrazellulären Erregern beteiligt.

Durch die Studien von Ben-Nun et al. konnte erstmals gezeigt werden, dass myelinspezifische T-Zellen nach adoptivem Transfer eine EAE in den Empfängertieren auslösen (Ben-Nun et al., 1981). Die T-Zellen wurden durch weitere Analysen hinsichtlich ihres Zytokinprofils und ihrer Funktionsweise in TH1- und TH2-Zellen untergliedert (Mosmann und Coffman, 1989). Weitere Studien zeigten, dass enzephalitogene TH1-Zellen nach adoptivem Transfer eine EAE induzieren (Ando et al., 1989, Kuchroo et al., 1993) nicht jedoch TH2-Zellen (Kuchroo et al., 2002).

Auch in MS-Patienten konnten aktivierte enzephalitogene MBP-spezifische TH1-Zellen sowie MBP-spezifische TH1-Gedächtnis-Zellen nachgewiesen werden, die in gesunden Personen als naive T-Zellen vorliegen (Allegretta et al., 1990; Burns et al., 1999). Zudem treten diese Zellen im Blut und Liquor cerebrospinalis von MS-Kranken in großer Anzahl auf (Brucklacher-Waldert et al., 2009). Es wurde angenommen, dass TH1-Zellen die Hauptakteure bei der Induktion der MS sind, da eine erhöhte Entzündungsaktivität in den Läsionen mit erhöhten Konzentrationen von IFN- γ und IL-12 im Liquor und ZNS von MS-Patienten korreliert. Zudem bewirkt die Applikation von IFN- γ eine Verschärfung der MS (Panitch et al., 1987). Es konnte gezeigt werden, dass IFN- γ in humanen Oligodendrozyten die Hochregulierung von Fas-Molekülen auf der Zelloberfläche bewirkt. Dadurch sind die Zellen für die Fas-vermittelte Apoptose leichter zugänglich (Pouly et al., 2000; Vartanian et al., 1995).

TH17-Zellen

TH17-Zellen spielen eine bedeutende Rolle in der Abwehr extrazellulärer Bakterien und Pilze. TH17-Zellen produzieren u.a. das Zytokin IL-17, welches nicht nur die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten sondern auch die Produktion antimikrobieller Substanzen fördert.

Die Rolle der TH1-Zellen in der EAE musste überdacht werden, nachdem gezeigt wurde, dass in IFN- γ knockout Mäusen eine sehr starke EAE induziert werden konnte. Ebenso unerwartet führte die Blockade des Interleukin-12 Signalwegs zu einer verstärkten EAE. Interleukin-12 besteht aus den Proteinuntereinheiten p35 und p40. Während IL-12p40-defiziente Mäuse vor der EAE geschützt waren, entwickelten IL-12p35-defiziente Tiere überraschenderweise eine Erkrankung an EAE. Dieses Paradoxon konnte teilweise durch die Entdeckung des Zytokins IL-23 aufgelöst werden, IL-23 ist ein heterodimeres Zytokin, teilt sich mit IL-12 die Untereinheit p40 und besitzt zudem die Untereinheit p19. In einer Studie von Cua et al., konnte gezeigt werden, dass IL-23p19 und IL-12p40, aber nicht IL-12p35, essentiell für die Induktion der EAE sind (Cua et al., 2003). Später konnte gezeigt werden, dass IL-23 wichtig ist für die Expansion und das Überleben von TH17-Zellen. Diese Ergebnisse sprechen somit dafür, dass neben den TH1-Zellen auch TH17-Zellen eine entscheidende Rolle in der Pathogenese der EAE spielen. Bestätigt wurde diese Annahme durch Studien, in denen der knockdown von ROR γ t, dem Haupttranskriptionsfaktor von TH17-Zellen, in einer sehr milden EAE resultierte (Ivanov et al., 2006). Ebenso zeigen IL-17 knockout Mäuse nach Immunisierung mit MOG₃₅₋₅₅ nur sehr unterdrückte EAE-Aktivitäten (Komiyama et al., 2006). Werden hingegen myelinspezifische TH17-Zellen adoptiv transferiert, induzieren sie in den Empfängertieren schwere EAE-Aktivitäten (Langrish et al., 2005).

Auch für die Multiple Sklerose konnte gezeigt werden, dass Patienten erhöhte Frequenzen an IL-17 und IL-23 im Serum und im Liquor tragen (Wen et al., 2012) und dass CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen in den aktiven Läsionen verstärkt IL-17 freisetzen (Tzartos et al., 2008). Dass IL-17 eine stark pathogene Rolle innehat, zeigt sich dadurch, dass die IL-17 Expression positiv mit der Anzahl an aktiven Plaques und der klinischen Stärke der MS Symptome korreliert (Matusevicius et al., 1999; Hedegaard et al., 2008). Die Kombination von IL-17, IL-22 und Granzym B trägt zusätzlich zur Verstärkung von bestehenden Entzündungsreaktionen bei und Neurone werden durch die Granzym B Sekretion abgetötet (Kebir et al., 2007).

Sowohl TH1-Zellen als auch TH17-Zellen tragen zur Pathogenese von EAE/MS bei, jedoch resultieren je nach dominierendem Zelltyp unterschiedliche Phänotypen.

TH9-Zellen

Naive T-Zellen (Kaplan, 2013) können in Anwesenheit von TGF- β und IL-4 zu TH9-Zellen differenzieren und zeichnen sich durch die Ausschüttung von IL-9 aus (Staudt et al., 2010; Dardalhon et al., 2008). Für diese Zellen konnte gezeigt werden, dass sie wesentlich an allergischen Reaktionen der Atemwege beteiligt sind (Jones et al., 2012; Yao et al., 2011). Eine weitere Funktion von TH9-Zellen wurde in Tiermodellen nachgewiesen. Hier zeigten TH9-Zellen in Myeloma Modellen bzw. Lungenkrebsmodellen nachweislich einen starken Anti-Tumor-Effekt (Purwar et al., 2012; Lu et al., 2012).

Für TH9-Zellen wurde gezeigt, dass sie nach adoptivem Transfer eine EAE in den Empfängertieren auslösen können. Diese fällt schwächer aus, als beispielsweise bei einer TH17 vermittelten EAE. Zusätzlich sind die Läsionen an anderen Stellen lokalisiert als bei der EAE, die durch adoptiven Transfer von TH17-Zellen induziert wurde (Jager et al., 2009).

Die Rolle von TH9-Zellen in der MS ist noch nicht geklärt.

CD4⁺ TH2-Zellen

Die Differenzierung von naiven T-Zellen in Richtung TH2-Zellen wird durch das Zytokin IL-4 getrieben und aktiviert den Transkriptionsfaktor GATA3 (Sasaki et al., 2013; Sokol et al., 2008; Voehringer, 2009). Eine Induktion von TH2-Zellen erfolgt bei einer Infektion mit Würmern (Voehringer, 2009; Harris und Gause; 2011), die z.B. den Darmtrakt befallen oder als Antwort auf Allergene (Sokol et al., 2008). IL-4 ist das Leitzytokin der TH2-Zellen und unterbindet die Differenzierung von naiven T-Zellen in Richtung TH1 und TH17-Zellen (Goverman, 2009). Im Gegenzug regt es B-Zellen zu einem Klassenwechsel ihrer Immunglobuline hin zu IgE (bewirkt die

Degranulierung von Mastzellen, ist an der Allergieauslösung beteiligt) und IgG (opsoniert Antigene, die dann von Makrophagen oder Neutrophilen phagozytiert werden) an. Neben IL-4 können TH2-Zellen auch IL-13 sezernieren, welches wesentlich daran beteiligt ist, Würmer wieder aus dem Körper auszustoßen (Liang et al., 2011). Ein weiteres von CD4⁺ TH2-Zellen sezerniertes Zytokin ist IL-5 durch das Eosinophile aktiviert werden (Upadhyaya et al., 2011; Stone et al., 2010). Diese erkennen und bekämpfen mit IgG opsonierte Parasiten.

Für myelinspezifische TH2-Klone wurde gezeigt, dass sie nach adoptivem Transfer in den Empfängertieren keine oder eine nur sehr milde EAE induzieren (Das et al., 1997; Jäger et al., 2009). Des Weiteren führt die Induktion einer TH2-Antwort bzw. die Applikation von TH2-Leitzytokinen zu einer Verbesserung der Symptome (Jäger et al., 2010).

In der MS wurden die von TH2-Zellen sezernierten Zytokine wie IL-4, IL-10 oder IL-5 auch mit einer Gegenregulierung der Entzündungsvorgänge assoziiert, woraus eine Verbesserung der Symptome resultiert. Das konnte z.B. durch die Applikation von Glatiramer-Azetat und IFN- β gezeigt werden, die das TH1/TH2 Verhältnis in Richtung TH2-Zellen verschieben (Vieira et al. 2003; Krakauer et al., 2008).

CD4⁺ regulatorische T-Zellen

Wie bereits in Abschnitt 1.1 beschrieben, tragen CD4⁺ regulatorische T-Zellen (Fontenot et al., 2003; Hori und Sakaguchi, 2004; Lowther und Hafler, 2012) zur Unterdrückung von Autoimmunreaktionen bei und bedienen sich dabei unterschiedlicher Mechanismen (Levings et al., 2006).

In der EAE führt der adoptive Transfer von regulatorischen T-Zellen zu einer Reduktion der Krankheitsaktivität (McGeachy et al., 2005). Im Gegensatz dazu bewirkt die Depletion der regulatorischen T-Zellen eine Verschärfung der Krankheitsaktivität der EAE (Zang et al., 2004). Wie der adoptive Transfer von regulatorischen T-Zellen führt auch ihre Aktivierung und Expansion *in vivo*, durch den superagonistischen Antikörper CD28, zu einer Reduktion der EAE-Aktivität in immunisierten Tieren (Beyersdorf et al., 2005).

Wie bei vielen anderen Autoimmunerkrankungen des Menschen wurde auch bei MS-Patienten eine eingeschränkte Funktion von regulatorischen T-Zellen gefunden. Viglietta et al. konnte zeigen, dass regulatorische T-Zellen zwar in hohen Frequenzen im ZNS auftreten, aber in ihrer Funktion defekt sind (Viglietta et al., 2004). In der Veröffentlichung von Fletscher et al. wurde dagegen beobachtet, dass IL-17 supprimierende regulatorische T-Zellen sowohl in ihrer Frequenz verringert als auch in ihrer Funktion eingeschränkt sind (Fletcher et al., 2010).

Diese verminderte Funktion von regulatorischen T-Zellen, die oft in der MS/ EAE beobachtet wurde, lässt sich teilweise auf genetische Mutationen zurück führen und wurde durch mehrere Studien bestätigt (Lowther und Hafler, 2012).

Um die Funktion von regulatorischen T-Zellen zu therapeutischen Zwecken wieder herzustellen, eignet sich ihre *ex vivo* Propagierung und die anschließende Rückführung in einen an MS erkrankten Patienten (Kohm et al., 2002) oder aber eine direkte Aktivierung und Expansion *in vivo* (Beyersdorf et al., 2005).

CD8⁺ T-Zellen

Die wesentliche Funktion von CD8⁺ T-Zellen liegt in der Eliminierung virusinfizierter und maligner Zellen. CD8⁺ T-Zellen erkennen über ihren T-Zell-Rezeptor auf den Zielzellen Peptide im Kontext von MHC Klasse I Molekülen. Die Lyse der Zielzellen kann über verschiedene Mechanismen erfolgen. Zu diesen gehören die Freisetzung von zytotoxischen Molekülen (Perforine, Granzyme), die Induktion von Apoptose durch die Expression von Fas-Ligand auf aktivierten CD8⁺ T-Zellen sowie die Sekretion von IFN- γ .

Pathogene CD8⁺ T-Zellen

Im Tiermodell konnte die Induktion einer durch CD8⁺ T-Zellen getriebenen EAE durch Immunisierung von C3H-Mäusen mit MBP₇₉₋₈₇ gezeigt werden. Ebenso war eine Übertragung der EAE auf ein naives Empfängertier durch den Transfer der MBP₇₉₋₈₇-spezifischen CD8⁺ T-Zellen möglich (Huseby et al., 2001). Die induzierte EAE-Aktivität zeichnete sich sowohl in der aktiven, als auch der passiven EAE durch Beeinträchtigung der oberen motorischen Neurone, Ataxie, Spastiken und nur gelegentlich auftretenden Lähmungserscheinungen der Hinterextremitäten aus. Entzündungsherde waren dabei ausschließlich im Gehirn lokalisiert (Panitch et al., 1987). Eine ebenfalls durch CD8⁺ T-Zellen übertragbare EAE zeigte sich in C57/BL6-Mäusen, die mit MOG₃₅₋₆₅ immunisiert wurden (Sun et al., 2001). Zusätzlich konnte in zwei weiteren Mausmodellen eine EAE beobachtet werden, die auf autoreaktive CD8⁺ T-Zellen zurück zu führen ist (Brisebois et al., 2006; Cao et al., 2006).

Von den zytotoxischen CD8⁺ T-Zellen konnte gezeigt werden, dass sie das Potential haben, Oligodendrozyten *in vivo* zu lysieren (Saxena et al., 2008). Hinzu kommt, dass das Gewebe durch „collateral bystander damage“ geschädigt wird, der durch CD8⁺ T-Zellen verursacht wird (Sobotka et al., 2009; Matthews et al., 2002). In weiteren Studien zu CD8⁺ T-Zellen wurde nachgewiesen, dass CD8⁺ T-Zellen über die Ausschüttung von Chemokinen die Blut-Hirn Schranke permeabler werden lassen. Es werden dadurch weitere Zellen des Immunsystems angezogen, welche verschärfend in die Entzündungsherde eingreifen (Kim et al., 2009).

Auch in der Multiplen Sklerose wurden pathogene CD8⁺ T-Zellen in den Läsionen von Patienten gefunden. Die Untersuchungen zeigten, dass diese CD8⁺ T-Zellen in den aktiven Läsionen in höherer Frequenz als CD4⁺ T-Zellen vorlagen. Zusätzlich wurden klonal expandierte CD8⁺ T-Zellen in den MS Läsionen, dem Liquor und im Blut gefunden (Babbe et al., 2000; Jacobsen et al., 2002; Skulina et al., 2004; Junker et al., 2007). Vor allem im Liquor cerebrospinalis und im ZNS-Gewebe lagen die CD8⁺ T-Zellen als bereits aktivierte T-Zellen mit einem Gedächtniseffektorphänotyp („effector memory phenotype“) vor, wohingegen die gleichen Zellen, isoliert aus gesunden Kontrollprobanden, einen naiven Phänotyp hatten. Der Effektormemory Phänotyp deutet auf einen Verbleib der Zellen im ZNS-Gewebe von MS-Patienten hin und lässt eine wichtige Rolle der CD8⁺ T-Zellen in der RR-MS von Beginn an vermuten (Jilek et al., 2007). Für diese Annahme spricht auch, dass die Zahl der CD8⁺ T-Zellen mit dem Ausmaß der axonalen Schädigung in den MS-Läsionen signifikant korreliert (Bitsch et al., 2000; Kuhlmann et al., 2002). Es wurde gezeigt, dass die CD8⁺ T-Zellen gegen verschiedene Proteine des ZNS wie z.B. MAG, MBP und PLP gerichtet sind (Tsuchida et al., 1994; Dressel et al., 1997), wobei die Epitope, die erkannt werden, nach wie vor nicht bekannt sind. Bezüglich des Mechanismus der Schädigung konnte in einigen Fällen der akuten MS der Nachweis erbracht werden, dass Granzym B exprimierende CD8⁺ T-Zellen in der Nähe oder direkt an Oligodendrozyten oder demyelinisierten Axonen vorliegen (Neumann et al., 2002; Serafini et al., 2006; Lassmann et al., 2007). Grundsätzlich verlaufen die zytotoxischen Schädigungen durch CD8⁺ T-Zellen unterschiedlich und hängen jeweils auch von dem attackierten Zelltyp im ZNS ab (Höftberger et al., 2004; Pittet et al., 2011; Saikali et al., 2007; Bitsch et al., 2000; Kuhlmann et al., 2002).

Regulatorische CD8⁺ T-Zellen

Neben den pathogenen CD8⁺ T-Zellen wurden in der EAE auch CD8⁺ T-Zellen gefunden, die eine regulatorische Funktion einnehmen. Beispielsweise wurden CD8⁺ T-Zellen beschrieben, die ein Peptid der V β 8.2 Kette des TZR von autoreaktiven CD4⁺ T-Zellen erkennen, welches über Qa-1 Moleküle präsentiert wird und diese Zellen dann in Apoptose treiben können (Jiang et al., 2001; Hu et al., 2004). Als Mechanismus der Apoptoseinduktion konnte eine Hochregulierung der Qa-1 Moleküle auf der Oberfläche der CD4⁺ T-Zellen gezeigt werden, wodurch sie für NKG2A sensitiv werden, welches von CD8⁺ T-Zellen exprimiert wird (Lu et al., 2008). Weitere regulatorische Funktionen in der EAE wurden für CD8⁺ CD28⁻ T-Zellen (Najafian et al., 2003), für CD8⁺ CD122⁺ T-Zellen (Lee et al., 2008) sowie für CD8⁺ LAP⁺ T-Zellen (Chen et al., 2009) nachgewiesen. CD8⁺ CD28⁻ T-Zellen sezernieren IFN- γ , welches hemmend auf APZ wirkt, wodurch diese im Gegenzug weniger pathogene CD4⁺ T-Zellen aktivieren können. Die Regulierung durch CD8⁺ CD122⁺ T-Zellen erfolgt höchstwahrscheinlich über das von den Zellen sezernierte IL-10, welches noch zusätzlich die IL-10 Ausschüttung von CD4⁺ T-Zellen

stimuliert. Die Aktivität von CD8⁺ LAP⁺ T-Zellen läuft hingegen über die Expression von IFN- γ und TGF- β .

In EAE-Studien, in denen Mäuse mit Glatiramer-Azetat behandelt wurden, konnte gezeigt werden, dass CD8⁺ T-Zellen die entscheidende supprimierende/zytotoxische Rolle in der Glatiramer-Azetat-vermittelten Immunreaktion spielen (Tyler et al., 2013).

Auch für die MS wurde der Nachweis von regulatorischen CD8⁺ T-Zellen erbracht. Hier wurden im ZNS auch CD8⁺ T-Zellen gefunden, die myelinspezifische CD4⁺ T-Zellen lysieren (Zhang et al., 1993; Correale et al., 2000; Sarantopoulos et al., 2004) und dadurch eine regulatorische Funktion einnehmen. Durch die Applikation von Glatiramer-Azetat zeigen MS-Patienten eine Besserung der Symptome. Dies basiert nicht nur auf einem TH2-Shift, sondern ist zusätzlich mit einer Aktivierung von regulatorischen CD8⁺ T-Zellen verbunden (Tennakoon et al., 2006).

CD8⁺ Tc17-Zellen

Vor einigen Jahren konnte gezeigt werden, dass CD8⁺ T-Zellen in Anwesenheit von IL-6, IL-12 und TGF- β zu sogenannten Tc17-Zellen differenzieren können. Diese Zellen zeichnen sich durch eine im Vergleich zu den konventionellen CD8⁺ T-Zellen reduzierte zytotoxische Aktivität aus und können zudem nur in geringem Ausmaß Granzym B sowie IFN- γ synthetisieren. Dafür exprimieren sie die Zytokine IL-17, IL-21 und IL-23 sowie die Transkriptionsfaktoren ROR α und ROR γ t (Huber et al., 2009; Kondo et al., 2009). Die Ausdifferenzierung von Tc17-Zellen ist dabei wie für TH17-Zellen auch von IRF4 abhängig (Brustle et al., 2007; Huber et al., 2013). Hamada und Kollegen konnte zeigen, dass Tc17-Zellen vor einer lethal verlaufenden Influenzainfektion schützen können (Hamada et al., 2009).

Tc17-Zellen können im ZNS sowie in den Lymphknoten von Mäusen im Verlauf der EAE detektiert werden. Zusätzlich wurde in vivo und in vitro nachgewiesen, dass sie eine Helferfunktion für TH17-Zellen übernehmen (Huber et al., 2013). Das von Tc17-Zellen membranständig exprimierte IL-17A sowie die Sezernierung von löslichem IL-17A führt dazu, dass CD4⁺ T-Zellen ihrerseits verstärkt IL-17 sezernieren und dadurch eine sehr pathogene Funktion im ZNS ausüben. Dabei induziert das lösliche IL-17A der Tc17-Zellen nicht direkt die Differenzierung von TH17-Zellen, sondern wirkt eher derart auf die lokale Umgebung ein, dass die Generierung von TH17-Zellen begünstigt wird (Huber et al., 2013).

Im Gehirn von MS-Patienten konnten neben CD4⁺ IL17⁺ T-Zellen auch CD8⁺ IL-17⁺ T-Zellen in ähnlich hoher Frequenz detektiert werden. Dieses Ergebnis spricht dafür, dass humane CD8⁺ Tc17-Zellen eine entscheidende pathogene Rolle in der MS spielen (Tzartos et al., 2008).

5.7 Fragestellung

Der Beitrag der CD8⁺ T-Zellen zur Induktion und Progression der Multiplen Sklerose ist noch immer strittig. Insbesondere die Rolle der CD8⁺ T-Zellen in der Frühphase der Erkrankung außerhalb des ZNS ist noch weitgehend ungeklärt. Diese offene Frage wurde in der EAE der Lewis-Ratte, einem etablierten Tiermodell der Multiplen Sklerose, untersucht.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden dabei die folgenden Themen Punkte untersucht:

- Welchen Einfluss hat die Depletion von CD8⁺ T-Zellen mittels monoklonaler Antikörper auf die Krankheitsaktivität in der EAE der Lewis-Ratte?
- Analyse des Krankheitsverlaufs der EAE in CD8 knockout Ratten, die durch die Abwesenheit funktionsfähiger CD8⁺ T-Zellen gekennzeichnet sind.
- Beeinflusst die Abwesenheit von CD8⁺ T-Zellen die Differenzierung und/oder Funktion myelinspezifischer CD4⁺ T-Zellen?
- Werden neben CD4⁺ T-Zellen auch CD8⁺ T-Zellen nach Induktion der EAE aktiviert?
- Etablierung eines Interferon- γ ELISpot assays sowie Generierung von MHC Klasse I - Ig Dimeren zur Detektion von myelinspezifischen CD8⁺ T-Zellen.

6 ERGEBNISSE

6.1 Reduzierte Krankheitsaktivität der EAE in Abwesenheit von CD8⁺ T-Zellen

Zunächst wurde untersucht, welchen Einfluss die Abwesenheit von CD8⁺ T-Zellen auf den Krankheitsverlauf in der aktiven EAE der Lewis-Ratte hat. Hierzu wurde in einem ersten Experiment der für das Protein CD8 α spezifische monoklonale Antikörper OX8 eingesetzt. OX8 wurde erstmals von Brideau et al. (Brideau et al., 1980) beschrieben und ist in der Lage, *in vivo* CD8⁺ T-Zellen zu depletieren. Der Mechanismus, welcher der Depletion der Zellen zugrunde liegt (CDC, ADCC), ist allerdings nicht geklärt.

Die aktive EAE der Lewis-Ratte zeigt typischerweise einen monophasischen Verlauf. Die Tiere durchlaufen dabei eine maximale Krankheitsaktivität zwischen Tag 13 und 15 nach Krankheitsinduktion und erholen sich bis zum Tag 20 wieder vollständig. Es wurde daher zunächst untersucht, ob die einmalige Applikation von OX8 zu einer Depletion von CD8⁺ T-Zellen über diesen Zeitraum führt. Hierzu wurde einer Gruppe von Lewis-Ratten der mAk OX8 (0,45 mg/Tier) sowie einer zweiten Gruppe der Isotyp-Kontroll-Antikörper MOPC-21 (0,45mg/Tier) intravenös in die Schwanzvene appliziert. An den Tagen 6 und 22 nach Antikörperapplikation wurde die Frequenz der CD8⁺ T-Zellen mittels FACS-Analyse von Lymphozyten des peripheren Blutes gemessen (Abb. 4).

Dabei erfolgte die Anfärbung der Zellen mittels der monoklonalen Antikörper anti- $\alpha\beta$ TZR (R73) und anti-CD4 (OX35). CD8⁺ T-Zellen konnten damit durch FACS-Analyse als $\alpha\beta$ TZR⁺ CD4⁻ T-Zellen identifiziert werden. Abb. 5 zeigt, dass sowohl am Tag 6 als auch am Tag 22 nach OX8-Applikation die CD8⁺ Zellen fast vollständig depletiert sind.

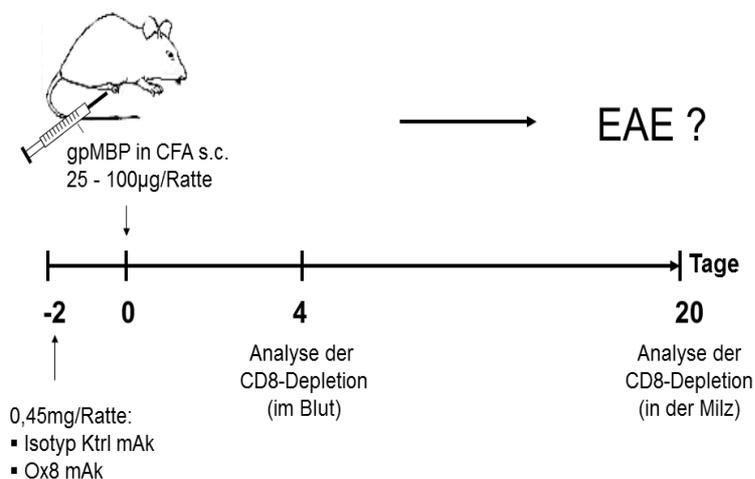


Abbildung 4: Protokoll zur CD8⁺ T-Zelldepletion und Induktion der aktiven EAE in der Lewis-Ratte. Die Depletion der CD8⁺ T-Zelle wurde am Tag 6 nach Antikörpergabe bzw. am Ende des Experiments (Tag 22) durch die Analyse der T-Zellen in der Milz überprüft.

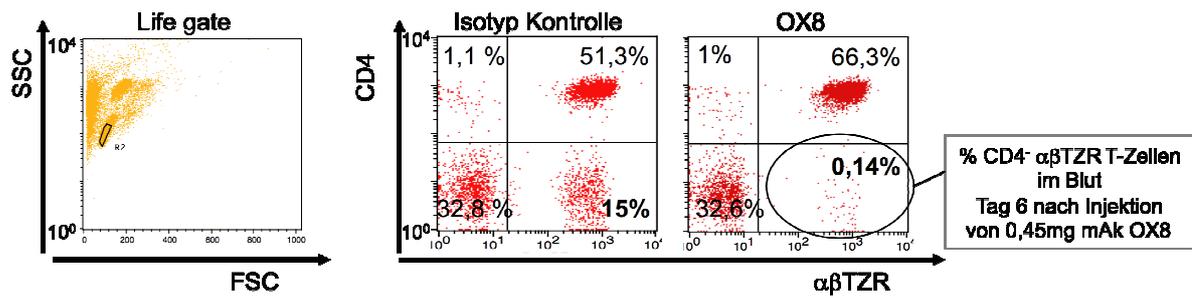
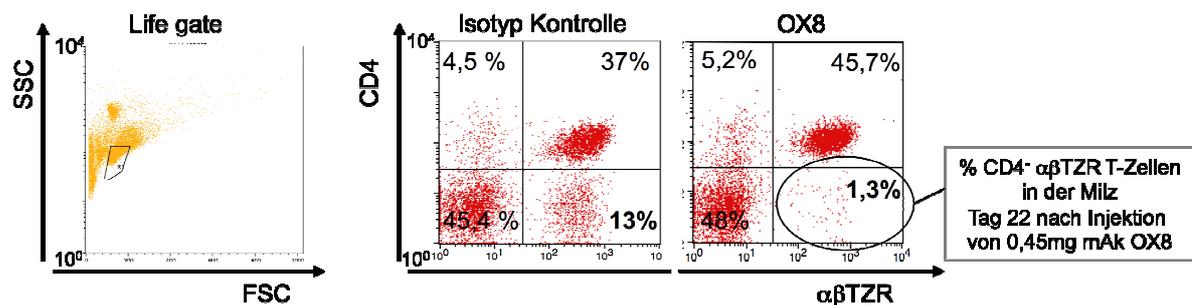
A Tag 6 (Blut)**B Tag 22 (Milz)**

Abbildung 5: Repräsentative FACS Dotplots einer am Tag 6 (A) bzw. 22 (B) nach Antikörperinjektion durchgeführten Färbung zur Analyse der CD8⁺ T-Zellen im Blut (A) bzw. in der Milz (B). Kontrolltiere erhielten 0,45mg/Ratte des monoklonalen Antikörpers MOPC-21 (Isotypkontrolle für IgG1). Zur Depletion der CD8⁺ T-Zellen wurden einer zweiten Gruppe jeweils 0,45mg/Ratte des mAks OX8 in die Schwanzvene gespritzt.

Als Nächstes wurde untersucht, welchen Effekt die OX8-Applikation auf die Krankheitsaktivität in der aktiven EAE der Lewis-Ratte ausübt.

Lewis-Ratten, die zwei Tage vor der Immunisierung mit gpMBP in CFA den Antikörper der Isotypkontrolle MOPC-21 appliziert bekamen, zeigten den typischen Verlauf einer monophasischen EAE. Dies war ebenfalls in den Ratten zu beobachten, die zwei Tage vor der Immunisierung mit dem monoklonalen Antikörper OX8 behandelt wurden. Im Vergleich zur Kontrollgruppe war die Krankheitsaktivität der aktiven EAE in den OX8-behandelten Tieren jedoch reduziert (Abb. 6). Besonders ausgeprägt war der Schutz in der OX8 behandelten Gruppe zu beobachten, wenn die Kontrollgruppe eine milde EAE-Aktivität zeigte (maximale Krankheitsaktivität 3-4). Hier zeigten die Tiere eine starke Reduktion der EAE-Symptome ab Tag 12 bis Tag 17 und es ergaben sich signifikante Unterschiede zwischen den Tieren der Kontrollgruppe und denen der OX8-behandelten Gruppe für die Tage 12 bis 16 (bestimmt mit dem Mann-Whitney Test) (Abb. 6A). Erkrankte die Kontrollgruppe hingegen stark (maximale Krankheitsaktivität 6-7) erstreckten sich die EAE-Symptome von Tag 10 bis 19. Unter diesen Bedingungen war die Krankheitsaktivität der OX8-behandelten Tiere

im Vergleich zur Kontrollgruppe an den Tagen 11 bis 14 nur leicht reduziert (Abb. 6B).

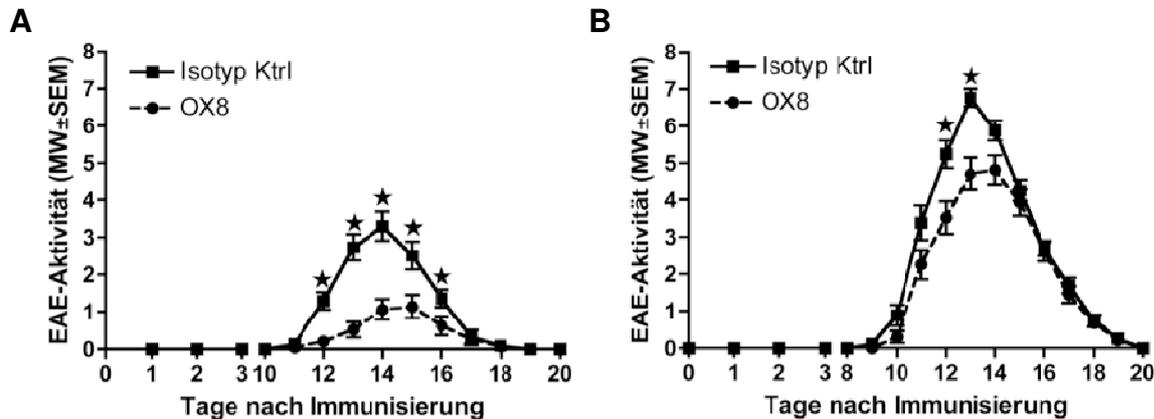


Abbildung 6: Reduzierte Krankheitsaktivität der aktiven EAE in Abwesenheit von $CD8^+$ T-Zellen. (A) Die OX8-behandelten Tiere ($n = 48$) zeigten nur minimale Krankheitssymptome, wenn die Tiere der Kontrollgruppe (Isotyp Ktrl, $n = 48$) eine milde EAE Erkrankung (maximale Krankheitsaktivität 3-4) aufwiesen. (B) Bei starken EAE Symptomen in der Kontrollgruppe ($n = 43$, maximale Krankheitsaktivität 6-7) war der Schutz in der OX8-behandelten Gruppe ($n = 43$) geringer ausgeprägt (Camara et al., 2013). Statistische Analysen wurden mit dem Mann-Whitney Test durchgeführt.

Das Protein $CD8\alpha$ wird in der Lewis-Ratte nicht nur auf $CD8^+$ T-Zellen, sondern auch auf aktivierten $CD4^+$ T-Zellen, sowie auf Monozyten, Natürlichen Killer-Zellen und einer Subpopulation der $\gamma\delta$ T-Zellen exprimiert (Bevan und Chisholm, 1986; Cantrell et al., 1982; den Haan et al., 2000; Lawetzky et al., 1990; Popovich et al., 2003). Somit könnten durch OX8-Applikation auch diese Zellpopulationen potenziell depletiert werden. Insbesondere die Depletion von aktivierten $CD4^+$ T-Zellen könnte zu einem Ausbleiben von Krankheitssymptomen führen. In einem nächsten Schritt wurde daher der monoklonale Antikörper 341 eingesetzt, der spezifisch für das Protein $CD8\beta$ ist, welches außer auf den $CD8^+$ T-Zellen nur noch von einer Subpopulation der $\gamma\delta$ T-Zellen exprimiert wird. 341 wurde erstmals von Torres-Nagel et al. beschrieben (Torres-Nagel et al., 1992).

Allerdings wurde bisher nicht untersucht, ob dieser Antikörper eine Depletion von $CD8^+$ T-Zellen *in vivo* induzieren kann. Zur Klärung dieser Frage wurde der mAk 341 den Lewis-Ratten intravenös in unterschiedlichen Dosen appliziert. Drei Tage später wurden Milz- und Lymphknotenzellen isoliert und die Zellzusammensetzung analysiert. Die Frequenzbestimmung der $CD8^+$ T-Zellen erfolgte wiederum mittels FACS-Analyse. Hierzu wurden die Zellen mit den monoklonalen Antikörpern R73, OX35 sowie 341 angefärbt. Abb. 7 zeigt, dass durch Applikation von nur 0,02mg/Ratte des mAk 341 eine effiziente Depletion von $CD8^+$ T-Zellen induziert werden kann (im Diagramm dargestellt als $CD4^+ \alpha\beta TZR^+$ Zellen). Somit konnte erstmals gezeigt werden, dass 341 *in vivo* die Zielzellen nahezu vollständig depletiert.

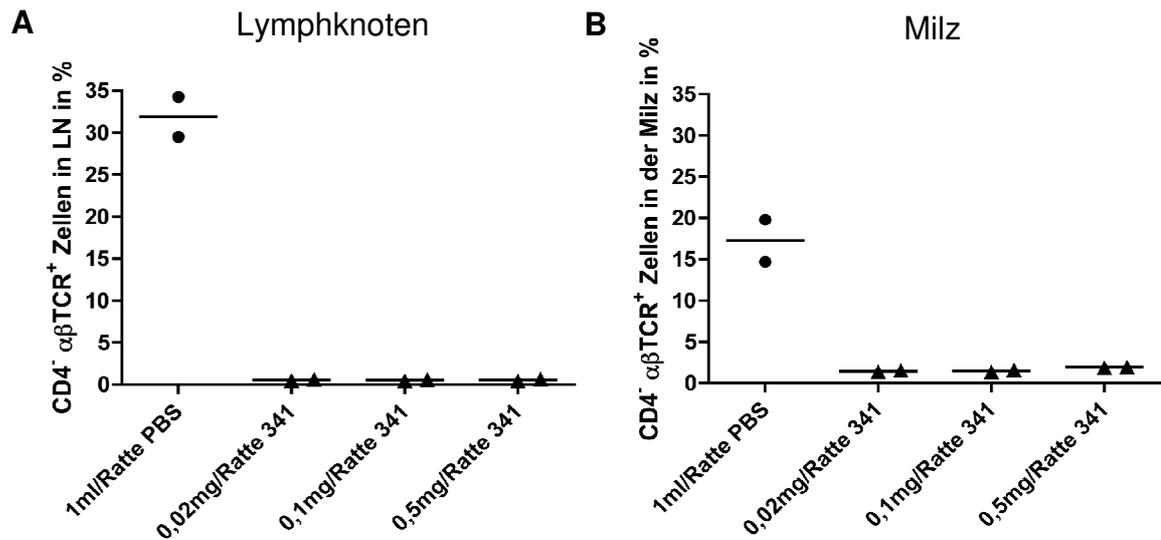


Abbildung 7: Untersuchung der *in vivo* Aktivität des mAk 341 (anti-CD8β). Der Antikörper depletiert CD4⁻αβTCR⁺ T-Zellen schon ab einer Konzentration von 0,02mg/Ratte. Analysiert wurden die oberflächlichen Lymphknoten und die Milz drei Tage nach Antikörpergabe.

In einem weiteren Experiment wurde der mAk 341 direkt mit dem mAk OX8 verglichen. Als Kontrolle wurden Tiere mit dem mAk MOPC-21 behandelt. Die Analysen erfolgten wie zuvor drei Tage nach Applikation der Antikörper. Aus Abb. 8 wird ersichtlich, dass der mAk OX8 und der mAk 341 eine gleich gute Depletion von CD8⁺ T-Zellen, wiederum dargestellt als CD4⁻αβTCR⁺ Zellen, bewirken.

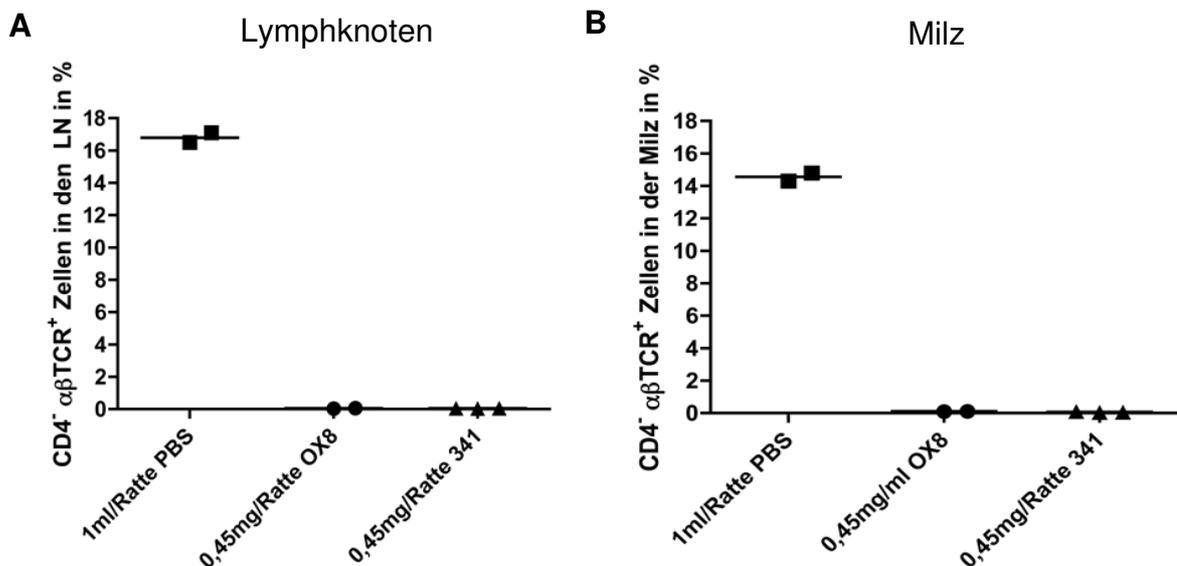
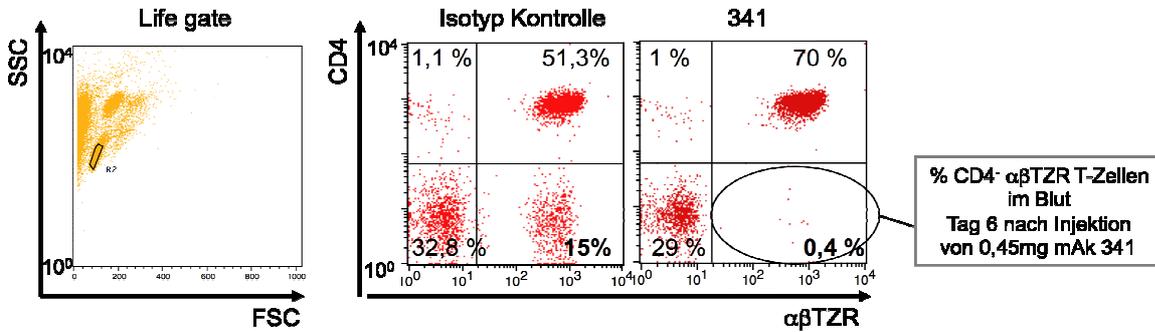


Abbildung 8: Direkter Vergleich der depletierenden Wirkung der Antikörper OX8 (n = 2) und 341 (n = 3) gegenüber PBS-Kontrollen (n = 2). Die Färbung mit Antikörpern, die gegen CD4 und αβTCR gerichtet sind zeigt, dass nach der Gabe von OX8 oder 341 nahezu keine CD4⁻αβT-Zellen mehr in Lymphknoten oder Milz detektierbar sind.

Eine Überprüfung der Langzeitwirkung ergab, dass die CD8⁺ T-Zellen (in Abb. 9 dargestellt als CD4⁻ αβTZR⁺ T-Zellen) auch noch nach 22 Tagen zum größten Teil depletiert sind (Abb. 9). Damit gleicht der 341 Antikörper dem OX8 Antikörper auch in der Langzeitdepletion.

A Tag 6 Blut



B Tag 22 Milz

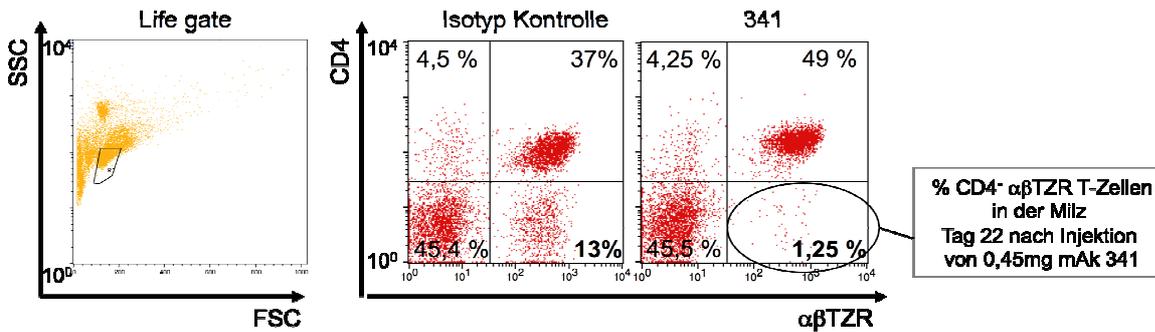


Abbildung 9: Überprüfung der Langzeitdepletion von CD8 T-Zellen, dargestellt als CD4⁻ αβTZR⁺ T-Zellen, nach Applikation von 0,45mg des mAk 341. Analysiert wurden (A) die im Blut detektierbaren Frequenzen am Tag 6 nach der Injektion des Antikörpers bzw. (B) die in der Milz vorhandenen Frequenzen am Tag 22 nach der Injektion von 0,45mg mAk 341. Als Kontrolle wurde eine Gruppe von Tieren mit jeweils 0,45mg/Ratte des mAk MOPC21 (Maus IgG1 Isotypkontrolle) behandelt.

Als Nächstes wurde untersucht, ob auch die Applikation des mAk 341 eine Modulation der aktiven EAE in der Lewis Ratte induziert. Zu diesem Zweck wurde erneut eine Gruppe von Ratten mit dem Kontrollantikörper MOPC-21 und eine weitere Gruppe mit dem 341 Antikörper, jeweils zwei Tage vor Immunisierung mit gpMBP in CFA, behandelt. Anschließend wurde der Verlauf der Krankheitsaktivität über einen Zeitraum von 20 Tagen analysiert. Abb. 10A zeigt, dass mit mAk 341 behandelte Tiere vor der Erkrankung an EAE weitestgehend geschützt waren, wenn die Erkrankung in den Kontrolltieren mild verlief (maximale Krankheitsaktivität von 4-5). Die Analyse mit dem Mann-Whitney Test ergab signifikante Unterschiede für die Tage 12 bis 16. Fiel die Krankheitsaktivität in der

Kontrollgruppe jedoch sehr stark aus (maximale EAE-Aktivität um die 7) waren keine signifikanten Unterschiede zu beobachten (Abb. 10B).

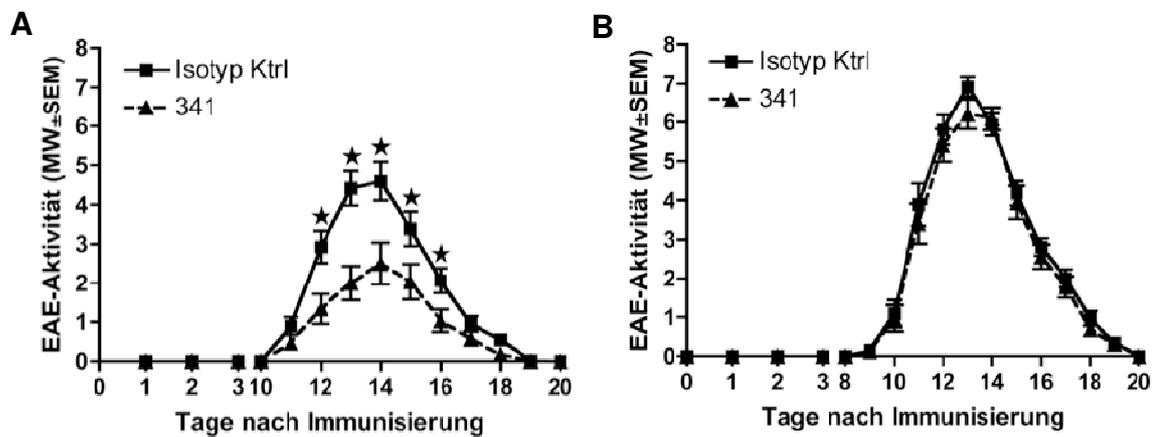


Abbildung 10: Reduzierte Krankheitsaktivität in Abwesenheit von $CD8\beta^+$ T-Zellen. (A) Die 341-behandelten Tiere ($n = 36$) zeigten eine deutlich reduzierte Krankheitsaktivität, wenn die Tiere der Kontrollgruppe (Isotyp Ktrl. $n = 39$) an einer milden EAE Erkrankung (maximale Krankheitsaktivität 4-5) litten. (B) bei schweren EAE Symptomen in der Kontrollgruppe ($n = 33$) war kein Schutz in der 341-behandelten Gruppe ($n = 33$) zu beobachten (Camara et al., 2013). Die statistischen Analysen wurden mit dem Mann-Whitney Test durchgeführt.

Die negative Korrelation zwischen der Krankheitsaktivität in der Kontrollgruppe und den klinischen Effekten, die nach Applikation der CD8-depletierenden Antikörper beobachtet wurden, konnten durch Anwendung des Pearson's r Tests untermauert werden und war von statistischer Signifikanz (Schutz der Antikörper behandelten Gruppe vs Krankheitsaktivität in der Kontrollgruppe: $r^2=0,47$ für die OX8-Behandlung und $r^2=0,38$ für die 341-Behandlung) (Abb. 11).

Die Korrelation zwischen der Krankheitsstärke in der Kontrollgruppe und dem beobachteten Schutz in der CD8-defizienten Gruppe wurde wie folgt berechnet:

$$\left\{ \sum(\text{Krankheitsgrad der Kontrollgruppe über die Erkrankungstage}) - \sum(\text{Krankheitsgrad der CD8-defizienten Gruppe über die Erkrankungstage}) \right\} / \sum(\text{Krankheitsgrad der Kontrollgruppe über die Erkrankungstage}) \times 100 = \% \text{ des Schutzes der CD8-defizienten Gruppe.}$$

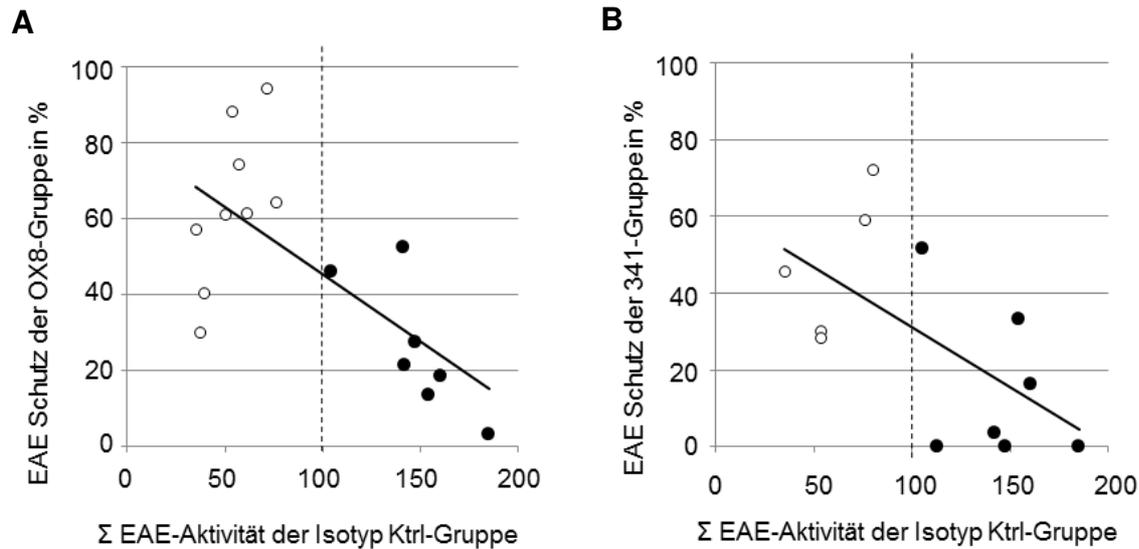


Abbildung 11: Negative Korrelation zwischen der Krankheitsaktivität der aktiven EAE in den Kontrollgruppen und dem Schutz vor der Erkrankung in den (A) OX8- bzw. (B) 341-behandelten Gruppen.

Die gestrichelte Linie ist eine willkürlich gesetzte Trennung zur Unterscheidung zwischen schwacher und starker Krankheitsaktivität in den Kontrolltieren. Offene Kreise repräsentieren Experimente, die eine schwache EAE-Aktivität zeigten, geschlossene Kreise repräsentieren Experimente, bei denen die Krankheitsaktivität der EAE stark ausfiel.

Die durchgeführten EAE-Experimente weisen darauf hin, dass die Depletion von CD8⁺ T Zellen mittels der mAk OX8 oder 341 die Tiere vor dem Ausbruch einer starken EAE-Erkrankung schützt, wenn die Kontrolltiere einen milden Krankheitsverlauf der EAE zeigten.

Durch die Applikation CD8-depletierender Antikörper kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass neben der Depletion der CD8⁺ T-Zellen weitere Mechanismen (Off-Target Effekte) zu der beobachteten reduzierten Krankheitsaktivität der EAE beitragen. So wurde beispielsweise eine Modulation von Phagozyten nach dem Einsatz T-Zell-depletierender Antikörper beobachtet (Perruche et al., 2008). Es wurde gezeigt, dass unreife dendritische Zellen und Makrophagen nach der Phagozytose von apoptotischen T-Zellen in hohem Maß antiinflammatorische Zytokine wie z.B. TGF-β exprimierten, was eine erhöhte Frequenz an regulatorischen T-Zellen bedingte. Die in der Studie von Perruche et al. durchgeführte Immunisierung von Mäusen mit PLP₁₃₉₋₁₅₁ in CFA und die zusätzliche Behandlung mit T-Zell-depletierenden Antikörpern resultierte im Vergleich zur Kontrollgruppe, die keine Antikörper appliziert bekam, in sehr geringen EAE-Aktivitäten. Analysen ergaben, dass die mit T-Zell-depletierenden Antikörpern behandelten Tiere, im Vergleich zu den Kontrolltieren, das höchste

Verhältnis an regulatorischen T-Zellen gegenüber TH17-Zellen im Rückenmark aufwiesen. Das erklärt die nur sehr geringe EAE-Aktivität in diesen Tieren.

In einer weiteren Reihe von Experimenten wurden daher CD8KO-Ratten eingesetzt, die mittels N-Ethyl-N-Nitrosourea (ENU)-Mutagenese generiert wurden. Diese Tiere zeichnen sich durch eine komplette Abwesenheit von CD8⁺ T-Zellen sowohl im Thymus als auch in der Peripherie aus (Taurog et al., 2009). Hervorzuheben ist, dass in den Tieren NK-Zellen und $\gamma\delta$ T-Zellen nachweisbar sind. Dies lässt somit den Schluss zu, dass die Expression von CD8 für die Differenzierung bzw., das Überleben dieser Zellpopulationen nicht absolut notwendig ist. Vor jedem der im Folgenden beschriebenen Experimente wurden die Tiere hinsichtlich des korrekten Phänotyps – nämlich der Abwesenheit von CD8⁺ T-Zellen – untersucht (Abb. 12).

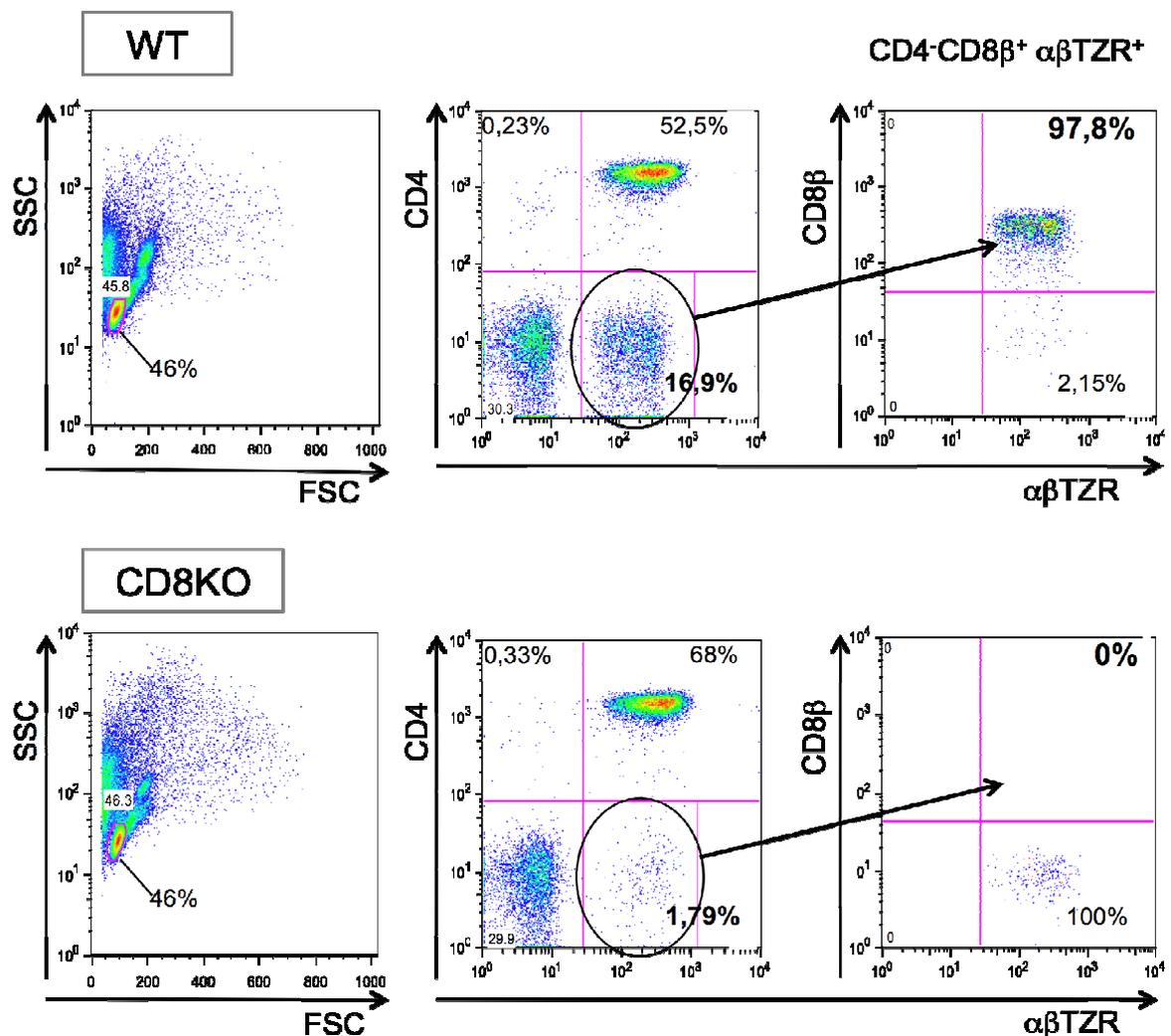


Abbildung 12: Exemplarische FACS-Analyse bezüglich des Screenings von 4 Wochen alten Ratten die aus einer heterozygoten Verpaarung (+/- x +/-) hinsichtlich des CD8-Gens stammen.

Zur Analyse der aktiven EAE in den CD8KO Tieren wurden sowohl CD8KO Tiere als auch Tiere der Kontrollgruppe, bestehend aus wildtypischen Geschwistertieren, mit gpMBP in CFA immunisiert.

Abb. 13 veranschaulicht, dass die CD8KO Tiere im Vergleich zu den wildtypischen Geschwistertieren eine signifikant reduzierte Krankheitsaktivität der EAE an den Tagen 12 bis 17 nach Immunisierung zeigten. Für die klinischen Effekte nach Einsatz der CD8-spezifischen monoklonalen Antikörper sind „Off-Target-Effekte“ somit offensichtlich nicht verantwortlich.

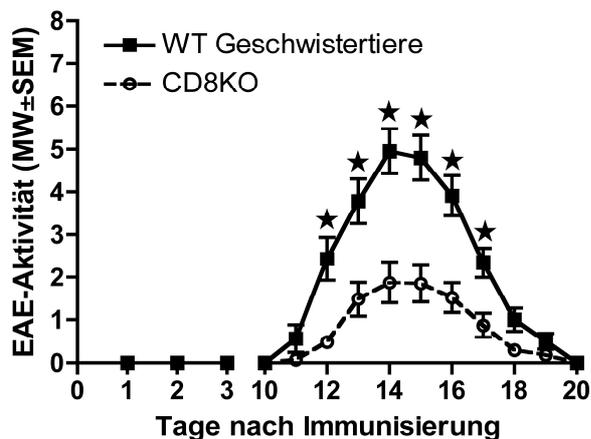


Abbildung 13: Reduzierte EAE-Aktivität in den CD8KO Lewis-Ratten im Vergleich zur Kontrollgruppe, bestehend aus wildtypischen Geschwistertieren (Camara et al., 2013). Die statistische Auswertung wurde mit dem Mann-Whitney Test durchgeführt.

Zusammenfassend zeigen die bisherigen Experimente, dass die Abwesenheit von CD8⁺ T-Zellen die Krankheitsaktivität der aktiven EAE entscheidend beeinflusst.

6.2 Reduzierte Infiltration von T-Zellen und Makrophagen in das ZNS in Abwesenheit von CD8⁺ T-Zellen

Charakteristisch für entzündliche neurologische Erkrankungen ist die Infiltration von Leukozyten in das ZNS (Stinissen et al., 1998; Barnett et al., 2006). Es stellte sich daher die Frage, ob die reduzierte Krankheitsaktivität in den CD8-depletierten Tieren mit einer verminderten Transmigration von T-Zellen und Makrophagen in das ZNS einhergeht. Zur Analyse der Infiltrate im ZNS wurden normale Lewis-Ratten mit gpMBP immunisiert. Am Tag 14, dem Höhepunkt der EAE-Erkrankung, wurden die Tiere mit CO₂ betäubt und mit Paraformaldehyd (PFA) perfundiert, um die Tiere zum einen zu entbluten und zum anderen die Gewebestrukturen und Zellen zu fixieren. Im Anschluss wurde das Rückenmark für immunhistochemische Analysen entnommen.

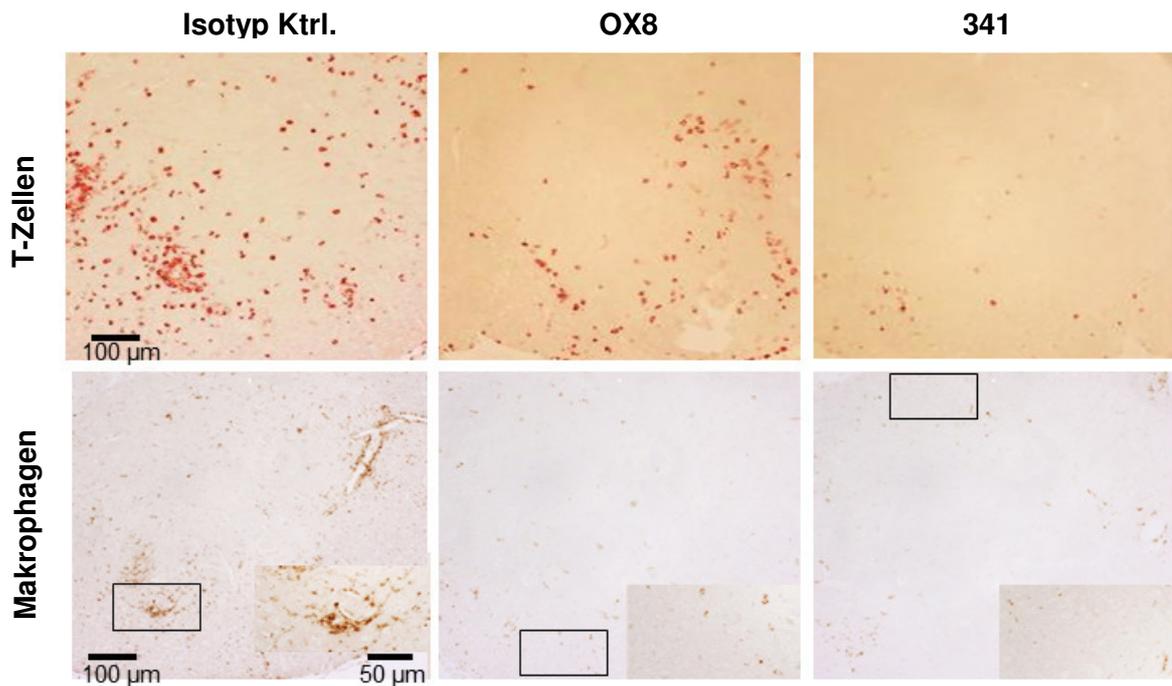


Abbildung 14: Die Immunohistochemische Analyse des Rückenmarks am Tag 14 nach Immunisierung zeigt, dass die Depletion von CD8⁺ Zellen eine reduzierte Infiltration von Leukozyten in das Rückenmark einhergeht (Camara et al., 2013).

Die Auswertung der immunhistochemischen Färbungen zeigte bei den Kontrolltieren wie erwartet eine massive Infiltration von T-Zellen und Makrophagen in das lumbale Rückenmark (Abb. 14). Hingegen konnten nur sehr wenige T-Zellen und Makrophagen im Rückenmark der CD8-depletierten Tiere detektiert werden. So war die Zahl der T-Zellen im Rückenmark der Kontrollgruppe im Vergleich zur 341-Gruppe um den Faktor 3,6 und im Vergleich zur OX8-Gruppe sogar um den Faktor 9 erhöht. Hinsichtlich der Makrophagen ergaben sich für die Kontrollgruppe im Vergleich zu der OX8-behandelten Gruppe um den Faktor 8,6 erhöhte Infiltratzahlen und im Vergleich zu der 341-behandelten Gruppe waren die Makrophageninfiltrate um den Faktor 5,7 erhöht (Abb. 15).

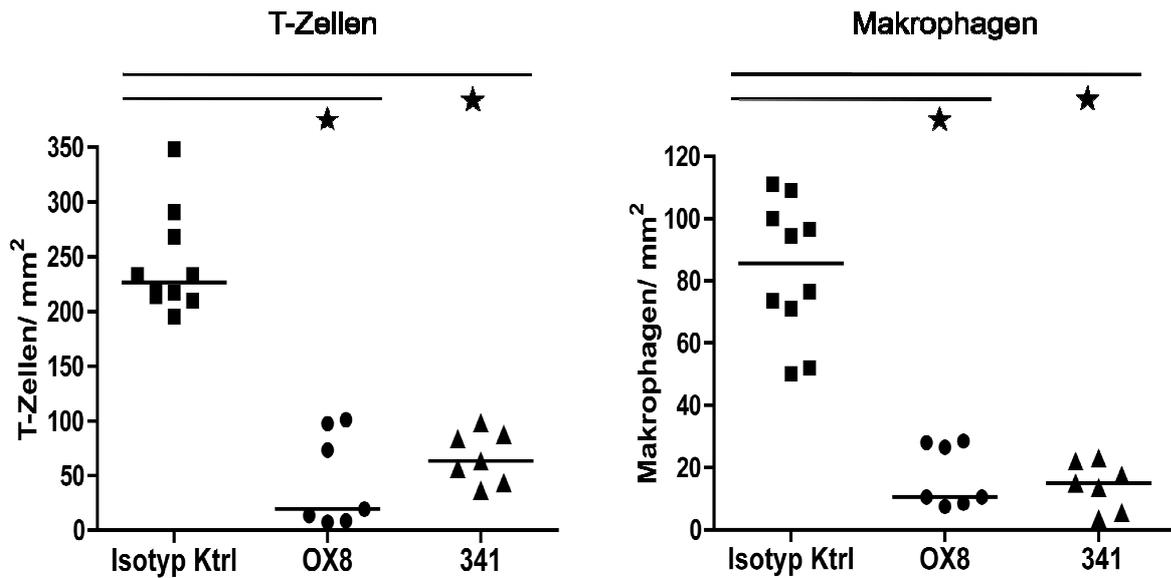


Abbildung 15: Analyse der absoluten Infiltratzahlen im Rückenmark am Tag 14 nach Immunisierung. Sowohl für T-Zellen (gefärbt mit B115-1), als auch für Makrophagen (gefärbt mit ED-1) zeigten sich signifikante Unterschiede (Analyse: Mann-Whitney Test) zwischen der Kontrollgruppe (n = 10) und den CD8-depletierten Gruppen (OX8-Gruppe: n = 7; 341-Gruppe: n = 7). Die horizontalen Linien entsprechen den Medianen der jeweiligen Gruppen (Camara et al., 2013).

Die mittels Immunhistochemie erzielten Ergebnisse konnten durch FACS-Analyse bestätigt werden. Hierzu wurden die mononukleären Zellen aus dem Rückenmark mittels Percollgradient aufgereinigt und mit CD4- sowie α TZR-spezifischen monoklonalen Antikörpern gefärbt. Die anschließende Auswertung der FACS-Analyse zeigte eine im Vergleich zur Kontrollgruppe um den Faktor 2 verminderte Frequenz von CD4⁺ T-Zellen (Abb. 16).

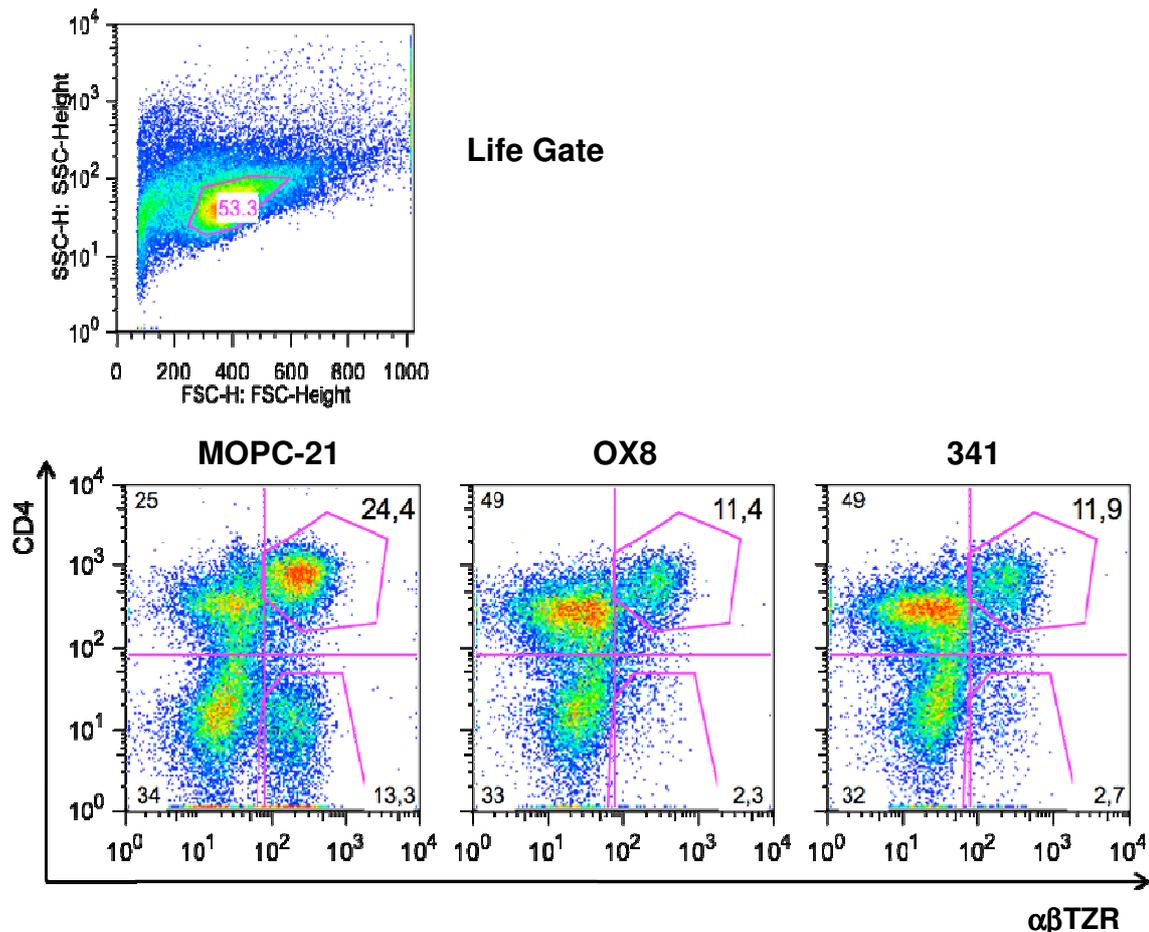


Abbildung 16: Analyse der Frequenz der CD4⁺ T-Zellen im Rückenmark mittels FACS (Camara et al., 2013).

Die reduzierte Zahl der CD4⁺ T-Zellen im Rückenmark der CD8-defizienten EAE-Tiere könnte die Folge einer beeinträchtigten Transmigration ausdifferenzierter Effektorzellen in das ZNS sein. Erklärbar wäre dies z.B. durch eine intakte Bluthirnschranke in diesen Tieren. Alternativ könnte man sich vorstellen, dass autoraktive CD4⁺ T-Zellen zwar in das ZNS einwandern können, dort aber in Folge Apoptose absterben. Ein solches Phänomen wurde z.B. im Rahmen einer Antigen-therapie der EAE beobachtet (Tischner et al., 2007).

Zunächst wurde mittels der TUNEL (TdT mediated dUTP-chromofore X nick end labeling)-Methode nach apoptotischen T-Zellen im ZNS gefahndet. Die Methode beruht auf der Sichtbarmachung von DNS-Strangbrüchen, wie sie bei der Apoptose entstehen. An die Strangenden der DNS werden Fluoreszein-gekoppelte dUTPs angehängt, was durch die Terminale-desoxynukleotidyl-Transferase bewerkstelligt wird. Detektiert werden die verlängerten Strangenden durch einen anti-Fluoreszein Antikörper, der mit alkalischer Phosphatase konjugiert ist. Als Substrat für die alkalische Phosphatase wird NBT/BCIP eingesetzt, das nach der Enzymreaktion als dunkles Präzipitat in den Zellkernen der apoptotischen Zellen lokalisiert ist.

Die Apoptosefärbung wurde in den ZNS-Gewebeschnitten durchgeführt, die auch mit dem Pan T-Zellmarker B115-1 gefärbt wurden. Dabei konnte in den Schnitten keine Doppelfärbungen von roten T-Zellen und darin befindlichen dunklen Nuklei beobachtet werden. Es gibt also keinen Anhaltspunkt für Apoptose von T-Zellen im Rückenmark von CD8-depletierten Tieren (Abb. 14).

Als Nächstes wurde untersucht, ob die beobachteten Phänomene mit einer unterschiedlichen Durchlässigkeit der Bluthirnschranke der Kontrolltiere im Vergleich zu den CD8-defizienten Tieren zu erklären sind. Als Methode hierzu eignet sich die Anfärbung der Schnitte mit einem primären Antikörper, der gegen Albumin gerichtet ist. Albumin ist ein Eiweiß im Blut, welches den kolloidosmotischen Druck aufrecht erhält und auf Grund seiner Größe nicht in der Lage ist, eine intakte BHS zu passieren. Ist die BHS jedoch durchlässig, dringt Albumin osmotisch bedingt in das Gewebe des ZNS ein. Eine positive Albuminfärbung ist daher ein Indiz für eine offene BHS.

Der albuminspezifische Antikörper ist mit Peroxidase konjugiert. Zur Visualisierung gebundener Antikörper wird wie bei der Makrophagenfärbung DAB als Substrat zu den Proben hinzugefügt. Es bildet sich ein braunes Präzipitat, wenn Albumin im ZNS vorliegt. Dies war in den Lewis-Ratten, die nur mit dem Antikörper der Isotypkontrolle behandelt wurden, zu beobachten. Die Schnitte der CD8-depletierten Ratten zeigten dagegen fast keine Braunfärbung des ZNS-Gewebes (Abb. 17).

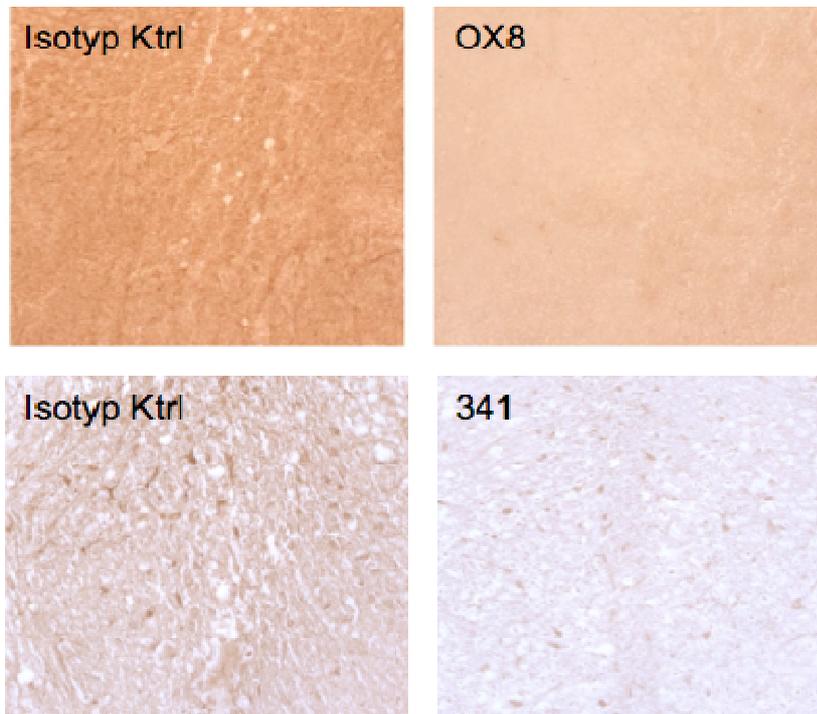


Abbildung 17: Albuminfärbung zur Überprüfung einer intakten Blut-Hirnschranke. Vergleich zwischen Kontrolltieren und OX8- bzw. 341-behandelten Tieren.

Die Daten aus den immunhistochemischen Analysen lassen den Schluss zu, dass die beiden maßgeblich an der Pathogenese der EAE beteiligten Zellpopulationen – nämlich T-Zellen und Makrophagen – in CD8-defizienten Tieren weitgehend daran gehindert werden, in das ZNS einzuwandern.

6.3 CD8-Defizienz beeinträchtigt die Generierung enzephalitogener CD4⁺ T-Zellen

Die bisher erzielten Resultate sprechen dafür, dass in Abwesenheit von CD8⁺ T-Zellen gpMBP-spezifische CD4⁺ T-Zellen in der Peripherie entweder nicht zu Effektor T-Zellen differenzieren oder dass voll ausdifferenzierte CD4⁺ Effektor T-Zellen unter diesen Bedingungen daran gehindert werden, in das ZNS einzuwandern. Um zwischen diesen beiden Möglichkeiten unterscheiden zu können, erfolgte ein adoptiver Transfer von voll ausdifferenzierten enzephalitogenen CD4⁺ T-Zellen in normale Empfängertiere, in OX8-behandelte Tiere bzw. in CD8KO Ratten. In einer ersten Reihe von Experimenten wurden 8 Millionen enzephalitogene CD4⁺ T-Zellen in Lewis-Ratten transferiert, die zwei Tage vor Zelltransfer entweder mit einem Isotyp-Kontrollantikörper bzw. mit OX8 behandelt wurden. Wie erwartet zeigten die Tiere der Kontrollgruppe erste klinische Zeichen einer AT-EAE am Tag 3 nach adoptivem Transfer der MBP-spezifischen CD4⁺ T-Zellen, erreichten die maximale Krankheitsaktivität am Tag 5 und erholten sich schließlich vollständig am Tag 8 (Abb. 18). Im Gegensatz zur aktiv induzierten EAE zeigten jetzt die Kontrolltiere und die CD8-depletierten Tiere gleich starke Krankheitsaktivitäten in der AT-EAE (Abb. 18).

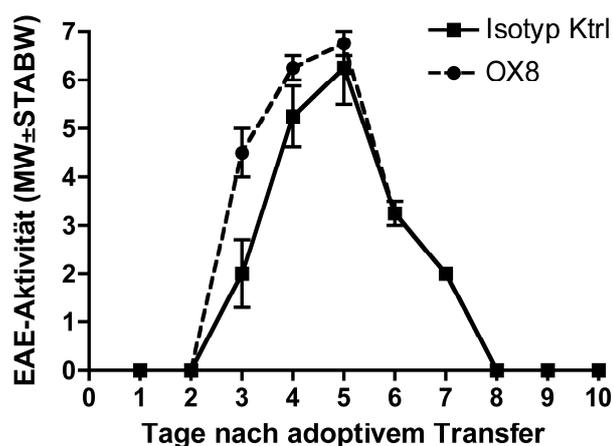


Abbildung 18: EAE-Aktivität nach Adoptivem-Zelltransfer von enzephalitogenen CD4⁺ T-Zellen. Sowohl in der Isotypkontrolle (n = 4), als auch in CD8-depletierten Tieren (n = 4) zeigte sich eine gleich starke Krankheitsaktivität der EAE (Camara et al., 2013).

In einem zweiten Experiment wurden 8 Millionen gpMBP-spezifische CD4⁺ T-Zellen in CD8KO-Ratten bzw. deren wildtypische Geschwistertiere transferiert.

Auch hier zeigten beide Gruppen gleich starke Krankheitsaktivitäten (Abb. 19). Diese Ergebnisse legen somit den Schluss nahe, dass das pathogene Potential von voll ausdifferenzierten gpMBP-spezifischen CD4⁺ T-Zellen nicht von der Anwesenheit der CD8⁺ T-Zellen in den Empfängertieren abhängt.

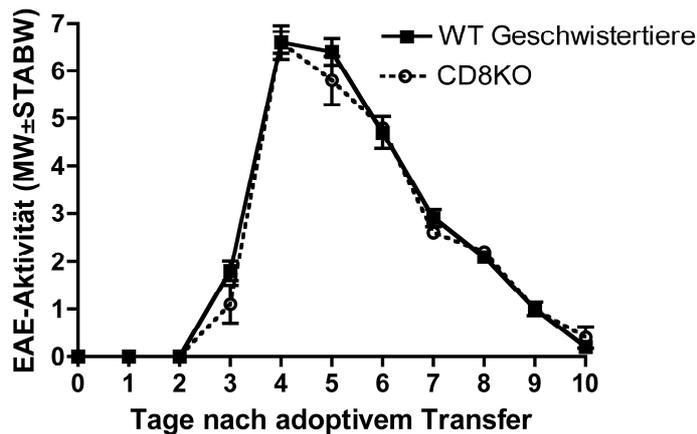


Abbildung 19: Der adoptive Zelltransfer von enzephalitogenen CD4⁺ T-Zellen führt sowohl in wildtypischen Geschwistertieren (n = 4), als auch in CD8KO-Tieren (n = 5) zu einer gleich starken Krankheitsaktivität in der EAE (Camara et al., 2013).

Neben dem Fehlen von CD8⁺ T-Zellen könnten CD8 KO-Ratten zusätzliche Defekte in sich tragen, so z.B. eine beeinträchtigte Generierung voll funktionsfähiger enzephalitogener CD4⁺ T-Zellen. In diesem Fall müssten die aus den bisherigen Ergebnissen gezogenen Schlussfolgerungen zumindest teilweise in Frage gestellt werden. Daher wurden CD4⁺ T-Zellen aus CD8KO-Ratten isoliert, *ex vivo* mit gpMBP stimuliert und hinsichtlich ihres Potentials, eine AT-EAE in wildtypischen Empfängertieren zu induzieren, analysiert. Abb. 20 zeigt, dass die Krankheitsaktivität dieser Tiere vergleichbar war mit einer AT-EAE, welche nach adoptivem Transfer von enzephalitogenen CD4⁺ T-Zellen aus wildtypischen Donortieren induziert werden konnte.

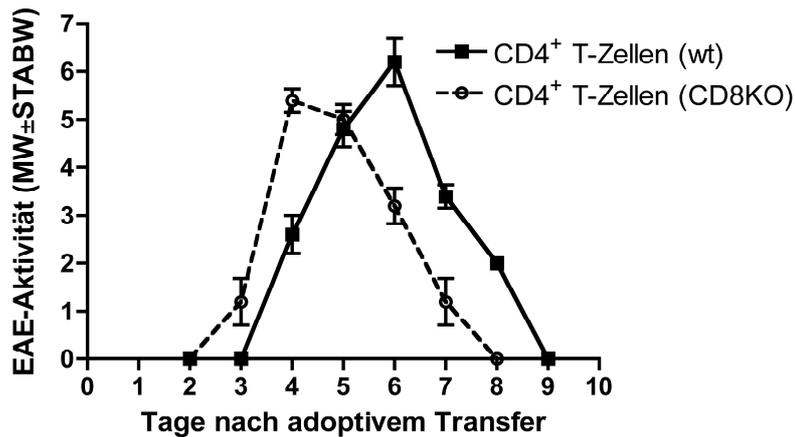


Abbildung 20: Adoptiver Transfer von mit gpMBP *ex vivo* stimulierten CD4⁺ T-Zellen, die aus den drainierenden Lymphknoten immunisierter CD8KO-Ratten (n = 4) und deren wildtypischen Geschwistertieren (n = 4) isoliert wurden, in wildtypische Rezipienten. Beobachtet wurde, dass auch die CD4⁺ T-Zellen aus den CD8KO-Tieren nach Stimulation in der Lage sind, eine AT-EAE auszulösen (Camara et al., 2013).

Diese Ergebnisse bekräftigen unserer Hypothese, dass *in vivo* MBP-spezifische CD4⁺ T-Zellen in Abwesenheit von CD8⁺ T-Zellen nicht vollständig zu Effektorzellen differenzieren und infolgedessen – im Falle der aktiven EAE - nicht in das Rückenmark der Tiere einwandern können. Dieses funktionelle Defizit kann jedoch durch antigene Restimulation der CD4⁺ T-Zellen *ex vivo* überwunden werden. Im Verlauf dieses Prozesses differenzieren die Zellen offensichtlich zu enzephalitogenen Effektorzellen und können eine AT-EAE induzieren.

6.4 Myelinspezifische CD4⁺ T-Zellen expandieren in CD8-defizienten Lewis-Ratten aber differenzieren nicht zu zytokinsezernierenden TH1-Effektorzellen aus

Zur Klärung der Mechanismen, die in Abwesenheit von CD8⁺ T-Zellen zu einer milderen Krankheitsaktivität der aktiven EAE führen, wurde untersucht, ob funktionelle Defekte der CD4⁺ T-Zellen in der Peripherie für die reduzierte Infiltration von gpMBP-spezifischen CD4⁺ T-Zellen in das Rückenmark der CD8-depletierten Tiere verantwortlich sind. Hierzu wurden am Tag 10 nach Immunisierung mit gpMBP Lymphknotenzellen aus den drainierenden und nicht-drainierenden Lymphknoten von normalen Kontrolltieren bzw. von CD8-defizienten Tieren isoliert. Konventionelle CD4⁺Foxp3⁻ T-Zellen wurden durch Anfärbung mit CD4- und Foxp3-spezifischen monoklonalen Antikörpern identifiziert und hinsichtlich der Expression des Aktivierungsmarkers CD25 sowie des Proliferationsmarkers Ki-67 am Durchflusszytometer analysiert. Aus Abb. 21A geht hervor, dass in den drainierenden Lymphknoten sowohl der Kontrolltiere als auch

der CD8-defizienten Tiere aktivierte und proliferierende CD4⁺CD25⁺Ki-67⁺ T-Zellen in ähnlich hoher Frequenz nachgewiesen werden konnten.

Da dieses Experiment zwar Aufschluss über den Aktivierungsstatus aber nicht über die Antigenpezifität der analysierten CD4⁺ T-Zellen gab, wurden die beiden Gruppen von Tieren hinsichtlich ihrer Präsenz an gpMBP-spezifischen CD4⁺ T-Zellen in peripheren lymphoiden Organen untersucht. Hierzu wurden am Tag 10 nach Immunisierung die drainierenden Lymphknoten aus Kontrolltieren und CD8-depletierten Tieren entnommen. Anschließend wurden mittels magnetischer Zellseparation CD4⁺ T-Zellen gereinigt und diese *in vitro* für einen Zeitraum von 72h hinsichtlich ihrer proliferativen Antwort auf gpMBP untersucht. Bemerkenswerterweise zeigen CD4⁺ T-Zellen aus Kontrolltieren und OX8-behandelten Tieren eine ähnlich stark ausgeprägte Recallantwort auf gpMBP (Abb. 21B).

Während der Induktionsphase der EAE proliferieren myelinspezifische CD4⁺ T-Zellen und differenzieren zu zytokinproduzierenden TH1- bzw. TH17-Effektorzellen aus, bevor sie in das ZNS einwandern (Furtado et al., 2008; Jager und Kuchroo, 2010; Phillips et al., 1997; Steinman, 2001). Um zu testen, ob die Abwesenheit von CD8⁺ T-Zellen mit diesem Prozess interferiert, wurden CD4⁺ T-Zellen von Kontrolltieren und CD8-depletierten Tieren auf ihre Fähigkeit hin untersucht, nach *in vitro* Stimulation mit gpMBP das pro-inflammatorische Zytokin Interferon- γ zu produzieren. Dazu wurden von den Kulturen aus dem eben beschriebenen Recall-assay Überstände entnommen und diese hinsichtlich der Konzentration von Interferon- γ mittels CBA-Array quantitativ analysiert. Im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigten die CD4⁺ T-Zellen, die aus den CD8-depletierten Tieren isoliert wurden, eine deutlich reduzierte Kapazität, das Zytokin Interferon- γ zu produzieren (Abb. 21C).

Zusammenfassend lassen diese Ergebnisse den Schluss zu, dass myelinspezifische CD4⁺ T-Zellen in CD8-depletierten Tieren zwar expandieren, aber offensichtlich nicht alle Signale erhalten, die zu ihrer Differenzierung in Richtung funktionsfähiger Effektor T-Zellen nötig sind.

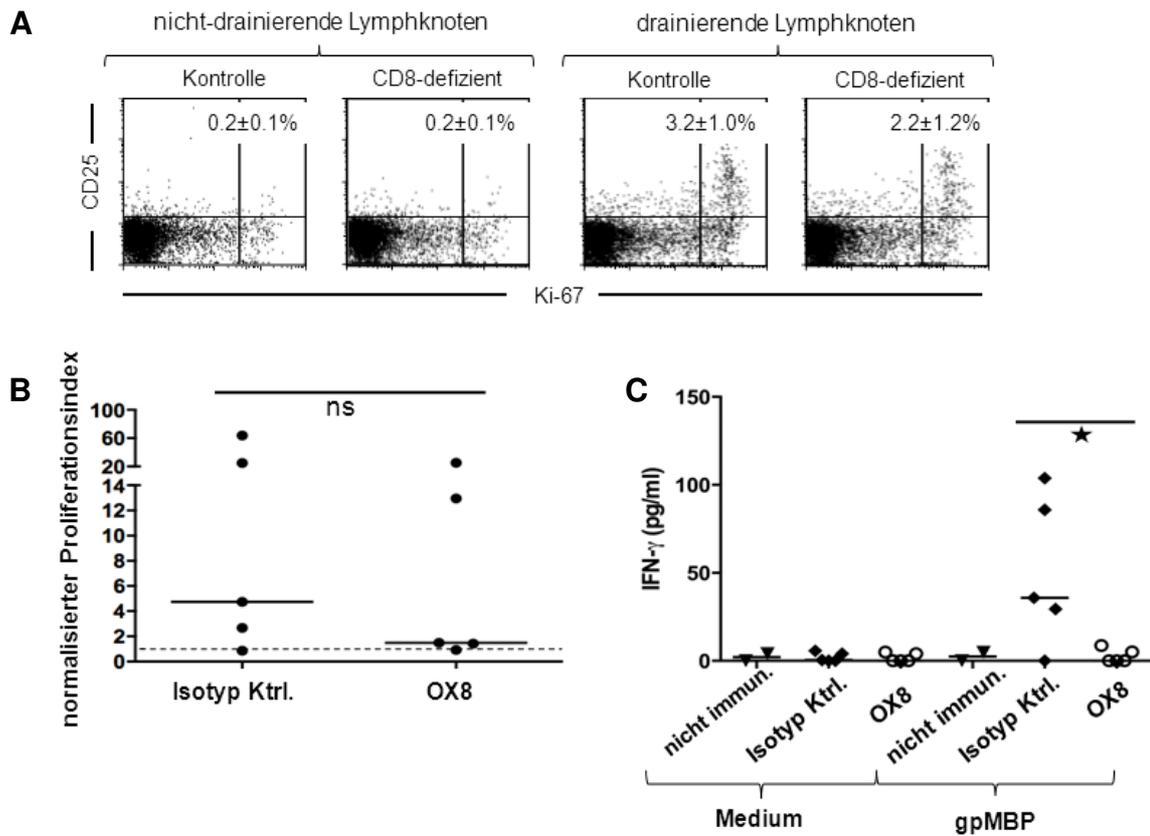


Abbildung 21: Funktionelle Analyse von T-Zellen aus nicht-immunisierten bzw. immunisierten Lewis-Ratten. (A) Detektion von aktivierten $CD4^+CD25^+Ki-67^+Foxp3^+$ T-Zellen in den drainierenden Lymphknoten von gpMBP-immunisierten normalen Kontrollratten (Isotyp-Ktrl Gruppe bzw. wt Geschwistertiere; $n = 2$ pro Gruppe) und CD8-defizienten Ratten (OX8 bzw. CD8KO; $n = 2$ pro Gruppe) am Tag 10 nach Immunisierung. (B) *In vitro* recall-Antworten von $CD4^+$ T-Zellen auf die Restimulation mit gpMBP. Die $CD4^+$ T-Zellen wurden am Tag 10 nach Immunisierung mit gpMBP aus den drainierenden Lymphknoten von CD8-defizienten ($n = 5$) oder Kontrolltieren ($n = 5$) aufgereinigt. Dargestellt ist der normalisierte Proliferationsindex. Die gestrichelte Linie repräsentiert die Proliferation von Lymphknotenzellen aus nicht immunisierten Tieren. Die statistische Analyse zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den untersuchten Gruppen. (C) Analyse der $IFN-\gamma$ -Konzentration in den Überständen, die von den in (B) beschriebenen Kulturen abgenommen wurden. Die statistische Analyse (Mann-Whitney Test) zeigte signifikante Unterschiede zwischen $CD4^+$ T-Zellen, die aus Isotyp-behandelten Tieren isoliert wurden und denen, die aus OX8-behandelten Tieren isoliert wurden und jeweils mit gpMBP restimuliert worden waren (Camara et al., 2013).

6.5 CD8⁺ T-Zellen produzieren Interferon- γ zu einem früheren Zeitpunkt nach Immunisierung mit gpMBP als CD4⁺ T-Zellen

Zum besseren Verständnis der Mechanismen, die für die beeinträchtigte Generierung von enzephalitogenen CD4⁺ T-Zellen in Abwesenheit von CD8⁺ T-Zellen verantwortlich sind, wurde die Kinetik der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zell-vermittelten Immunantworten in den drainierenden Lymphknoten von normalen Lewis-Ratten nach der Immunisierung mit gpMBP in CFA analysiert.

An den Tagen 1, 3, 7 und 10 nach Immunisierung wurde die proliferative Antwort der T-Zellen durch Messung der Expression des Proliferationsmarker Ki-67 mittels FACS-Analyse untersucht. Abb. 22A zeigt, dass nicht nur konventionelle CD4⁺Foxp3⁻ sondern auch CD8⁺ T-Zellen nach Immunisierung zur Proliferation angetrieben werden, was aus der im Vergleich zur nicht immunisierten Kontrollgruppe erhöhten Frequenz Ki-67 positiver Zellen ersichtlich ist. Die Frequenz proliferierender Zellen innerhalb der CD4⁺ T-Zellen aus den drainierenden Lymphknoten immunisierter Tiere erreichte ein Maximum am Tag 7 und fiel danach wieder leicht ab. Demgegenüber stieg die Frequenz an proliferierenden Zellen innerhalb der CD8⁺ T-Zellen aus den drainierenden Lymphknoten der immunisierten Tiere bis zum Tag 10 kontinuierlich an. Als zweite funktionelle Analyse wurde in den EAE-Tieren der zeitliche Verlauf der Interferon- γ -Produktion durch CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen analysiert. Im Vergleich zur Kontrollgruppe wurde bei den CD4⁺ T-Zellen der immunisierten Gruppe eine leicht erhöhte Frequenz Interferon- γ -exprimierender Zellen an den Tagen 7 und 10 beobachtet.

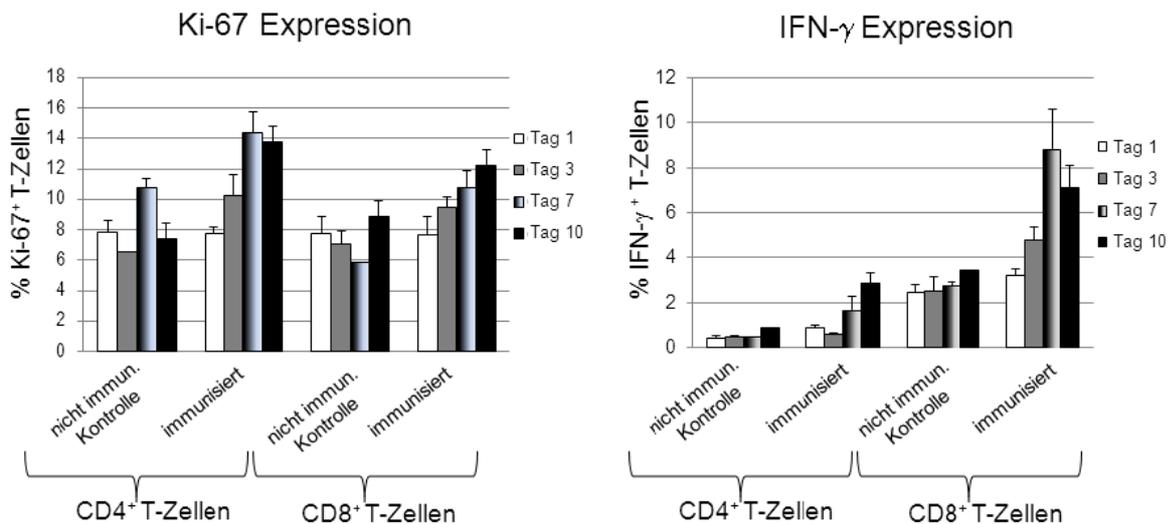


Abbildung 22: Kinetik von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zell-Antworten nach der gpMBP-Immunisierung von normalen Lewis-Ratten. Zu jedem angegebenen Zeitpunkt wurden die CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen von nicht immunisierten Kontrollratten (n = 1-2) und immunisierten Ratten (n = 3) hinsichtlich der Expression von Ki-67 und IFN- γ analysiert (Camara et al., 2013).

Im Gegensatz hierzu zeigte sich bei den CD8⁺ T-Zellen derselben Gruppe eine schnellere Kinetik. So konnten bereits am Tag 3 verglichen mit der Kontrollgruppe deutlich erhöhte Frequenzen Interferon- γ positiver CD8⁺ T-Zellen beobachtet werden. Die höchste Frequenz an IFN- γ ⁺ CD8⁺ T-Zellen wurde am Tag 7 gemessen mit einem dreifachen Anstieg gegenüber den Kontrollen aus nicht-immunisierten Tieren. Danach fiel die Frequenz an IFN- γ ⁺ CD8⁺ T-Zellen in den drainierenden Lymphknoten wieder ab (Abb. 22B).

6.6 Detektion von gpMBP-spezifischen CD8⁺ T-Zellen in Lewis-Ratten, die mit gpMBP in CFA s.c. immunisiert wurden

Die eben beschriebenen Ergebnisse deuten darauf hin, dass sowohl CD8⁺ T-Zellen als auch CD4⁺ T-Zellen nach Immunisierung mit gpMBP aktiviert werden. Allerdings liefern sie keine Informationen über die Antigen-spezifität der analysierten CD8⁺ T-Zellen. Als Nächstes wurde daher versucht, gpMBP-spezifische CD8⁺ T-Zellen mittels Interferon- γ ELISpot zu detektieren.

6.6.1 Detektion gpMBP-spezifischer CD8⁺ T-Zellen mittels IFN- γ ELISpot

Das Prinzip des Enzym-gekoppelten Immunospots (enzyme-linked immunospot, ELISpots) beruht auf der quantitativen Analyse antigenspezifischer T-Zellen anhand der Sekretion von Effektorproteinen (z.B. Interferon- γ).

- zum Verständnis unseres Testsystems werden im Folgenden die verwendeten Stimulatorzellen (a) und deren Generierung (b), die zu analysierenden Effektorzellen (c) und deren Kokultur mit den Stimulatorzellen im Ratten IFN- γ ELISpot, sowie die Visualisierung von sezerniertem IFN- γ (d) beschrieben.

a) Stimulatorzellen:

Als Stimulatorzellen wurden Rajizellen verwendet. Zur Abfrage gpMBP-spezifischer CD8⁺ T-Zellantworten der Lewis-Ratte wurden die Rajizellen mit dem Lewis-Ratten MHC Klasse I Molekül RT1.A^I und gpMBP retroviral transduziert. Auf diese Weise können gpMBP-Proteine endogen prozessiert und über das MHC Klasse I Molekül der Lewis-Ratte CD8⁺ T-Zellen präsentiert werden (Abb. 23). Als Negativkontrollen dienten nicht transduzierte Rajizellen bzw. nur einzeln mit RT1.A^I oder gpMBP transduzierte Rajizellen. Letztere wurden generiert um auszuschließen, dass eine beobachtete Antwort nach Stimulation mit RT1.A^I und gpMBP retroviral transduzierten Rajizellen nicht durch Phagozytose derselben und subsequenter Präsentation von gpMBP über MHC II Moleküle auf antigenpräsentierenden Zellen in der Kultur erfolgt. Durch die Immunisierung mit gpMBP in CFA werden typischerweise gpMBP-spezifische CD4⁺ T-Zellen aktiviert. Die Abfrage der gpMBP-spezifischen CD4⁺ T-Zellantworten erfolgte in Ansätzen, in

denen mittels MHC Klasse II (RT1.B^I) retroviral transduzierte und mit dem Peptid gpMBP₆₈₋₈₆ beladene Rajizellen als Stimulatorzellen eingesetzt wurden. Als Negativkontrollen dienten Rajizellen, die unbeladene RT1.B^I Moleküle exprimierten.

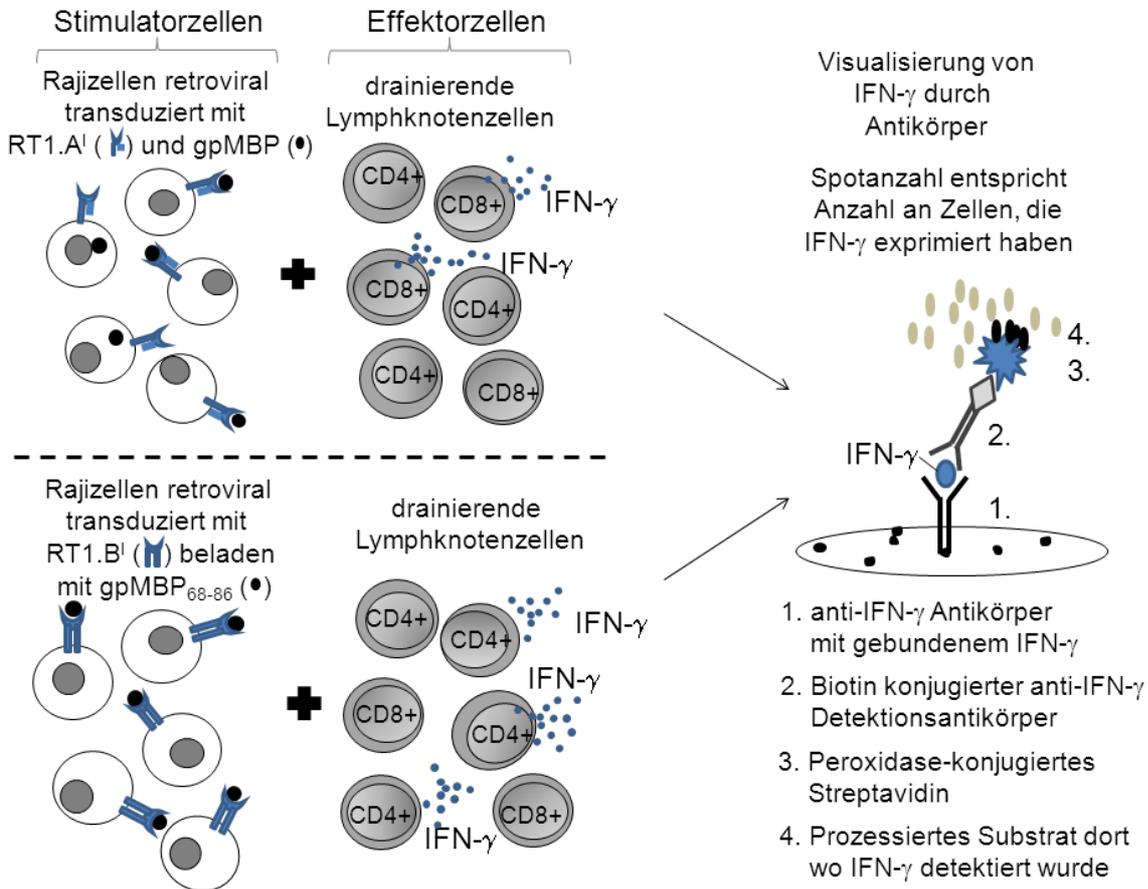


Abbildung 23: Ratten IFN-γ ELISpot Analyse zur Detektion von T-Zellen, die präsentierte gpMBP-Peptide erkennen. Das obere Schema ist der Ansatz mit RT1.A^I und gpMBP retroviral transduzierten Rajizellen, die als Stimulatorzellen zur Detektion von gpMBP-spezifischen CD8⁺ T-Zellen dienen. Das untere Schema zeigt Rajizellen, die mit RT1.B^I transduziert und mit gpMBP₆₈₋₈₆ beladen wurden. Die Zellen dienen als Stimulatorzellen zur Abfrage von gpMBP-spezifischen CD4⁺ T-Zellen.

Zur Generierung der unterschiedlichen Rajizellen wurde die cDNA von RT1.A^I (Pubmed, GenBank: L26224.1) in die multiple Klonierungsstelle des retroviralen Expressionsvektors SFG S65T bzw. gpMBP (ensemble.org, Gene: MBP_CAVPO ENSCPOG00000008430, Transcript: MBP_CAVPO ENSCPOT00000008506) in die multiple Klonierungsstelle des Vektors pczCFG5 IEGZ inkloniert. Dieser trägt zusätzlich die Sequenz für das grün fluoreszierende Protein (GFP). Für die Herstellung von Retroviren, die das gewünschte Konstrukt enthalten, wurde das jeweilige Expressionsplasmid zusammen mit den retroviralen Expressionsplasmiden pHit 60 und VSV, die für virale Gene kodieren, präzipitiert und auf 293T-Zellen aufgebracht. Nach erfolgter Präzipitataufnahme durch die

293T-Zellen setzt in diesen Zellen die Genexpression ein und die viralen Partikel setzen sich zusammen. Diese gelangen nach Lyse der Wirtszelle in den Überstand. Der Überstand mit darin enthaltenen viralen Partikeln wurde schließlich zu Rajizellen gegeben und die Ansätze für 3 Stunden bei 37°C und 2000rpm zentrifugiert. Auf diese Art wird ein enger Kontakt zwischen viralen Partikeln und Zielzellen hergestellt, sodass die viralen Partikel die Rajizellen infizieren können.

Zur Überprüfung der retroviralen Transduktion wurden die Rajizellen mit Antikörpern gegen RT1.A^I (OX18 PE) bzw. RT1.B^I (OX6 PE) gefärbt und im FACS gemessen. Die GFP-Expression in den Zellen weist auf die Anwesenheit von gpMBP bzw. RT1.B^I in den jeweiligen Rajizellen hin (Abb. 24).

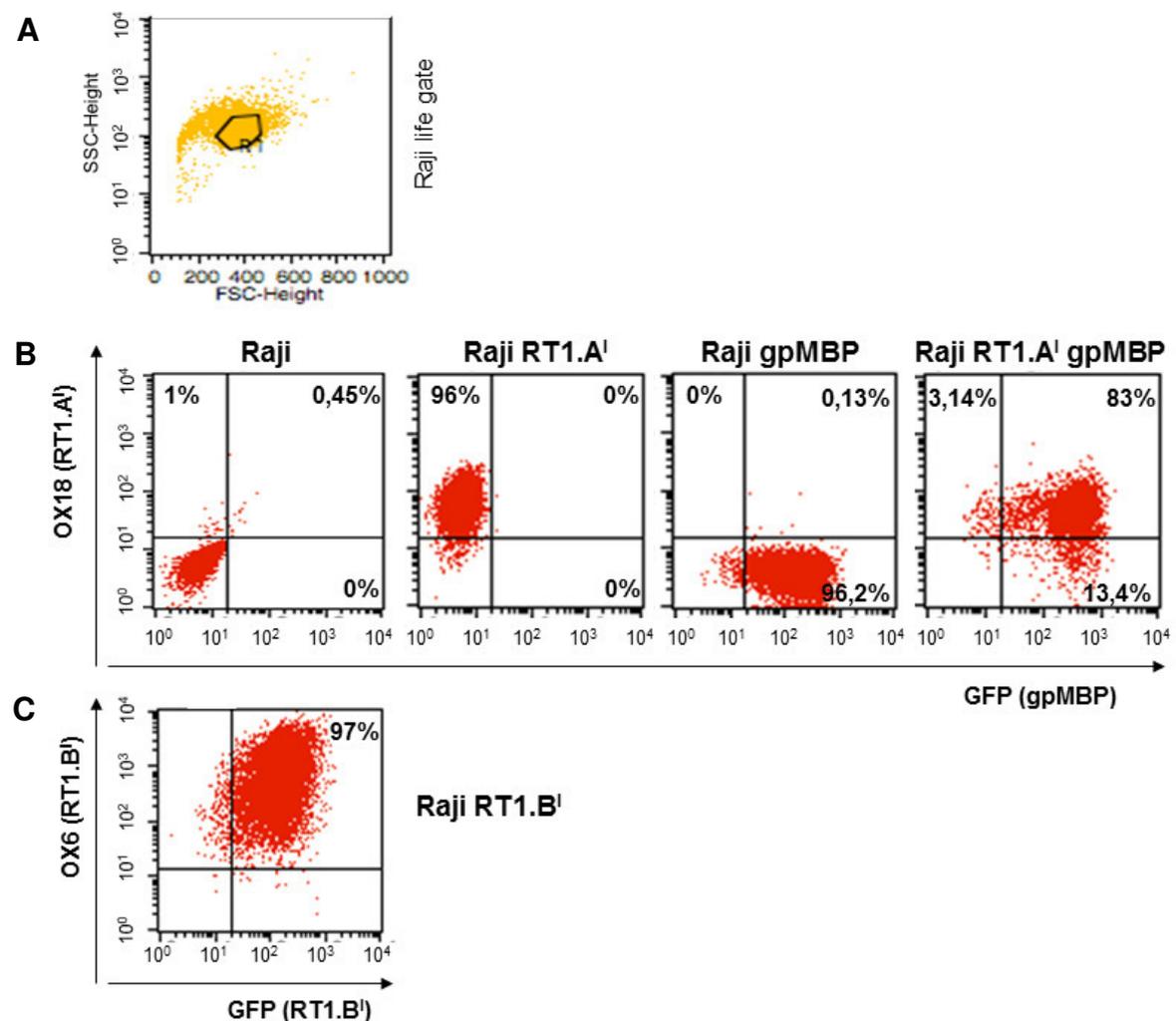


Abbildung 24: Repräsentative FACS-Dotplots von Raji Zellen. (A) Life gate von Rajizellen, (B) FACS-Dotplots von Rajizellen und Rajizellen, die mit gpMBP, RT1.A^I, RT1.A^I und gpMBP bzw. (C) RT1.B^I retroviral transduziert wurden und als Stimulatorzellen eingesetzt wurden.

c) Effektorzellen

Als Effektorzellen dienten auch hier Zellen aus den drainierenden Lymphknoten von Lewis-Ratten, die 10 Tage zuvor mit gpMBP in CFA immunisiert worden waren.

d) Durchführung des Ratten IFN- γ ELISpots und Visualisierung von IFN- γ

In einer Kokultur von 5×10^4 Stimulatorzellen mit 1×10^5 Effektorzellen wurden die Ansätze für 21h bei 37°C in Wells inkubiert, die zuvor über Nacht mit primären Antikörpern beschichtet wurden, die Ratten-IFN- γ erkennen.

Tabelle 2: Unterschiedlich retroviral transduzierte Rajizellen, die im ELISpot als Stimulatoren eingesetzt wurden.

Stimulatorzellen	erwartete Antwort von CD8 ⁺ T-Zellen	erwartete Antwort von CD4 ⁺ T-Zellen
Raji	-	-
Raji + RT1.A ^I	-	-
Raji + gpMBP	-	-
Raji + RT1.A ^I + gpMBP	+	-
Raji + RT1.B ^I	-	-
Raji + RT1.B ^I beladen mit gp68-86	-	+

Nach der Inkubationszeit wurde der anti-Ratten IFN- γ ELISpot entwickelt, um sezerniertes IFN- γ zu visualisieren. Dazu wurden die Zellen gewaschen und gebundenes IFN- γ mittels eines biotinylierten Ratten-IFN- γ Antikörpers detektiert. Anschließend wurden Streptavidin-Meerrettichperoxidase-Komplexe zu den Ansätzen hinzugefügt. Die Peroxidase wandelt die final zugegebene Substratlösung an den Stellen zu unlöslichen dunkelblauen Präzipitaten um, an denen IFN- γ an den Primärantikörper gebunden vorliegt.

Im Folgenden sind die beobachteten Antworten von CD4⁺ bzw. CD8⁺ T-Zellen auf die unterschiedlichen Stimulatorzellen aufgeführt.

1) Analyse der „CD4-T-Zell-Antwort“:

Zunächst erfolgte der Vergleich von Lymphknotenzellen aus nicht immunisierten versus immunisierten Tieren. Die quantitative Analyse des ELISpots erbrachte dabei eine im Vergleich zu den Kontrolltieren 17fach erhöhte Frequenz Interferon-

γ -sezernierender Zellen in den drainierenden Lymphknoten von mit gpMBP immunisierten Tieren (Abb. 25). In den mit ConA versetzten Proben war eine deutlich höhere IFN- γ -Sekretion in den Näpfen zu sehen, die LN-Zellen aus immunisierten Tieren enthielten, als in den Näpfen, die mit LN-Zellen aus nicht immunisierten Tieren befüllt waren.

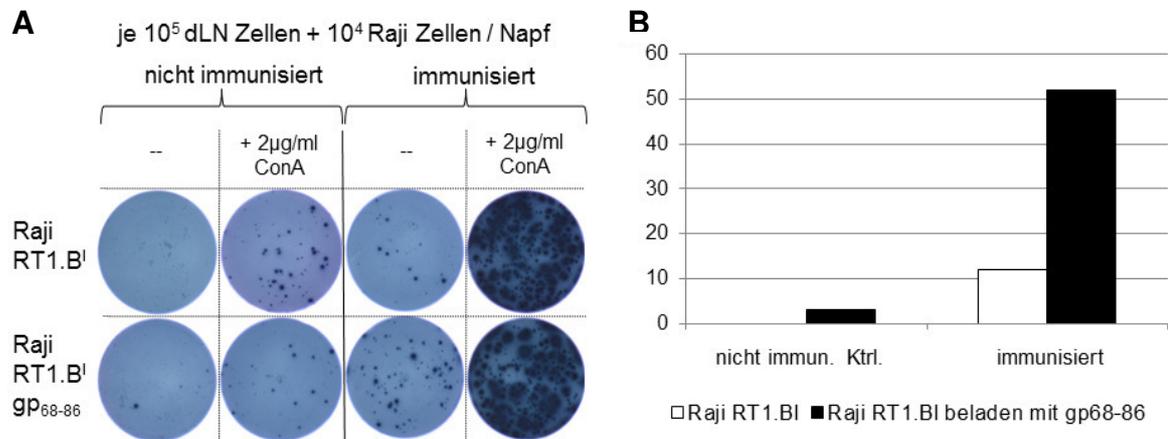


Abbildung 25: Detektion von gpMBP-spezifischen Interferon- γ -sezernierenden CD4⁺ T-Zellen in den drainierenden Lymphknoten von immunisierten Lewis-Ratten. Vergleich zwischen nicht immunisierten und immunisierten Tieren. Am Tag 10 nach Immunisierung wurden die Lymphknotenzellen kokultiviert mit Rajizellen, die retroviral mit RT1.B¹ transduziert wurden und unbeladen blieben bzw. mit dem Peptid gpMBP₆₈₋₈₆ beladen wurden. (A) Näpfe der ELISpot-Platte mit ConA Kontrollen. (B) Diagramm der ausgezählten Spots. Nicht dargestellt sind die ConA Kontrollen (Camara et al., 2013).

In einem weiteren Experiment wurden Lymphknotenzellen aus den nicht drainierenden versus drainierenden Lymphknoten von immunisierten Tieren verglichen.

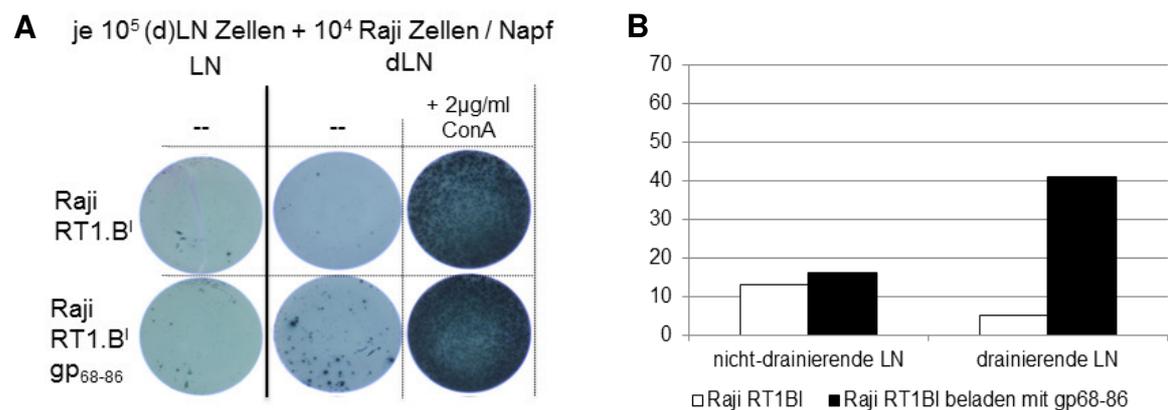


Abbildung 26: Detektion von gpMBP-spezifischen Interferon- γ -sezernierenden CD4⁺ T-Zellen in den drainierenden Lymphknoten von immunisierten Lewis-Ratten. Vergleich zwischen drainierenden und nicht drainierenden Lymphknoten (Camara et al., 2013). Die Kokultur von Stimulatorzellen und Effektorzellen erfolgte unter den gleichen Bedingungen wie in Abb. 25 beschrieben. (A) Näpfe der ELISpot-Platte mit ConA Kontrolle. Für die LN Zellen sahen die ConA Kontrollen aus, wie für die Zellen der dLN, weshalb sie nicht extra abgebildet wurden. (B) Diagramm der ausgezählten Spots. Nicht dargestellt sind die ConA Kontrollen (Camara et al., 2013).

Hier wurde in den drainierenden Lymphknoten eine 2,5-fach höhere Frequenz Interferon- γ -sezernierender Zellen gemessen als in den nicht drainierenden Lymphknoten des gleichen immunisierten Tieres (Abb. 26). Die Frequenz der IFN- γ Sekretion war für LN bzw. dLN Zellen gleich.

2) Analyse der „CD8-T-Zell-Antwort“:

Auch in diesem Experiment wurden die Lymphknotenzellen aus nicht immunisierten versus immunisierten Tieren verglichen.

Die anschließende quantitative Analyse ergab eine, im Vergleich zu den Kontrolltieren, vierfach erhöhte Frequenz Interferon- γ -sezernierender Zellen in den drainierenden Lymphknoten von mit gpMBP immunisierten Tieren. Auch die Frequenz der IFN- γ Sekretion fiel nach ConA Stimulation bei Zellen aus immunisierten Tieren höher aus als bei Zellen, die aus nicht immunisierten Tieren stammten (Abb. 27).

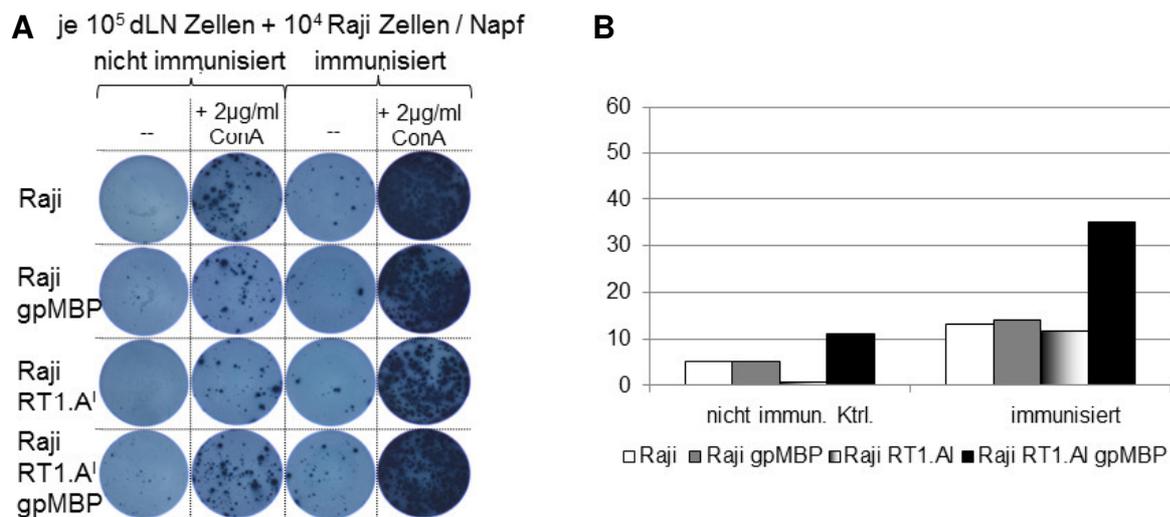


Abbildung 27: Detektion von gpMBP-spezifischen Interferon- γ -sezernierenden CD8⁺ T-Zellen in den drainierenden Lymphknoten von immunisierten Lewis Ratten (Camara et al., 2013). Vergleich zwischen immunisierten und nicht immunisierten Tieren. Am Tag 10 nach Immunisierung wurden die Lymphknotenzellen mit nicht transduzierten Rajizellen bzw. mit Rajizellen, die zuvor retroviral mit RT1.A^I, gpMBP oder RT1.A^I plus gpMBP transduziert wurden, kokultiviert. (A) Näpfe der ELISpot-Platte mit ConA Kontrollen. (B) Diagramm der ausgezählten Spots. Nicht dargestellt sind die ConA Kontrollen (Camara et al., 2013).

In einem zweiten Experiment wurden drainierende vs. nicht drainierende Lymphknoten von immunisierten Tieren verglichen.

Hier konnte in den drainierenden Lymphknoten eine doppelt so hohe Frequenz Interferon- γ -sezernierender Zellen gemessen werden als in den nicht-drainierenden Lymphknoten des gleichen immunisierten Tieres (Abb. 28). Bei den

Frequenzen der IFN- γ Sekretion nach ConA Stimulation konnten keine Unterschiede zwischen den analysierten Zellen beobachtet werden.

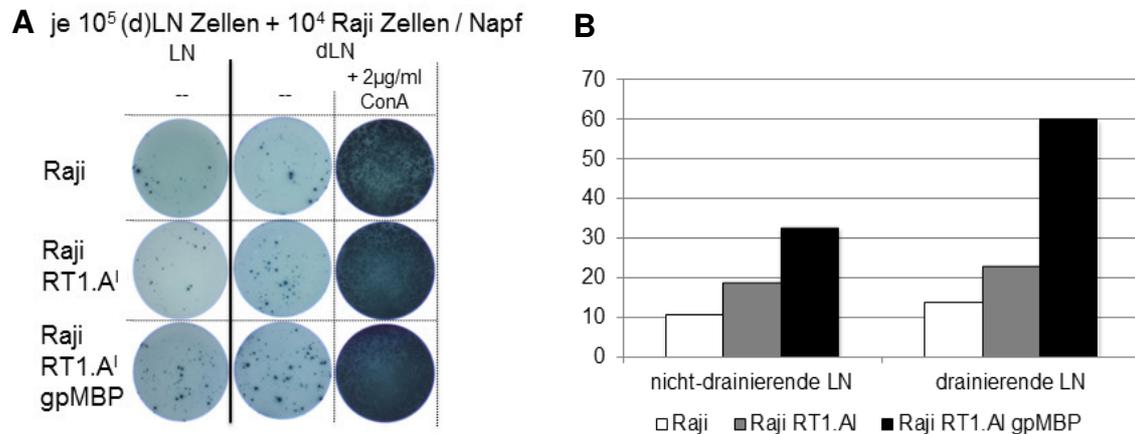


Abbildung 28: Detektion von gpMBP-spezifischen Interferon- γ -sezernierenden CD8⁺ T-Zellen in den drainierenden Lymphknoten von immunisierten Lewis-Ratten. Vergleich zwischen drainierenden und nicht drainierenden Lymphknoten (Camara et al., 2013). Die Kokultur von Stimulatorzellen und Effektorzellen erfolgte unter den gleichen Bedingungen wie in Abb. 27 beschrieben. (A) Näpfe der ELISpot-Platte mit ConA Kontrolle. Für die LN Zellen sahen die ConA Kontrollen aus, wie für die Zellen der dLN, weshalb sie nicht extra abgebildet wurden. (B) Diagramm der ausgezählten Spots. Nicht dargestellt sind die ConA Kontrollen (Camara et al., 2013).

Zusammengefasst deuten diese Ergebnisse eindeutig daraufhin, dass während der Induktionsphase der EAE gpMBP-spezifische CD8⁺ T-Zellen aktiviert und zur Sekretion von Interferon- γ angetrieben werden.

6.6.2 Detektion von gpMBP-spezifischen CD8⁺ T-Zellen in Lewis-Ratten mittels Durchflusszytometrie

In einem nächsten Schritt wurde versucht, auf direktem Wege gpMBP-spezifische CD8⁺ T-Zellen in den immunisierten Tieren nachzuweisen. Hierzu wurden sogenannte RT1.A^I-Ig Dimere generiert.

MHC-Ig Dimere sind ein geeignetes Werkzeug, um antigenspezifische T-Zellen zu detektieren und zu visualisieren. Gelöste RT1.A^I-Ig Fusionsproteine wurden generiert, indem die cDNA, die für die extrazellulären Domänen α 1- α 3 des RT1.A^I-Moleküls kodiert in Leserichtung an das 5'-Ende des Gens für die schwere Kette eines Immunglobulins G1 der Maus in einen pXlg Expressionsvektor kloniert wurde (Schneck et al., 2000). Das Plasmid wurde in J558L-Zellen (Maus-B-Zell Myelom) eingebracht, die selbst nur leichte λ Ketten bilden können. Zusätzlich enthielten die Zellen ein Plasmid, das für Lewis-Ratten β 2-Mikroglobulin kodiert (Monzon-Casanova et al., 2012). Die sich bildenden Moleküle setzten sich aus den leichten λ Ketten und den schweren Ketten des IgG1-Moleküls, denen zwei RT1.A^I-

Moleküle folgen, zusammen (Abb. 30-I). Stabilisiert wurden die RT1.A^I-Moleküle durch die zusätzliche Expression von β 2-Mikroglobulin in den Zellen.

Nach Aufreinigung der RT1.A^I-Ig Dimere aus dem Überstand von J558L-Kulturen wurden diese mit unterschiedlichen gpMBP-Peptiden beladen (Abb. 30-I). Dazu wurden fünf Peptide aus der Aminosäuresequenz des gpMBP-Proteins ausgewählt (Abb. 29), die nach Reizis et al. (Reizis et al., 1997) das Potential haben sollten, effizient in der Peptidbindetasche der RT1.A^I-Moleküle zu binden.

MASQKRPSQR ¹⁰	HGSKYLATAS ²⁰	TMDHARHGFL ³⁰	PRHRDTGILD ⁴⁰	SIGRFFGSDR ⁵⁰	AAPKRGSGKD ⁶⁰
SHHAARTTHY ⁷⁰	GSLPQKSQRS ⁸⁰	QDENPVVHFF ⁹⁰	KNIVTPRTPP ¹⁰⁰	PSQGKGRGLS ¹¹⁰	LSRFSWGAEG ¹²⁰
QKPGFGYGGR ¹³⁰	ADYKSKGFKG ¹⁴⁰	AHDAQGTLTK ¹⁵⁰	IFKLGGDRSR ¹⁶⁰	SGSPMARR ¹⁷⁰	
gpMBP125-133		gpMBP146-154			

Abbildung 29: gpMBP-Sequenz (ENSCPOT0000008506 von Ensembl Genome Browser). Getestete Peptide sind eingezeichnet.

Zur Detektion des am besten geeigneten Peptids wurden Lewis-Ratten mit gpMBP in CFA immunisiert und am Tag 10 die drainierenden Lymphknoten entnommen. Je 2×10^6 Gesamtlymphknotenzellen wurde mit RT1.A^I-Ig Dimeren inkubiert, die jeweils mit einem der gpMBP-Peptide beladen worden waren oder aber als Negativkontrolle unbeladen blieben (Abb. 30-II). Im Anschluss an die Inkubation wurden die Ansätze mit FACS-Puffer gewaschen und mit polyklonalen anti-Maus IgG Antikörpern zur Detektion der RT1.A^I-Ig Dimere inkubiert. Nach einem Blockschritt mit normalem Mausserum wurden die Lymphknotenzellen mit mAk mit Spezifität für CD4 und CD8 angefärbt (Abb. 30-III) und im FACS analysiert.

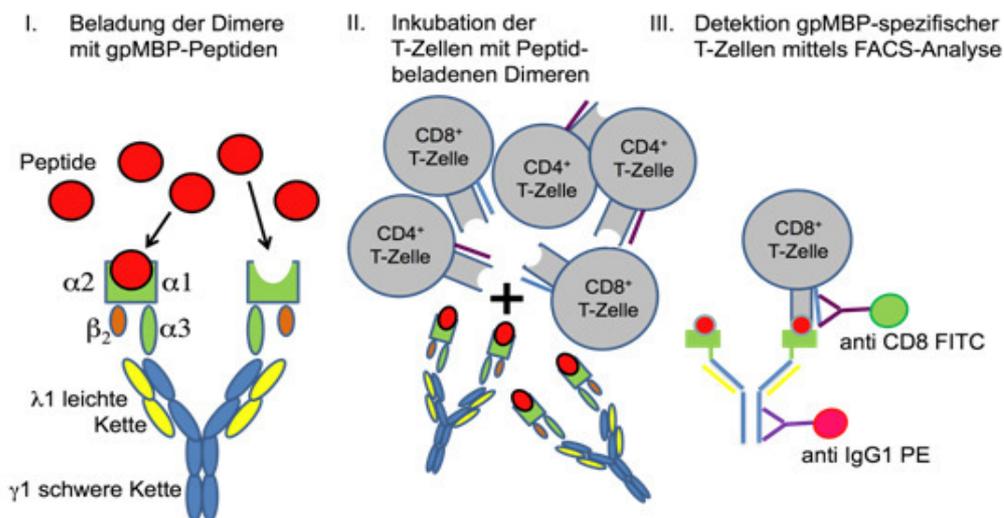


Abbildung 30: Schematische Übersicht der Schritte zur Detektion von gpMBP-spezifischen CD8⁺ T-Zellen.

Von den 5 eingesetzten Peptiden zeigte das Peptid gpMBP₁₂₅₋₁₃₃ die beste Reaktivität (Abb. 31A) und wurde deshalb in den weiteren Experimenten eingesetzt.

Als Nächstes wurden Lewis-Ratten mit gpMBP immunisiert und die Lymphknotenzellen aus den drainierenden Lymphknoten zu unterschiedlichen Zeiten nach Immunisierung isoliert. Die Zellen wurden anschließend mit den RT1.A^I-Ig Dimeren, welche zuvor mit dem Peptid gpMBP₁₂₅₋₁₃₃ beladen worden waren, inkubiert und anschließend mit Antikörpern spezifisch für CD4, CD8 und IgG gefärbt. Die Analyse im zeitlichen Verlauf erbrachte dabei eine klar erhöhte Frequenz gpMBP-spezifischer CD8⁺ T-Zellen am Tag 10 nach Immunisierung im Vergleich zu Tag 0 (Abb. 31B).

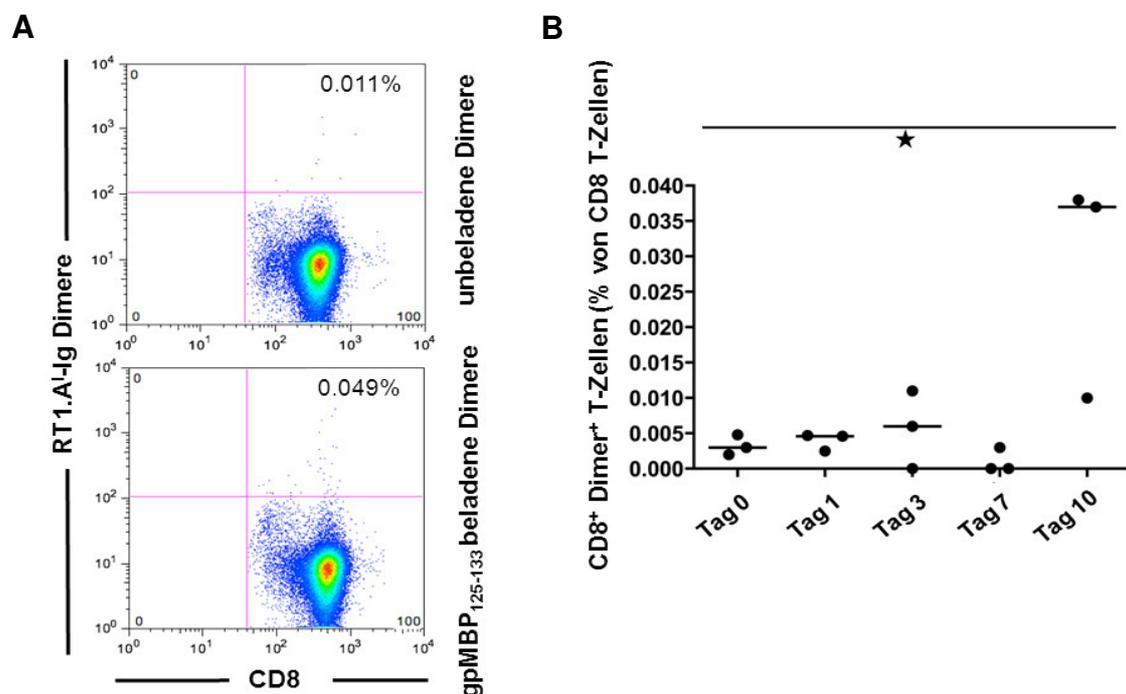


Abbildung 31: Detektion von gpMBP-spezifischen CD8⁺ T-Zellen durch FACS-Analysen (Camara et al., 2013). (A) Repräsentativer Dotplot von CD8⁺ T-Zellen, die unbeladene bzw. mit gpMBP₁₂₅₋₁₃₃ beladene RT1.A^I-Ig Dimere erkannt haben. (B) Kinetik von gpMBP-spezifischen CD8⁺ T-Zellen nach der Immunisierung mit gpMBP. An jedem der dargestellten Zeitpunkte wurden jeweils drei Lewis-Ratten analysiert. Die Prozentangaben auf der Y-Achse stehen für die Frequenzen an CD8⁺ T-Zellen, die gpMBP₁₂₅₋₁₃₃ beladene RT1.A^I-Ig Dimere erkannt haben, minus der Frequenz der Erkennung von unbeladenden RT1.A^I-Ig Dimeren. Der einseitige Mann-Whitney Test zeigte einen signifikanten Unterschied für den Tag 0 verglichen mit dem Tag 10.

Diese Resultate zeigen, dass durch die Immunisierung mit gpMBP in CFA, auch myelinspezifische CD8⁺ T-Zellen in der Peripherie aktiviert werden, die mit den von uns generierten Dimeren *ex vivo* mittels FACS-Analyse detektiert werden können. Sie sind somit ein geeignetes Tool, CD8⁺ T-Zell vermittelte Immunreaktionen im Verlauf der EAE genauer zu untersuchen.

7 DISKUSSION

Viele in der Vergangenheit durchgeführte Studien haben wesentlich zu einem besseren Verständnis der Rolle der CD8⁺ T-Zellen in der Pathogenese der Multiplen Sklerose beigetragen. Die Analysen erbrachten, dass die CD8⁺ T-Zellen zumeist mit einer zytotoxischen Funktion in Zusammenhang stehen. Gezeigt wurde, dass CD8⁺ T-Zellen u.a. in den Läsionen von MS-Patienten klonal expandiert vorliegen und viele Zellen des ZNS Peptide im Kontext von MHC I Molekülen den CD8⁺ T-Zellen präsentieren können (Zuzulya und Wiendl, 2008). Ferner wurde *in vitro* nachgewiesen, dass zytotoxische CD8⁺ T-Zellen potentiell in der Lage sind, neuronale Zellen gezielt abzutöten (Neumann et al., 2002). Die Bedeutung der CD8⁺ T-Zellen während der Induktionsphase der Erkrankung außerhalb des ZNS ist jedoch weitgehend ungeklärt. Neben den Erkenntnissen, die durch Untersuchungen von MS-Patienten bzw. deren T-Zellen gewonnen werden, tragen insbesondere Tiermodelle dazu bei, funktionelle Eigenschaften von Zellsubpopulationen aufzuklären. Als ein gängiges Tiermodell für die Multiple Sklerose existiert die Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis (EAE), die z.B. in Mäusen, Ratten oder Affen induziert werden kann (Wekerle, 2008). In der aktiven EAE der Lewis-Ratte wurde zunächst untersucht, ob die Abwesenheit von CD8⁺ T-Zellen mit der Krankheitsaktivität interferiert. Unsere Ergebnisse sprechen dafür, dass CD8⁺ T-Zellen eine essentielle Rolle in sekundären lymphoiden Organen während der Induktionsphase der EAE spielen, indem sie die Differenzierung von myelinspezifischen CD4⁺ T-Zellen in Richtung ZNS-infiltrierender Effektor T-Zellen fördern. So führte die Depletion der CD8⁺ T-Zellen nach einmaliger Applikation des CD8 α -spezifischen monoklonalen Antikörpers OX8 zu einer signifikant reduzierten Krankheitsaktivität der EAE. Das Ausmaß des Schutzes vor der EAE in den CD8-depletierten Tieren variierte zwischen den einzelnen Experimenten und war am stärksten ausgeprägt, wenn die Krankheitsaktivität in den nicht depletierten Kontrolltieren relativ mild ausfiel (EAE-Score 5-6 von maximal 10). Der Schutz vor der EAE in den CD8-depletierten Tieren fiel allerdings nur marginal aus, wenn die Kontrolltiere eine sehr stark ausgeprägte EAE (Score 7-8) entwickelten. Diese Beobachtungen legen die Vermutung nahe, dass gpMBP-spezifische CD4⁺ T-Zellen zumindest unter bestimmten Bedingungen die Hilfe von CD8⁺ T-Zellen für die Induktion einer EAE benötigen. Ferner kann man annehmen, dass bei einer fulminant verlaufenden EAE myelinspezifische CD4⁺ T-Zellen so stark aktiviert werden, dass sie die Erkrankung auch in Abwesenheit von CD8⁺ Zellen induzieren können. Dies wiederum könnte erklären, warum andere Arbeitsgruppen (Sedgwick, 1988; Lohse et al. 1995) keine Evidenz für eine Rolle von CD8⁺ T-Zellen hinsichtlich der Immunpathogenese der EAE in der Lewis-Ratte erbringen konnten.

Der in den bisherigen Experimenten eingesetzte mAk OX8 ist gegen CD8 α gerichtet, welches auch von Monozyten, dendritischen Zellen, NK-Zellen und einem Teil der $\gamma\delta$ T-Zellen exprimiert wird. Zusätzlich ist CD8 α im Menschen

(Paliard et al., 1988; Parel und Chizzolini, 2004) und in der Lewis-Ratte (Torres-Nagel et al., 1992;

Kenny, Ramirez et al., JI 2000 und EJI 2004), nicht aber der Maus, insbesondere auch auf aktivierten CD4⁺ T-Zellen zu finden. Somit könnte die nach Applikation von OX8 beobachtete Reduktion der Krankheitsaktivität nicht ausschließlich auf die Depletion der CD8⁺ T-Zellen zurückzuführen sein. Daher wurde in einer weiteren Reihe von Experimenten der monoklonale Antikörper 341 mit Spezifität für CD8 β eingesetzt (Torres-Nagel et al., 1992). Dieser Antikörper bindet an CD8⁺ T-Zellen sowie eine Subpopulation der $\gamma\delta$ -T-Zellen. Von ihm war bisher bekannt, dass er in gemischten Lymphozytenkulturen und Zytotoxizitätstest eine blockierende Funktion besitzt (Torres-Nagel et al., 1992). Zusätzlich konnte im Rahmen dieser Arbeit erstmals gezeigt werden, dass der Antikörper *in vivo* eine Depletion der CD8⁺ T-Zellen bewirkt, die mit den depletierenden Eigenschaften des mAk OX8 vergleichbar ist. Auch die Applikation des mAk 341 bewirkte eine im Vergleich zu den Kontrolltieren deutlich reduzierte Krankheitsaktivität. Dieses Ergebnis untermauerte somit, dass CD8⁺ T-Zellen in der Tat eine substantielle Rolle in der aktiven EAE der Lewis-Ratte spielen. Nichtsdestoweniger kann nicht ausgeschlossen werden, dass die mAk OX8 und 341 neben der Depletion von CD8⁺ T-Zellen zusätzliche Off-Target-Effekte ausüben. So konnte kürzlich gezeigt werden, dass nach *in vivo* Applikation eines CD3-spezifischen monoklonalen Antikörpers T-Zellen in die Apoptose getrieben wurden und daraufhin von Makrophagen und dendritischen Zellen phagozytiert wurden. Infolgedessen produzierten diese Zellen große Mengen antiinflammatorischer Zytokine (vor allem TGF- β), was in den antikörperbehandelten Tieren zu einer lange anhaltenden Toleranz führte (Perruche et al., 2008).

Um solche potenziellen Bystander-Effekte der eingesetzten monoklonalen Antikörper zu umgehen, wurden weitere Experimente durchgeführt, in denen CD8 knock-out Ratten eingesetzt wurden (Taurog et al., 2009). Diese Tiere tragen eine Punktmutation in der CD8 α -Kette mit der Folge, dass sowohl die Proteine CD8 α als auch CD8 β weder intrazellulär noch auf der Zelloberfläche detektiert werden können. Neben dieser phänotypischen Charakterisierung zeigten weiterführende funktionelle Analysen in den Tieren zusätzlich ein Ausbleiben jeglicher zytotoxischer Aktivität von CD8⁺ T-Zellen. Schließlich führte die Induktion einer aktiven EAE in den CD8 knock-out Lewis Ratten zu einer ähnlich stark reduzierten Krankheitsaktivität, wie sie bereits zuvor in den CD8-depletierten Ratten beobachtet wurde. Dieses Ergebnis bekräftigt somit die Hypothese, dass die nach Applikation der mAk OX8 bzw. 341 beobachtete Reduktion der Krankheitsaktivität ausschließlich auf die Depletion der CD8⁺ T-Zellen und nicht auf zusätzliche off-Target-Effekte der Antikörper-Behandlung zurückzuführen ist.

In der MS und der EAE beruhen die beobachteten Symptome darauf, dass Zellen des Immunsystems in das ZNS einwandern und dort Entzündungsreaktionen

auslösen. Durch immunhistochemische Färbungen mit spezifischen Antikörpern lassen sich Subpopulationen innerhalb der eingewanderten Zellen und deren Anzahl ermitteln. Die immunhistochemische Analyse des Rückenmarks der CD8-

defizienten EAE-Tiere erbrachte eine im Vergleich zu den Kontrolltieren deutlich reduzierte Anzahl an T-Zellen und Makrophagen. FACS-Analysen zeigten, dass im ZNS nach Depletion von CD8⁺ T-Zellen im Vergleich zum ZNS von Kontrolltieren insbesondere CD4⁺ T-Zellen in ihrer Frequenz um die Hälfte reduziert sind. Dies könnte zum einen auf eine reduzierte Infiltration von voll ausdifferenzierten Effektor-T-Zellen in das ZNS der Tiere zurückzuführen sein. Alternativ könnte eine durch Apoptose bedingte Zerstörung von autoreaktiven T-Zellen in den entzündlichen ZNS-Läsionen für die reduzierte T-Zellzahl im Rückenmark verantwortlich sein. Ein solches Phänomen wurde zum Beispiel im Rahmen einer Antigen Therapie der EAE beobachtet. Für diese Therapie wurden den Tieren hohe Antigendosen am Tag 3 nach Adoptivem Transfer von enzephalitogenen CD4⁺ T-Zellen appliziert. Daraufhin konnte beobachtet werden, dass in den Tieren, die mit hohen gpMBP Konzentrationen behandelt waren, im Vergleich zu den mit PBS behandelten Kontrolltieren, spezifisch enzephalitogene T-Zellen im ZNS eliminiert wurden, nicht aber nicht-enzephalitogene T-Zellen (Tischner et al., 2007). Die Tatsache, dass (i) die Bluthirnschranke in den CD8-depletierten Tieren intakt blieb und (ii) keine apoptotischen T-Zellen im ZNS dieser Tiere detektiert werden konnten, spricht sehr dafür, dass myelinspezifische CD4⁺ T-Zellen in Abwesenheit von CD8⁺ T-Zellen nicht im ZNS absterben, sondern vielmehr daran gehindert werden, in das Zielorgan einzuwandern.

Myelinspezifische CD4⁺ T-Zellen können sowohl bei gesunden Menschen (Pette et al., 1990; Goverman, 2011; Elong Ngonu et al., 2012) als auch in der Ratte (Schluesener und Wekerle, 1985; Goverman, 2011) außerhalb des ZNS detektiert werden. Studien in unterschiedlichen Tiermodellen legen die Vermutung nahe, dass diese T-Zellen mittels verschiedener Mechanismen der peripheren Toleranz in einem Ruhezustand verbleiben (Goverman, 2011). Dies kann zum Beispiel durch die Unterdrückung autoreaktiver T-Zellen durch regulatorische T-Zellen geschehen (Zhang et al., 2004). Die Durchbrechung der Toleranz führt dagegen zur Aktivierung dieser T-Zellen, zu deren Differenzierung in Richtung Effektorzellen und schließlich zur Infiltration in das ZNS. Die Ergebnisse dieser Arbeit legen den Schluss nahe, dass bei der aktiven EAE myelinspezifische CD4⁺ T-Zellen in Abwesenheit von CD8⁺ T-Zellen jedoch nicht ausreichend aktiviert werden können und/oder nicht effizient zu Effektorzellen differenzieren und letztendlich nicht in das ZNS eindringen können. Auf der anderen Seite sollte der adoptive Transfer von *ex vivo* voll ausdifferenzierten enzephalitogenen CD4⁺ T-Zellen in den Empfängertieren eine EAE induzieren, und zwar unabhängig von der Anwesenheit oder Abwesenheit der CD8⁺ T-Zellen in diesen Tieren. Diese Annahme konnte durch unsere Studien in der AT-EAE der Lewis Ratte untermauert werden. So

entwickelten sowohl CD8-defiziente als auch normale Empfängertiere eine gleich stark ausgeprägte Krankheitsaktivität einer AT-EAE.

Neben einer intakten Bluthirnschranke könnten auch andere immunologische Vorgänge außerhalb des ZNS für die reduzierte Infiltration von CD4⁺ T-Zellen in das ZNS der CD8-defizienten Tiere verantwortlich sein. So könnte man spekulieren, dass die Abwesenheit von CD8⁺ T-Zellen das Überleben oder die Funktion der gpMBP-spezifischen CD4⁺ T-Zellen in peripheren lymphoiden Organen beeinträchtigt. Diese Annahme wurde durch das Ergebnis bekräftigt, dass gpMBP-spezifische CD4⁺ T-Zellen in den drainierenden Lymphknoten von CD8-defizienten Tieren zwar vorhanden sind und sogar nach Immunisierung mit gpMBP expandieren, jedoch nicht zu Interferon- γ -sezernierenden Effektorzellen differenzieren können. Bezogen auf unser experimentelles System deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass eine Interaktion zwischen myelinspezifischen CD4⁺ T-Zellen und CD8⁺ T-Zellen in der Peripherie für eine effiziente Induktion einer EAE nötig ist. Diese Hypothese wird unterstützt durch eine kürzlich publizierte Studie in einem Mausmodell der EAE (Huber et al., 2013). Hier konnte gezeigt werden, dass die Kooperation von IL-17-produzierenden CD8⁺ T-Zellen mit CD4⁺ T-Zellen für eine effiziente Induktion der Erkrankung nötig ist. Passend zur Interpretation unserer Ergebnisse konnte zudem im Tiermodell der Toxoplasmose gezeigt werden, dass die Interferon- γ -Produktion durch NK-Zellen essentiell für die TH1-Differenzierung von CD4⁺ T-Zellen ist (Goldszmid et al., 2007). IFN- γ ist ein Leitzytokin, welches in CD4⁺ T-Zellen über die Induktion des Transkriptionsfaktors T-bet die Ausdifferenzierung der Zellen in Richtung der TH1-Zellen bewirkt (Afkarian et al., 2002). Man könnte sich somit vorstellen, dass in unserem experimentellen System die Interferon- γ -Produktion durch CD8⁺ T-Zellen essentiell ist für die TH1-Differenzierung von myelinspezifischen CD4⁺ T-Zellen. Unsere Ergebnisse sprechen eindeutig für diese Hypothese: So konnte gezeigt werden, dass CD8⁺ T-Zellen zu einem sehr frühen Zeitpunkt nach Immunisierung mit gpMBP nicht nur proliferieren, sondern auch zur Produktion von Interferon- γ angetrieben werden. Mittels ELISpot-Analyse konnten zudem Interferon- γ -sezernierende gpMBP-spezifische CD8⁺ T-Zellen während der Induktionsphase der EAE nachgewiesen werden. Schließlich gelang uns über die Generierung von RT1.A¹-Ig Dimeren der direkte *ex vivo* Nachweis von gpMBP-spezifischen CD8⁺ T-Zellen. In einer kinetischen Studie zeigten am Tag 10 nach Immunisierung aus den drainierenden Lymphknoten isolierte CD8⁺ T-Zellen im Vergleich zu Zellen, die am Tag 0 gemessen wurden, eine höhere Frequenz an Zellen mit Spezifität für gpMBP₁₂₅₋₁₃₃. Dieses Ergebnis spricht für eine Expansion gpMBP-spezifischer CD8⁺ T-Zellen außerhalb des ZNS nach Immunisierung und untermauert zusätzlich unsere Hypothese, dass CD8⁺ T-Zellen während der Induktionsphase der EAE in der Peripherie eine Rolle spielen.

Aufgrund der im Rahmen dieser Arbeit erbrachten Ergebnisse wird das in Abb. 32 dargestellte Modell der Interaktion zwischen CD4⁺ T-Zellen und CD8⁺ T-Zellen während der Induktionsphase der EAE vorgeschlagen:

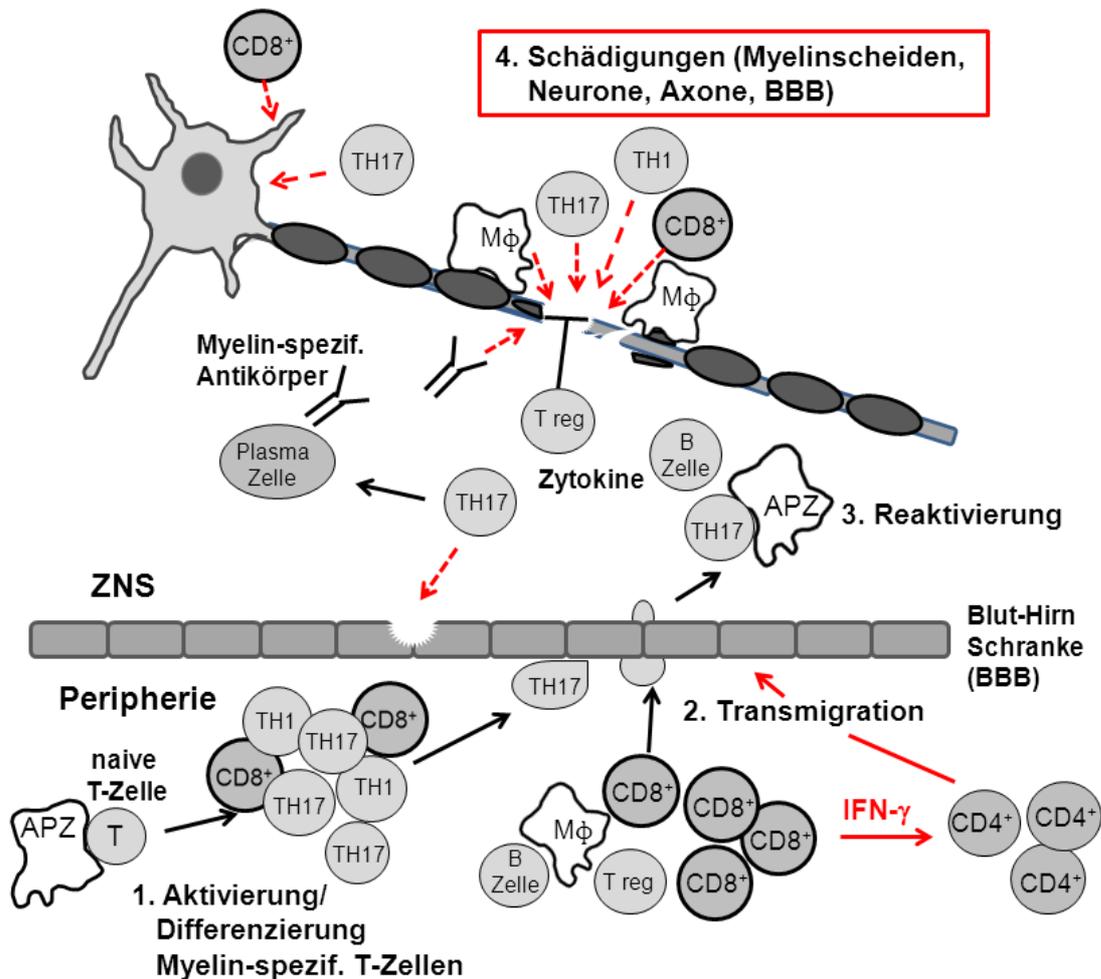


Abbildung 32: Modelldarstellung der Interaktion zwischen CD8⁺ und CD4⁺ T-Zellen in peripheren lymphoiden Organen. CD8⁺ T-Zellen könnten über IFN-γ mit CD4⁺ T-Zellen kommunizieren, wodurch diese zu reifen enzephalitogenen CD4⁺ T-Zellen ausdifferenzieren und in das ZNS einwandern können (nach Aktas et al., 2006, genehmigt durch SAGE Publications).

Es bleibt offen, ob CD8⁺ T-Zellen auch bei der Multiplen Sklerose des Menschen eine ähnliche Helferfunktion auf autoreaktive CD4⁺ T-Zellen ausüben. Sollte dies der Fall sein, könnten neue immunotherapeutische Strategien entwickelt werden. Diese müssen dann direkt die Zytokin-vermittelte Helferfunktion unterbinden, ohne jedoch die Funktionen von CD8⁺ T-Zellen zu beeinträchtigen, die für die Kontrolle von latenten und de novo erworbenen viralen Infektionen des ZNS benötigt werden.

8 LITERATURVERZEICHNIS

Afkarian M, Sedy JR, Yang J, Jacobson NG, Cereb N, Yang SY, et al. T-bet is a STAT1-induced regulator of IL-12R expression in naive CD4+ T cells. *Nat Immunol* 2002;3(6):549-57.

Aktas O, Prozorovski T, Zipp F. Death ligands and autoimmune demyelination. *Neuroscientist* 2006;12(4):305-16.

Allegretta M, Nicklas JA, Sriram S, Albertini RJ. T cells responsive to myelin basic protein in patients with multiple sclerosis. *Science* 1990;247(4943):718-21.

Anderson G, Takahama Y. Thymic epithelial cells: working class heroes for T cell development and repertoire selection. *Trends Immunol* 2012;33(6):256-63.

Anderson MS, Venanzi ES, Klein L, Chen Z, Berzins SP, Turley SJ, et al. Projection of an immunological self shadow within the thymus by the aire protein. *Science* 2002;298(5597):1395-401.

Ando DG, Clayton J, Kono D, Urban JL, Sercarz EE. Encephalitogenic T cells in the B10.PL model of experimental allergic encephalomyelitis (EAE) are of the Th-1 lymphokine subtype. *Cell Immunol.* 1989 Nov;124(1):132-43.

André S, Tough DF, Lacroix-Desmazes S, Kaveri SV, Bayry J. Surveillance of antigen-presenting cells by CD4+ CD25+ regulatory T cells in autoimmunity: immunopathogenesis and therapeutic implications. *Am J Pathol.* 2009 May;174(5):1575-87.

Babbe H, Roers A, Waisman A, Lassmann H, Goebels N, Hohlfeld R, et al. Clonal expansions of CD8(+) T cells dominate the T cell infiltrate in active multiple sclerosis lesions as shown by micromanipulation and single cell polymerase chain reaction. *J Exp Med* 2000;192(3):393-404.

Bahbouhi B, Pettre S, Berthelot L, Garcia A, Elong Ngono A, Degauque N, et al. T cell recognition of self-antigen presenting cells by protein transfer assay reveals a high frequency of anti-myelin T cells in multiple sclerosis. *Brain* 2010;133(Pt 6):1622-36.

Barnett MH, Sutton I. The pathology of multiple sclerosis: a paradigm shift. *Curr Opin Neurol* 2006;19(3):242-7.

Beeton C, Garcia A, Chandy KG. Induction and clinical scoring of chronic-relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Vis Exp* 2007(5):224.

Ben-Nun A, Wekerle H, Cohen IR. Vaccination against autoimmune encephalomyelitis with T-lymphocyte line cells reactive against myelin basic protein. *Nature* 1981;292(5818):60-1.

Bennett CL, Christie J, Ramsdell F, Brunkow ME, Ferguson PJ, Whitesell L, et al. The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat Genet* 2001;27(1):20-1.

Bevan DJ, Chisholm PM. Co-expression of CD4 and CD8 molecules and de novo expression of MHC class II antigens on activated rat T cells. *Immunology* 1986;59(4):621-5.

Beyersdorf N, Gaupp S, Balbach K, Schmidt J, Toyka KV, Lin CH, Hanke T, Hünig T, Kerkau T, Gold R. Selective targeting of regulatory T cells with CD28 superagonists allows effective therapy of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med* 2005 Aug 1;202(3):445-55.

Bitsch A, Schuchardt J, Bunkowski S, Kuhlmann T, Bruck W. Acute axonal injury in multiple sclerosis. Correlation with demyelination and inflammation. *Brain* 2000;123 (Pt 6):1174-83.

Bouneaud C, Kourilsky P, Bousso P. Impact of negative selection on the T cell repertoire reactive to a self-peptide: a large fraction of T cell clones escapes clonal deletion. *Immunity* 2000;13(6):829-40.

Bretscher PA. A two-step, two-signal model for the primary activation of precursor helper T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96(1):185-90.

Brideau RJ, Carter PB, McMaster WR, Mason DW, Williams AF. Two subsets of rat T lymphocytes defined with monoclonal antibodies. *Eur J Immunol* 1980;10(8):609-15.

Brisebois M, Zehntner SP, Estrada J, Owens T, Fournier S. A pathogenic role for CD8+ T cells in a spontaneous model of demyelinating disease. *J Immunol* 2006;177(4):2403-11.

Brucklacher-Waldert V, Stuermer K, Kolster M, Wolthausen J, Tolosa E. Phenotypical and functional characterization of T helper 17 cells in multiple sclerosis. *Brain* 2009;132(Pt 12):3329-41.

Brustle A, Heink S, Huber M, Rosenplanter C, Stadelmann C, Yu P, et al. The development of inflammatory T(H)-17 cells requires interferon-regulatory factor 4. *Nat Immunol* 2007;8(9):958-66.

Burns J, Bartholomew B, Lobo S. Isolation of myelin basic protein-specific T cells predominantly from the memory T-cell compartment in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 1999;45(1):33-9.

Camara M, Beyersdorf N, Fischer HJ, Herold MJ, Ip CW, van den Brandt J, et al. CD8(+) T cell help is required for efficient induction of EAE in Lewis rats. *J Neuroimmunol* 2013;260(1-2):17-27.

Cambier JC, Gauld SB, Merrell KT, Vilen BJ. B-cell anergy: from transgenic models to naturally occurring anergic B cells? *Nat Rev Immunol* 2007;7(8):633-43.

- Cambier JC, Getahun A. B cell activation versus anergy; the antigen receptor as a molecular switch. *Immunol Lett* 2010;128(1):6-7.
- Cantorna MT. Vitamin D and multiple sclerosis: an update. *Nutr Rev* 2008;66(10 Suppl 2):S135-8.
- Cantrell DA, Robins RA, Brooks CG, Baldwin RW. Phenotype of rat natural killer cells defined by monoclonal antibodies marking rat lymphocyte subsets. *Immunology* 1982;45(1):97-103.
- Cao Y, Toben C, Na SY, Stark K, Nitschke L, Peterson A, et al. Induction of experimental autoimmune encephalomyelitis in transgenic mice expressing ovalbumin in oligodendrocytes. *Eur J Immunol* 2006;36(1):207-15.
- Cepok S, Rosche B, Grummel V, Vogel F, Zhou D, Sayn J, et al. Short-lived plasma blasts are the main B cell effector subset during the course of multiple sclerosis. *Brain* 2005;128(Pt 7):1667-76.
- Chen ML, Yan BS, Kozoriz D, Weiner HL. Novel CD8+ Treg suppress EAE by TGF-beta- and IFN-gamma-dependent mechanisms. *Eur J Immunol* 2009;39(12):3423-35.
- Cheng G, Yu A, Malek TR. T-cell tolerance and the multi-functional role of IL-2R signaling in T-regulatory cells. *Immunol Rev* 2011;241(1):63-76.
- Cheng W, Ma Y, Gong F, Hu C, Qian L, Huang Q, et al. Cross-reactivity of autoreactive T cells with MBP and viral antigens in patients with MS. *Front Biosci* 2012;17:1648-58.
- Chervonsky AV. Influence of microbial environment on autoimmunity. *Nat Immunol* 2010;11(1):28-35.
- Cools N, Ponsaerts P, Van Tendeloo VF, Berneman ZN. Regulatory T cells and human disease. *Clin Dev Immunol*. 2007;2007:89195.
- Correale J, Lund B, McMillan M, Ko DY, McCarthy K, Weiner LP. T cell vaccination in secondary progressive multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2000;107(2):130-9.
- Correale J, Ysraelit MC, Gaitan MI. Vitamin D-mediated immune regulation in multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 2011;311(1-2):23-31.
- Cree BA, Rioux JD, McCauley JL, Gourraud PA, Goyette P, McElroy J, et al. A major histocompatibility Class I locus contributes to multiple sclerosis susceptibility independently from HLA-DRB1*15:01. *PLoS One* 2010;5(6):e11296.
- Cua DJ, Sherlock J, Chen Y, Murphy CA, Joyce B, Seymour B, Lucian L, To W, Kwan S, Churakova T, Zurawski S, Wiekowski M, Lira SA, Gorman D, Kastelein RA, Sedgwick JD. Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature* 2003;421(6924):744-8.

Dal Porto J, Johansen TE, Catipović B, Parfiit DJ, Tuveson D, Gether U, Kozlowski S, Fearon DT, Schneck JP. A soluble divalent class I major histocompatibility complex molecule inhibits alloreactive T cells at nanomolar concentrations. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90(14):6671-5.

Dardalhon V, Awasthi A, Kwon H, Galileos G, Gao W, Sobel RA, et al. IL-4 inhibits TGF-beta-induced Foxp3+ T cells and, together with TGF-beta, generates IL-9+ IL-10+ Foxp3(-) effector T cells. *Nat Immunol* 2008;9(12):1347-55.

Das MP, Nicholson LB, Greer JM, Kuchroo VK. Autopathogenic T helper cell type 1 (Th1) and protective Th2 clones differ in their recognition of the autoantigenic peptide of myelin proteolipid protein. *J Exp Med*. 1997;186(6):867-76.

de Graaf KL, Albert M, Weissert R. Autoantigen conformation influences both B- and T-cell responses and encephalitogenicity. *J Biol Chem* 2012;287(21):17206-13.

de Rosbo NK, Ben-Nun A. T-cell responses to myelin antigens in multiple sclerosis; relevance of the predominant autoimmune reactivity to myelin oligodendrocyte glycoprotein. *J Autoimmun* 1998;11(4):287-99.

Deenick EK, Ma CS, Brink R, Tangye SG. Regulation of T follicular helper cell formation and function by antigen presenting cells. *Curr Opin Immunol* 2011;23(1):111-8.

Delogu LG, Deidda S, Delitala G, Manetti R. Infectious diseases and autoimmunity. *J Infect Dev Ctries* 2011;5(10):679-87.

den Haan JM, Lehar SM, Bevan MJ. CD8(+) but not CD8(-) dendritic cells cross-prime cytotoxic T cells in vivo. *J Exp Med* 2000;192(12):1685-96.

Denic A, Wootla B, Rodriguez M. CD8 T cells in multiple sclerosis. *Expert Opin Ther Targets* 2013;17(9):1053-66.

Dressel A, Chin JL, Sette A, Gausling R, Hollsberg P, Hafler DA. Autoantigen recognition by human CD8 T cell clones: enhanced agonist response induced by altered peptide ligands. *J Immunol* 1997;159(10):4943-51.

Edry E, Melamed D. Receptor editing in positive and negative selection of B lymphopoiesis. *J Immunol* 2004;173(7):4265-71.

Elong Ngonu A, Pettré S, Salou M, Bahbouhi B, Soullillou JP, Brouard S, Laplaud DA. Frequency of circulating autoreactive T cells committed to myelin determinants in relapsing-remitting multiple sclerosis patients. *Clin Immunol*. 2012;144(2):117-26.

Engelhardt B. Immune cell entry into the central nervous system: involvement of adhesion molecules and chemokines. *J Neurol Sci* 2008;274(1-2):23-6.

Engelhardt B, Ransohoff RM. The ins and outs of T-lymphocyte trafficking to the CNS: anatomical sites and molecular mechanisms. *Trends Immunol* 2005;26(9):485-95.

Fife BT, Paniagua MC, Lukacs NW, Kunkel SL, Karpus WJ. Selective CC chemokine receptor expression by central nervous system-infiltrating encephalitogenic T cells during experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neurosci Res* 2001;66(4):705-14.

Fischer A, Rieux-Laucat F, Le Deist F. Autoimmune lymphoproliferative syndromes (ALPS): models for the study of peripheral tolerance. *Rev Immunogenet* 2000;2(1):52-60.

Fletcher JM, Lalor SJ, Sweeney CM, Tubridy N, Mills KH. T cells in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *Clin Exp Immunol* 2010;162(1):1-11.

Fletcher JM, Lonergan R, Costelloe L, Kinsella K, Moran B, O'Farrelly C, et al. CD39(+)Foxp3(+) Regulatory T cells suppress pathogenic Th17 cells and are impaired in Multiple Sclerosis. *J Immunol* 2009;183(11):7602-10.

Flugel A, Berkowicz T, Ritter T, Labeur M, Jenne DE, Li Z, et al. Migratory activity and functional changes of green fluorescent effector cells before and during experimental autoimmune encephalomyelitis. *Immunity* 2001;14(5):547-60.

Fontenot JD, Rasmussen JP, Gavin MA, Rudensky AY. A function for interleukin 2 in Foxp3-expressing regulatory T cells. *Nat Immunol* 2005;6(11):1142-51.

Fourneau JM, Bach JM, van Endert PM, Bach JF. The elusive case for a role of mimicry in autoimmune diseases. *Mol Immunol* 2004;40(14-15):1095-102.

Friedline RH, Brown DS, Nguyen H, Kornfeld H, Lee J, Zhang Y, et al. CD4+ regulatory T cells require CTLA-4 for the maintenance of systemic tolerance. *J Exp Med* 2009;206(2):421-34.

Furtado GC, Marcondes MC, Latkowski JA, Tsai J, Wensky A, Lafaille JJ. Swift entry of myelin-specific T lymphocytes into the central nervous system in spontaneous autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 2008;181(7):4648-55.

Gabibov AG, Belogurov AA, Jr., Lomakin YA, Zakharova MY, Avakyan ME, Dubrovskaya VV, et al. Combinatorial antibody library from multiple sclerosis patients reveals antibodies that cross-react with myelin basic protein and EBV antigen. *FASEB J* 2011;25(12):4211-21.

Galea I, Bernardes-Silva M, Forse PA, van Rooijen N, Liblau RS, Perry VH. An antigen-specific pathway for CD8 T cells across the blood-brain barrier. *J Exp Med* 2007;204(9):2023-30.

Gay D, Saunders T, Camper S, Weigert M. Receptor editing: an approach by autoreactive B cells to escape tolerance. *J Exp Med* 1993;177(4):999-1008.

Gazzinelli RT, Wysocka M, Hayashi S, Denkers EY, Hieny S, Caspar P, et al. Parasite-induced IL-12 stimulates early IFN-gamma synthesis and resistance during acute infection with *Toxoplasma gondii*. *J Immunol* 1994;153(6):2533-43.

Gold R, Linington C, Lassmann H. Understanding pathogenesis and therapy of multiple sclerosis via animal models: 70 years of merits and culprits in experimental autoimmune encephalomyelitis research. *Brain* 2006;129(Pt 8):1953-71.

Goldszmid RS, Bafica A, Jankovic D, Feng CG, Caspar P, Winkler-Pickett R, et al. TAP-1 indirectly regulates CD4+ T cell priming in *Toxoplasma gondii* infection by controlling NK cell IFN-gamma production. *J Exp Med* 2007;204(11):2591-602.

Gough SC, Walker LS, Sansom DM. CTLA4 gene polymorphism and autoimmunity. *Immunol Rev* 2005;204:102-15.

Gourraud PA, Harbo HF, Hauser SL, Baranzini SE. The genetics of multiple sclerosis: an up-to-date review. *Immunol Rev* 2012;248(1):87-103.

Goverman J. Autoimmune T cell responses in the central nervous system. *Nat Rev Immunol* 2009;9(6):393-407.

Goverman JM. Immune tolerance in multiple sclerosis. *Immunol Rev* 2011;241(1):228-40.

Green DR, Droin N, Pinkoski M. Activation-induced cell death in T cells. *Immunol Rev* 2003;193:70-81.

Greter M, Heppner FL, Lemos MP, Odermatt BM, Goebels N, Laufer T, et al. Dendritic cells permit immune invasion of the CNS in an animal model of multiple sclerosis. *Nat Med* 2005;11(3):328-34.

Hafler DA, Compston A, Sawcer S, Lander ES, Daly MJ, De Jager PL, et al. Risk alleles for multiple sclerosis identified by a genomewide study. *N Engl J Med* 2007;357(9):851-62.

Hamada H, Garcia-Hernandez Mde L, Reome JB, Misra SK, Strutt TM, McKinstry KK, Cooper AM, Swain SL, Dutton RW. Tc17, a unique subset of CD8 T cells that can protect against lethal influenza challenge. *J Immunol*. 2009;182(6):3469-81.

Harris N, Gause WC. To B or not to B: B cells and the Th2-type immune response to helminths. *Trends Immunol* 2011;32(2):80-88.

Healy BC, Ali EN, Guttman CR, Chitnis T, Glanz BI, Buckle G, et al. Smoking and disease progression in multiple sclerosis. *Arch Neurol* 2009;66(7):858-64.

Hedegaard CJ, Krakauer M, Bendtzen K, Lund H, Sellebjerg F, Nielsen CH. T helper cell type 1 (Th1), Th2 and Th17 responses to myelin basic protein and disease activity in multiple sclerosis. *Immunology* 2008;125(2):161-9.

- Hernan MA, Jick SS, Logroscino G, Olek MJ, Ascherio A, Jick H. Cigarette smoking and the progression of multiple sclerosis. *Brain* 2005;128(Pt 6):1461-5.
- Hoffmann S VK, Mache S, Spallek M, Quarcoo D, Groneberg DA, Uibel S. Multiple Sklerose: Epidemiologie, Pathophysiologie, Diagnostik und Therapie. *Praktische Arbeitsmedizin* 2009;17:9.
- Hoftberger R, Aboul-Enein F, Brueck W, Lucchinetti C, Rodriguez M, Schmidbauer M, et al. Expression of major histocompatibility complex class I molecules on the different cell types in multiple sclerosis lesions. *Brain Pathol* 2004;14(1):43-50.
- Hori S, Sakaguchi S. Foxp3: a critical regulator of the development and function of regulatory T cells. *Microbes Infect.* 2004;6(8):745-51.
- Hori S, Takahashi T, Sakaguchi S. Control of autoimmunity by naturally arising regulatory CD4+ T cells. *Adv Immunol* 2003;81:331-71.
- Hovelmeyer N, Hao Z, Kranidioti K, Kassiotis G, Buch T, Frommer F, et al. Apoptosis of oligodendrocytes via Fas and TNF-R1 is a key event in the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 2005;175(9):5875-84.
- Hsieh CS, Macatonia SE, Tripp CS, Wolf SF, O'Garra A, Murphy KM. Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages. *Science* 1993;260(5107):547-9.
- Hu D, Ikizawa K, Lu L, Sanchirico ME, Shinohara ML, Cantor H. Analysis of regulatory CD8 T cells in Qa-1-deficient mice. *Nat Immunol* 2004;5(5):516-23.
- Huber M, Heink S, Grothe H, Guralnik A, Reinhard K, Elflein K, et al. A Th17-like developmental process leads to CD8(+) Tc17 cells with reduced cytotoxic activity. *Eur J Immunol* 2009;39(7):1716-25.
- Huber M, Heink S, Pagenstecher A, Reinhard K, Ritter J, Visekruna A, et al. IL-17A secretion by CD8+ T cells supports Th17-mediated autoimmune encephalomyelitis. *J Clin Invest* 2013;123(1):247-60.
- Huppert J, Closhen D, Croxford A, White R, Kulig P, Pietrowski E, et al. Cellular mechanisms of IL-17-induced blood-brain barrier disruption. *FASEB J* 2009;24(4):1023-34.
- Huseby ES, Liggitt D, Brabb T, Schnabel B, Ohlen C, Goverman J. A pathogenic role for myelin-specific CD8(+) T cells in a model for multiple sclerosis. *J Exp Med* 2001;194(5):669-76.
- Ivanov II, McKenzie BS, Zhou L, Tadokoro CE, Lepelley A, Lafaille JJ, Cua DJ, Littman DR. The orphan nuclear receptor ROR γ directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. *Cell*. 2006;126(6):1121-33

Jacobsen M, Cepok S, Quak E, Happel M, Gaber R, Ziegler A, et al. Oligoclonal expansion of memory CD8⁺ T cells in cerebrospinal fluid from multiple sclerosis patients. *Brain* 2002;125(Pt 3):538-50.

Jager A, Dardalhon V, Sobel RA, Bettelli E, Kuchroo VK. Th1, Th17, and Th9 effector cells induce experimental autoimmune encephalomyelitis with different pathological phenotypes. *J Immunol* 2009;183(11):7169-77.

Jager A, Kuchroo VK. Effector and regulatory T-cell subsets in autoimmunity and tissue inflammation. *Scand J Immunol* 2010;72(3):173-84.

Jiang H, Braunstein NS, Yu B, Winchester R, Chess L. CD8⁺ T cells control the TH phenotype of MBP-reactive CD4⁺ T cells in EAE mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98(11):6301-6.

Jilek S, Schlupe M, Meylan P, Vingerhoets F, Guignard L, Monney A, et al. Strong EBV-specific CD8⁺ T-cell response in patients with early multiple sclerosis. *Brain* 2008;131(Pt 7):1712-21.

Jilek S, Schlupe M, Rossetti AO, Guignard L, Le Goff G, Pantaleo G, et al. CSF enrichment of highly differentiated CD8⁺ T cells in early multiple sclerosis. *Clin Immunol* 2007;123(1):105-13.

Jones CP, Gregory LG, Causton B, Campbell GA, Lloyd CM. Activin A and TGF- β promote T(H)9 cell-mediated pulmonary allergic pathology. *J Allergy Clin Immunol* 2012;129(4):1000-10 e3.

Jones KH, Jones PA, John A, Middleton RM, Lockhart-Jones H, Peng J, Osborne LA, Noble JG. How People with Multiple Sclerosis Rate Their Quality of Life: An EQ-5D Survey via the UK MS Register. *PLoS One* 2013;8.

Jordan MS, Boesteanu A, Reed AJ, Petrone AL, Hohenbeck AE, Lerman MA, et al. Thymic selection of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells induced by an agonist self-peptide. *Nat Immunol* 2001;2(4):301-6.

Junker A, Ivanidze J, Malotka J, Eiglmeier I, Lassmann H, Wekerle H, et al. Multiple sclerosis: T-cell receptor expression in distinct brain regions. *Brain* 2007;130(Pt 11):2789-99.

Kaplan MH. Th9 cells: differentiation and disease. *Immunol Rev* 2013;252(1):104-15.

Karman J, Ling C, Sandor M, Fabry Z. Initiation of immune responses in brain is promoted by local dendritic cells. *J Immunol* 2004;173(4):2353-61.

Kaushansky N, Eisenstein M, Zilkha-Falb R, Ben-Nun A. The myelin-associated oligodendrocytic basic protein (MOBP) as a relevant primary target autoantigen in multiple sclerosis. *Autoimmun Rev* 2010;9(4):233-6.

Kavvoura FK, Ioannidis JP. CTLA-4 gene polymorphisms and susceptibility to type 1 diabetes mellitus: a HuGE Review and meta-analysis. *Am J Epidemiol* 2005;162(1):3-16.

Kawahata K, Misaki Y, Yamauchi M, Tsunekawa S, Setoguchi K, Miyazaki J, et al. Generation of CD4(+)CD25(+) regulatory T cells from autoreactive T cells simultaneously with their negative selection in the thymus and from nonautoreactive T cells by endogenous TCR expression. *J Immunol* 2002;168(9):4399-405.

Kebir H, Kreymborg K, Ifergan I, Dodelet-Devillers A, Cayrol R, Bernard M, et al. Human TH17 lymphocytes promote blood-brain barrier disruption and central nervous system inflammation. *Nat Med* 2007;13(10):1173-5.

Kenny E, Mason D, Pombo A, Ramírez F. Phenotypic analysis of peripheral CD4+ CD8+ T cells in the rat. *Immunology*. 2000 Oct;101(2):178-84.

Kenny E, Mason D, Saoudi A, Pombo A, Ramírez F. CD8 alpha is an activation marker for a subset of peripheral CD4 T cells. *Eur J Immunol*. 2004 May;34(5):1262-71.

Kim JV, Kang SS, Dustin ML, McGavern DB. Myelomonocytic cell recruitment causes fatal CNS vascular injury during acute viral meningitis. *Nature* 2009;457(7226):191-5.

Kinnunen T, Chamberlain N, Morbach H, Cantaert T, Lynch M, Preston-Hurlburt P, et al. Specific peripheral B cell tolerance defects in patients with multiple sclerosis. *J Clin Invest* 2013;123(6):2737-41.

Klein L, Hinterberger M, Wirnsberger G, Kyewski B. Antigen presentation in the thymus for positive selection and central tolerance induction. *Nature Reviews Immunology* 2009;9(12):833-44.

Kohm AP, Carpentier PA, Anger HA, Miller SD. Cutting edge: CD4+CD25+ regulatory T cells suppress antigen-specific autoreactive immune responses and central nervous system inflammation during active experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 2002;169(9):4712-6.

Komiyama Y, Nakae S, Matsuki T, Nambu A, Ishigame H, Kakuta S, Sudo K, Iwakura Y. IL-17 plays an important role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 2006;177(1):566-73

Kondo T, Takata H, Matsuki F, Takiguchi M. Cutting edge: Phenotypic characterization and differentiation of human CD8+ T cells producing IL-17. *J Immunol* 2009;182(4):1794-8.

Krakauer M, Sorensen P, Khademi M, Olsson T, Sellebjerg F. Increased IL-10 mRNA and IL-23 mRNA expression in multiple sclerosis: interferon-beta treatment increases IL-10 mRNA expression while reducing IL-23 mRNA expression. *Mult Scler* 2008;14(5):622-30.

Krammer PH. CD95's deadly mission in the immune system. *Nature* 2000;407(6805):789-95.

Kuhlmann T, Lingfeld G, Bitsch A, Schuchardt J, Bruck W. Acute axonal damage in multiple sclerosis is most extensive in early disease stages and decreases over time. *Brain* 2002;125(Pt 10):2202-12.

Kurko J, Besenyei T, Laki J, Glant TT, Mikecz K, Szekanecz Z. Genetics of Rheumatoid Arthritis - A Comprehensive Review. *Clin Rev Allergy Immunol* 2013.

Lake J, Weller RO, Phillips MJ, Needham M. Lymphocyte targeting of the brain in adoptive transfer cryolesion-EAE. *J Pathol* 1999;187(2):259-65.

Laky K, Fleischacker C, Fowlkes BJ. TCR and Notch signaling in CD4 and CD8 T-cell development. *Immunol Rev* 2006;209:274-83.

Lang HL, Jacobsen H, Ikemizu S, Andersson C, Harlos K, Madsen L, et al. A functional and structural basis for TCR cross-reactivity in multiple sclerosis. *Nat Immunol* 2002;3(10):940-3.

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(2):233-40.

Lassmann H, Bruck W, Lucchinetti CF. The immunopathology of multiple sclerosis: an overview. *Brain Pathol* 2007;17(2):210-8.

Lawetzky A, Tiefenthaler G, Kubo R, Hunig T. Identification and characterization of rat T cell subpopulations expressing T cell receptors alpha/beta and gamma/delta. *Eur J Immunol* 1990;20(2):343-9.

Lee YH, Ishida Y, Rifa'i M, Shi Z, Isobe K, Suzuki H. Essential role of CD8+CD122+ regulatory T cells in the recovery from experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 2008;180(2):825-32.

Leone MA, Barizzone N, Esposito F, Lucenti A, Harbo HF, Goris A, et al. Association of Genetic Markers with CSF Oligoclonal Bands in Multiple Sclerosis Patients. *PLoS One* 2013;8(6):e64408.

Levings MK, Allan S, d'Hennezel E, Piccirillo CA. Functional dynamics of naturally occurring regulatory T cells in health and autoimmunity. *Adv Immunol* 2006;92:119-55.

Liang HE, Reinhardt RL, Bando JK, Sullivan BM, Ho IC, Locksley RM. Divergent expression patterns of IL-4 and IL-13 define unique functions in allergic immunity. *Nat Immunol*. 2011;13(1):58-66.

Libbey JE, McCoy LL, Fujinami RS. Molecular mimicry in multiple sclerosis. *Int Rev Neurobiol* 2007;79:127-47.

Link J, Kockum I, Lorentzen AR, Lie BA, Celius EG, Westerlind H, et al. Importance of human leukocyte antigen (HLA) class I and II alleles on the risk of multiple sclerosis. *PLoS One* 2012;7(5):e36779.

Lohse AW, Schwerdt A, Herkel J, Spahn T, Meyer zum Buschenfelde KH. Lack of requirement for CD8+ cells in recovery from and resistance to experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Autoimmun* 1995;8(3):395-404.

Lovett-Racke AE, Yang Y, Racke MK. Th1 versus Th17: are T cell cytokines relevant in multiple sclerosis? *Biochim Biophys Acta* 2011;1812(2):246-51.

Lowther DE, Hafler DA. Regulatory T cells in the central nervous system. *Immunol Rev* 2012;248(1):156-69.

Lu L, Kim HJ, Werneck MB, Cantor H. Regulation of CD8+ regulatory T cells: Interruption of the NKG2A-Qa-1 interaction allows robust suppressive activity and resolution of autoimmune disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105(49):19420-5.

Lu Y, Hong S, Li H, Park J, Hong B, Wang L, et al. Th9 cells promote antitumor immune responses in vivo. *J Clin Invest* 2012;122(11):4160-71.

Lublin FD, Reingold SC. Defining the clinical course of multiple sclerosis: results of an international survey. National Multiple Sclerosis Society (USA) Advisory Committee on Clinical Trials of New Agents in Multiple Sclerosis. *Neurology* 1996;46(4):907-11.

Lucas RM, Hughes AM, Lay ML, Ponsonby AL, Dwyer DE, Taylor BV, et al. Epstein-Barr virus and multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2011;82(10):1142-8.

Lucchinetti C, Bruck W, Parisi J, Scheithauer B, Rodriguez M, Lassmann H. Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination. *Ann Neurol* 2000;47(6):707-17.

Lunemann JD, Jelcic I, Roberts S, Lutterotti A, Tackenberg B, Martin R, et al. EBNA1-specific T cells from patients with multiple sclerosis cross react with myelin antigens and co-produce IFN-gamma and IL-2. *J Exp Med* 2008;205(8):1763-73.

Lundblad A, Steller R, Kabat EA, Hirst JW, Weigert MG, Cohn M. Immunochemical studies on mouse myeloma proteins with specificity for dextran or for levan. *Immunochemistry* 1972;9(5):535-44.

Mahnke K, Schmitt E, Bonifaz L, Enk AH, Jonuleit H. Immature, but not inactive: the tolerogenic function of immature dendritic cells. *Immunol Cell Biol* 2002;80(5):477-83.

Malek TR, Yu A, Zhu L, Matsutani T, Adeegbe D, Bayer AL. IL-2 family of cytokines in T regulatory cell development and homeostasis. *J Clin Immunol* 2008;28(6):635-9.

- Mathis D, Benoist C. Aire. *Annu Rev Immunol* 2009;27:287-312.
- Matthews AE, Weiss SR, Paterson Y. Murine hepatitis virus--a model for virus-induced CNS demyelination. *J Neurovirol* 2002;8(2):76-85.
- Matusevicius D, Kivisäkk P, He B, Kostulas N, Ozenci V, Fredrikson S, Link H. Interleukin-17 mRNA expression in blood and CSF mononuclear cells is augmented in multiple sclerosis. *Mult Scler* 1999;5(2):101-4.
- McFarland HF, Martin R. Multiple sclerosis: a complicated picture of autoimmunity. *Nat Immunol* 2007;8(9):913-9.
- McGeachy MJ, Stephens LA, Anderton SM. Natural recovery and protection from autoimmune encephalomyelitis: contribution of CD4+CD25+ regulatory cells within the central nervous system. *J Immunol* 2005;175(5):3025-32.
- Mero IL, Gustavsen MW, Saether HS, Flam ST, Berg-Hansen P, Sondergaard HB, et al. Oligoclonal band status in Scandinavian multiple sclerosis patients is associated with specific genetic risk alleles. *PLoS One* 2013;8(3):e58352.
- Mohme M, Hotz C, Stevanovic S, Binder T, Lee JH, Okoniewski M, et al. HLA-DR15-derived self-peptides are involved in increased autologous T cell proliferation in multiple sclerosis. *Brain* 2013;136(Pt 6):1783-98.
- Monzon-Casanova E, Paletta D, Starick L, Muller I, Sant'Angelo DB, Pyz E, et al. Direct identification of rat iNKT cells reveals remarkable similarities to human iNKT cells and a profound deficiency in LEW rats. *Eur J Immunol* 2012;43(2):404-15.
- Mosmann TR, Coffman RL. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol* 1989;7:145-73
- Najafian N, Chitnis T, Salama AD, Zhu B, Benou C, Yuan X, et al. Regulatory functions of CD8+CD28- T cells in an autoimmune disease model. *J Clin Invest* 2003;112(7):1037-48.
- Nemazee D. Receptor editing in lymphocyte development and central tolerance. *Nat Rev Immunol* 2006;6(10):728-40.
- Neumann H, Medana IM, Bauer J, Lassmann H. Cytotoxic T lymphocytes in autoimmune and degenerative CNS diseases. *Trends Neurosci* 2002;25(6):313-9.
- Nieves J, Cosman F, Herbert J, Shen V, Lindsay R. High prevalence of vitamin D deficiency and reduced bone mass in multiple sclerosis. *Neurology* 1994;44(9):1687-92.
- Ohkura N, Kitagawa Y, Sakaguchi S. Development and maintenance of regulatory T cells. *Immunity* 2013;38(3):414-23.
- Paliard X, Malefijt RW, de Vries JE, Spits H. Interleukin-4 mediates CD8 induction on human CD4+ T-cell clones. *Nature* 1988;335(6191):642-4.

- Palmer E. Negative selection - Clearing out the bad apples from the T-cell repertoire. *Nature Reviews Immunology* 2003;3(5):383-91.
- Pandiyan P, Zheng L, Ishihara S, Reed J, Lenardo MJ. CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4+ T cells. *Nat Immunol* 2007;8(12):1353-62.
- Panitch HS, Hirsch RL, Haley AS, Johnson KP. Exacerbations of multiple sclerosis in patients treated with gamma interferon. *Lancet* 1987;1(8538):893-5.
- Parel Y, Chizzolini C. CD4+ CD8+ double positive (DP) T cells in health and disease. *Autoimmun Rev* 2004;3(3):215-20.
- Perera D, Stankovich J, Butzkueven H, Taylor BV, Foote SJ, Kilpatrick TJ, et al. Fine mapping of multiple sclerosis susceptibility genes provides evidence of allelic heterogeneity at the IL2RA locus. *J Neuroimmunol* 2009;211(1-2):105-9.
- Perruche S, Zhang P, Liu Y, Saas P, Bluestone JA, Chen W. CD3-specific antibody-induced immune tolerance involves transforming growth factor-beta from phagocytes digesting apoptotic T cells. *Nat Med* 2008;14(5):528-35.
- Pette M, Fujita K, Kitz B, Whitaker JN, Albert E, Kappos L, Wekerle H. Myelin basic protein-specific T lymphocyte lines from MS patients and healthy individuals. *Neurology* 1990;40(11):1770-6.
- Pietschmann T, Heinkelein M, Heldmann M, Zentgraf H, Rethwilm A, Lindemann D. Foamy virus capsids require the cognate envelope protein for particle export. *J Virol* 1999;73(4):2613-21.
- Phillips MJ, Needham M, Weller RO. Role of cervical lymph nodes in autoimmune encephalomyelitis in the Lewis rat. *J Pathol* 1997;182(4):457-64.
- Pittet CL, Newcombe J, Antel JP, Arbour N. The majority of infiltrating CD8 T lymphocytes in multiple sclerosis lesions is insensitive to enhanced PD-L1 levels on CNS cells. *Glia* 2011;59(5):841-56.
- Popovich PG, van Rooijen N, Hickey WF, Preidis G, McGaughy V. Hematogenous macrophages express CD8 and distribute to regions of lesion cavitation after spinal cord injury. *Exp Neurol* 2003;182(2):275-87.
- Pouly S, Antel JP, Ladiwala U, Nalbantoglu J, Becher B. Mechanisms of tissue injury in multiple sclerosis: opportunities for neuroprotective therapy. *J Neural Transm Suppl* 2000(58):193-203.
- Purwar R, Schlapbach C, Xiao S, Kang HS, Elyaman W, Jiang X, et al. Robust tumor immunity to melanoma mediated by interleukin-9-producing T cells. *Nat Med* 2012.

Qureshi OS, Zheng Y, Nakamura K, Attridge K, Manzotti C, Schmidt EM, et al. Trans-endocytosis of CD80 and CD86: a molecular basis for the cell-extrinsic function of CTLA-4. *Science* 2011;332(6029):600-3.

Racke MK. Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *Curr Protoc Neurosci* 2001;Chapter 9:Unit9 7.

Reboldi A, Coisne C, Baumjohann D, Benvenuto F, Bottinelli D, Lira S, et al. C-C chemokine receptor 6-regulated entry of TH-17 cells into the CNS through the choroid plexus is required for the initiation of EAE. *Nat Immunol* 2009;10(5):514-23.

Reizis B, Schild H, Stefanovic S, Mor F, Rammensee H, Cohen IR. Peptide binding motifs of the MHC class I molecules (RT1.AI) of the Lewis rat. *Immunogenetics* 1997;45(4):278-9.

Rothhammer V, Heink S, Petermann F, Srivastava R, Claussen MC, Hemmer B, et al. Th17 lymphocytes traffic to the central nervous system independently of alpha4 integrin expression during EAE. *J Exp Med* 2011;208(12):2465-76.

Rottman JB, Slavin AJ, Silva R, Weiner HL, Gerard CG, Hancock WW. Leukocyte recruitment during onset of experimental allergic encephalomyelitis is CCR1 dependent. *Eur J Immunol* 2000;30(8):2372-7.

Sadovnick AD, Ebers GC. Epidemiology of multiple sclerosis: a critical overview. *Can J Neurol Sci* 1993;20(1):17-29.

Saikali P, Antel JP, Newcombe J, Chen Z, Freedman M, Blain M, et al. NKG2D-mediated cytotoxicity toward oligodendrocytes suggests a mechanism for tissue injury in multiple sclerosis. *J Neurosci* 2007;27(5):1220-8.

Sarantopoulos S, Lu L, Cantor H. Qa-1 restriction of CD8+ suppressor T cells. *J Clin Invest* 2004;114(9):1218-21.

Sasaki T, Onodera A, Hosokawa H, Watanabe Y, Horiuchi S, Yamashita J, et al. Genome-Wide Gene Expression Profiling Revealed a Critical Role for GATA3 in the Maintenance of the Th2 Cell Identity. *PLoS One* 2013;8(6):e66468.

Sawcer S, Hellenthal G, Pirinen M, Spencer CC, Patsopoulos NA, Moutsianas L, et al. Genetic risk and a primary role for cell-mediated immune mechanisms in multiple sclerosis. *Nature* 2011;476(7359):214-9.

Saxena A, Bauer J, Scheikl T, Zappulla J, Audebert M, Desbois S, et al. Cutting edge: Multiple sclerosis-like lesions induced by effector CD8 T cells recognizing a sequestered antigen on oligodendrocytes. *J Immunol* 2008;181(3):1617-21.

Schluesener HJ, Wekerle H. Autoaggressive T lymphocyte lines recognizing the encephalitogenic region of myelin basic protein: in vitro selection from unprimed rat T lymphocyte populations. *J Immunol*. 1985;135(5):3128-33.

Schmidt EM, Wang CJ, Ryan GA, Clough LE, Qureshi OS, Goodall M, et al. Ctla-4 controls regulatory T cell peripheral homeostasis and is required for suppression of pancreatic islet autoimmunity. *J Immunol* 2009;182(1):274-82.

Schneck JP. Monitoring antigen-specific T cells using MHC-Ig dimers. *Immunol Invest* 2000;29(2):163-9.

Schwartz RH. T cell anergy. *Annu Rev Immunol* 2003;21:305-34.

Sedgwick JD. Long-term depletion of CD8+ T cells in vivo in the rat: no observed role for CD8+ (cytotoxic/suppressor) cells in the immunoregulation of experimental allergic encephalomyelitis. *Eur J Immunol* 1988;18(4):495-502.

Serafini B, Rosicarelli B, Magliozzi R, Stigliano E, Capello E, Mancardi GL, et al. Dendritic cells in multiple sclerosis lesions: maturation stage, myelin uptake, and interaction with proliferating T cells. *J Neuropathol Exp Neurol* 2006;65(2):124-41.

Shevach EM, McHugh RS, Piccirillo CA, Thornton AM. Control of T-cell activation by CD4+ CD25+ suppressor T cells. *Immunol Rev* 2001;182:58-67.

Shiloh MU, Nathan CF. Reactive nitrogen intermediates and the pathogenesis of Salmonella and mycobacteria. *Curr Opin Microbiol* 2000;3(1):35-42.

Shin T, Ahn M, Matsumoto Y. Mechanism of experimental autoimmune encephalomyelitis in Lewis rats: recent insights from macrophages. *Anat Cell Biol* 2012;45(3):141-8.

Simon KC, van der Mei IA, Munger KL, Ponsonby A, Dickinson J, Dwyer T, et al. Combined effects of smoking, anti-EBNA antibodies, and HLA-DRB1*1501 on multiple sclerosis risk. *Neurology* 2010;74(17):1365-71.

Skulina C, Schmidt S, Dornmair K, Babbe H, Roers A, Rajewsky K, et al. Multiple sclerosis: brain-infiltrating CD8+ T cells persist as clonal expansions in the cerebrospinal fluid and blood. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101(8):2428-33.

Sobottka B, Harrer MD, Ziegler U, Fischer K, Wiendl H, Hunig T, et al. Collateral bystander damage by myelin-directed CD8+ T cells causes axonal loss. *Am J Pathol* 2009;175(3):1160-6.

Sokol CL, Barton GM, Farr AG, Medzhitov R. A mechanism for the initiation of allergen-induced T helper type 2 responses. *Nat Immunol* 2008;9(3):310-8.

Soneoka Y, Cannon PM, Ramsdale EE, Griffiths JC, Romano G, Kingsman SM, Kingsman AJ. A transient three-plasmid expression system for the production of high titer retroviral vectors. *Nucleic Acids Res*. 1995;23(4):628-33.

Sosa RA, Forsthuber TG. The critical role of antigen-presentation-induced cytokine crosstalk in the central nervous system in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Interferon Cytokine Res*. 2011 Oct;31(10):753-68.

Stinissen P, Raus J, Zhang J. Autoimmune pathogenesis of multiple sclerosis: role of autoreactive T lymphocytes and new immunotherapeutic strategies. *Crit Rev Immunol* 1997;17(1):33-75.

Stone KD, Prussin C, Metcalfe DD. IgE, mast cells, basophils, and eosinophils. *J Allergy Clin Immunol* 2010;125(2 Suppl 2):S73-80.

Strasser A, Jost PJ, Nagata S. The many roles of FAS receptor signaling in the immune system. *Immunity* 2009;30(2):180-92.

Sun D, Whitaker JN, Huang Z, Liu D, Coleclough C, Wekerle H, et al. Myelin antigen-specific CD8+ T cells are encephalitogenic and produce severe disease in C57BL/6 mice. *J Immunol* 2001;166(12):7579-87.

Sypek JP, Chung CL, Mayor SE, Subramanyam JM, Goldman SJ, Sieburth DS, et al. Resolution of cutaneous leishmaniasis: interleukin 12 initiates a protective T helper type 1 immune response. *J Exp Med* 1993;177(6):1797-802.

Takahashi T, Tagami T, Yamazaki S, Uede T, Shimizu J, Sakaguchi N, et al. Immunologic self-tolerance maintained by CD25(+)CD4(+) regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. *J Exp Med* 2000;192(2):303-10.

Taurog JD, Dorris ML, Satumtira N, Tran TM, Sharma R, Dressel R, et al. Spondylarthritis in HLA-B27/human beta2-microglobulin-transgenic rats is not prevented by lack of CD8. *Arthritis Rheum* 2009;60(7):1977-84.

Tejada-Simon MV, Zang YC, Hong J, Rivera VM, Zhang JZ. Cross-reactivity with myelin basic protein and human herpesvirus-6 in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2003;53(2):189-97.

Tennakoon DK, Mehta RS, Ortega SB, Bhoj V, Racke MK, Karandikar NJ. Therapeutic induction of regulatory, cytotoxic CD8+ T cells in multiple sclerosis. *J Immunol* 2006;176(11):7119-29.

Tiegs SL, Russell DM, Nemazee D. Receptor editing in self-reactive bone marrow B cells. *J Exp Med* 1993;177(4):1009-20.

Tischner D, Weishaupt A, van den Brandt J, Ip CW, Kerkau T, Gold R, et al. Antigen therapy of experimental autoimmune encephalomyelitis selectively induces apoptosis of pathogenic T cells. *J Neuroimmunol* 2007;183(1-2):146-50.

Torres-Nagel N, Kraus E, Brown MH, Tiefenthaler G, Mitnacht R, Williams AF, et al. Differential thymus dependence of rat CD8 isoform expression. *Eur J Immunol* 1992;22(11):2841-8.

Trikudanathan S, Sayegh MH. The evolution of the immunobiology of co-stimulatory pathways: clinical implications. *Clin Exp Rheumatol* 2007;25(5 Suppl 46):S12-21.

Tsuchida T, Parker KC, Turner RV, McFarland HF, Coligan JE, Biddison WE. Autoreactive CD8+ T-cell responses to human myelin protein-derived peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91(23):10859-63.

Twu YC, Gold MR, Teh HS. TNFR1 delivers pro-survival signals that are required for limiting TNFR2-dependent activation-induced cell death (AICD) in CD8+ T cells. *Eur J Immunol* 2011;41(2):335-44.

Tyler AF, Mendoza JP, Firan M, Karandikar NJ. CD8 T Cells Are Required For Glatiramer Acetate Therapy in Autoimmune Demyelinating Disease. *PLoS One* 2013;8(6):e66772.

Tzartos JS, Friese MA, Craner MJ, Palace J, Newcombe J, Esiri MM, et al. Interleukin-17 production in central nervous system-infiltrating T cells and glial cells is associated with active disease in multiple sclerosis. *Am J Pathol* 2008;172(1):146-55.

Upadhyaya B, Yin Y, Hill BJ, Douek DC, Prussin C. Hierarchical IL-5 expression defines a subpopulation of highly differentiated human Th2 cells. *Immunol* 2011;187(6):3111-20.

van Zwam M, Huizinga R, Melief MJ, Wierenga-Wolf AF, van Meurs M, Voerman JS, et al. Brain antigens in functionally distinct antigen-presenting cell populations in cervical lymph nodes in MS and EAE. *J Mol Med (Berl)* 2009;87(3):273-86.

van Zwam M, Samsom JN, Nieuwenhuis EE, Melief MJ, Wierenga-Wolf AF, Dijke IE, et al. Myelin ingestion alters macrophage antigen-presenting function in vitro and in vivo. *J Leukoc Biol* 2011;90(1):123-32.

Van Amerongen BM, Dijkstra CD, Lips P, Polman CH. Multiple sclerosis and vitamin D: an update. *Eur J Clin Nutr* 2004;58(8):1095-109.

Vartanian T, Li Y, Zhao M, Stefansson K. Interferon-gamma-induced oligodendrocyte cell death: implications for the pathogenesis of multiple sclerosis. *Mol Med* 1995;1(7):732-43.

Vieira PL, Heystek HC, Wormmeester J, Wierenga EA, Kapsenberg ML. Glatiramer acetate (copolymer-1, copaxone) promotes Th2 cell development and increased IL-10 production through modulation of dendritic cells. *J Immunol* 2003;170(9):4483-8.

Viglietta V, Baecher-Allan C, Weiner HL, Hafler DA. Loss of functional suppression by CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. *J Exp Med* 2004;199(7):971-9.

Voehringer D. The role of basophils in helminth infection. *Trends Parasitol* 2009;25(12):551-56.

von Boehmer H. Mechanisms of suppression by suppressor T cells. *Nat Immunol* 2005;6(4):338-44.

Voskuhl RR, Gold SM. Sex-related factors in multiple sclerosis susceptibility and progression. *Nat Rev Neurol* 2012;8(5):255-63.

Wan YY, Flavell RA. Regulatory T-cell functions are subverted and converted owing to attenuated Foxp3 expression. *Nature* 2007;445(7129):766-70.

Wang X, Ma C, Wu J, Zhu J. Roles of T helper 17 cells and interleukin-17 in neuroautoimmune diseases with emphasis on multiple sclerosis and Guillain-Barre syndrome as well as their animal models. *J Neurosci Res* 2013;91(7):871-81.

Weiner HL. Multiple sclerosis is an inflammatory T-cell-mediated autoimmune disease. *Arch Neurol* 2004;61(10):1613-5.

Weishaupt A, Jander S, Bruck W, Kuhlmann T, Stienekemeier M, Hartung T, et al. Molecular mechanisms of high-dose antigen therapy in experimental autoimmune encephalomyelitis: rapid induction of Th1-type cytokines and inducible nitric oxide synthase. *J Immunol* 2000;165(12):7157-63.

Weishaupt A, Kreiss M, Gold R, Herrmann T. Modulation of experimental autoimmune encephalomyelitis by administration of cells expressing antigenic peptide covalently linked to MHC class II. *J Neuroimmunol* 2004;152(1-2):11-9.

Weissert R. The Immune Pathogenesis of Multiple Sclerosis. *J Neuroimmune Pharmacol* 2013.

Wekerle H. Lessons from multiple sclerosis: models, concepts, observations. *Ann Rheum Dis* 2008;67 Suppl 3:iii56-60.

Wekerle H, Hohlfeld R. Molecular mimicry in multiple sclerosis. *N Engl J Med* 2003;349(2):185-6.

Weller RO, Djuanda E, Yow HY, Carare RO. Lymphatic drainage of the brain and the pathophysiology of neurological disease. *Acta Neuropathol* 2009;117(1):1-14.

Weller RO, Galea I, Carare RO, Minagar A. Pathophysiology of the lymphatic drainage of the central nervous system: Implications for pathogenesis and therapy of multiple sclerosis. *Pathophysiology* 2010;17(4):295-306.

Wen SR, Liu GJ, Feng RN, Gong FC, Zhong H, Duan SR, Bi S. Increased levels of IL-23 and osteopontin in serum and cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients. *J Neuroimmunol* 2012;244(1-2):94-6.

Wildin RS, Smyk-Pearson S, Filipovich AH. Clinical and molecular features of the immunodysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X linked (IPEX) syndrome. *J Med Genet* 2002;39(8):537-45.

Williams LM, Rudensky AY. Maintenance of the Foxp3-dependent developmental program in mature regulatory T cells requires continued expression of Foxp3. *Nat Immunol* 2007;8(3):277-84.

Yamazaki T, Yang XO, Chung Y, Fukunaga A, Nurieva R, Pappu B, et al. CCR6 regulates the migration of inflammatory and regulatory T cells. *J Immunol* 2008;181(12):8391-401.

Yao W, Tepper RS, Kaplan MH. Predisposition to the development of IL-9-secreting T cells in atopic infants. *J Allergy Clin Immunol* 2011;128(6):1357-60 e5.

Zan Y, Haag JD, Chen KS, Shepel LA, Wigington D, Wang YR, Hu R, Lopez-Guajardo CC, Brose HL, Porter KI, Leonard RA, Hitt AA, Schommer SL, Elegbede AF, Gould MN. Production of knockout rats using ENU mutagenesis and a yeast-based screening assay. *Nat Biotechnol* 2003;21(6):645-51.

Zang YC, Li S, Rivera VM, Hong J, Robinson RR, Breitbach WT, et al. Increased CD8+ cytotoxic T cell responses to myelin basic protein in multiple sclerosis. *J Immunol* 2004;172(8):5120-7.

Zhang J, Medaer R, Stinissen P, Hafler D, Raus J. MHC-restricted depletion of human myelin basic protein-reactive T cells by T cell vaccination. *Science* 1993;261(5127):1451-4.

Zhang X, Koldzic DN, Izikson L, Reddy J, Nazareno RF, Sakaguchi S, Kuchroo VK, Weiner HL. IL-10 is involved in the suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis by CD25+CD4+ regulatory T cells. *Int Immunol*. 2004;16(2):249-56.

Zheng Y, Zha Y, Gajewski TF. Molecular regulation of T-cell anergy. *EMBO Rep* 2008;9(1):50-5.

Zozulya AL, Wiendl H. The role of CD8 suppressors versus destructors in autoimmune central nervous system inflammation. *Hum Immunol* 2008;69(11):797-804.

9 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: unterschiedliche Verlaufsformen der MS (nach Lublin et al., 1996).....	36
Abbildung 2: Immunopathogenese der Multiplen Sklerose.....	41
Abbildung 3: Differenzierung von naiven CD4 ⁺ T-Zellen nach ihrer Aktivierung durch antigenpräsentierende Zellen zu unterschiedlichen Effektorzellen.....	44
Abbildung 4: Protokoll zur Induktion der aktiven EAE in der Lewis-Ratte.	53
Abbildung 5: Repräsentative FACS Dotplots einer am Tag 6 (A) bzw. 22 (B) nach Antikörperinjektion durchgeführten Färbung zur Analyse der CD8 ⁺ T-Zellen im Blut (A) bzw. in der Milz (B).	53
Abbildung 6: Reduzierte Krankheitsaktivität der aktiven EAE in Abwesenheit von CD8 ⁺ T-Zellen.	54
Abbildung 7: Untersuchung der <i>in vivo</i> Aktivität des mAk 341 (anti-CD8 β).....	55
Abbildung 8: Direkter Vergleich der depletierenden Wirkung der Antikörper OX8 (n = 2) und 341 (n = 3) gegenüber PBS-Kontrollen (n = 2).....	55
Abbildung 9: Überprüfung der Langzeitdepletion von CD8 T-Zellen, dargestellt als CD4 ⁺ $\alpha\beta$ TZR ⁺ T-Zellen, nach Applikation von 0,45mg des mAk 341.	56
Abbildung 10: Reduzierte Krankheitsaktivität in Abwesenheit von CD8 β ⁺ T-Zellen.	57
Abbildung 11: Negative Korrelation zwischen der Krankheitsaktivität der aktiven EAE in den Kontrollgruppen und dem Schutz vor der Erkrankung in den (A) OX8- bzw. (B) 341-behandelten Gruppen.	58
Abbildung 12: Exemplarische FACS-Analyse bezüglich des Screenings von 4 Wochen alten Ratten die aus einer heterozygoten Verpaarung (+/- x +/-) hinsichtlich des CD8-Gens stammen.	59
Abbildung 13: Reduzierte EAE-Aktivität in den CD8KO Lewis-Ratten im Vergleich zur Kontrollgruppe, bestehend aus wildtypischen Geschwistertieren (Camara et al., 2013).....	60
Abbildung 14: Die Immunohistochemische Analyse des Rückenmarks am Tag 14 nach Immunisierung zeigt, dass die Depletion von CD8 ⁺ Zellen eine reduzierte Infiltration von Leukozyten in das Rückenmark einhergeht (Camara et al., 2013).	61
Abbildung 15: Analyse der absoluten Infiltratzahlen im Rückenmark am Tag 14 nach Immunisierung.	62
Abbildung 16: Analyse der Frequenz der CD4 ⁺ T-Zellen im Rückenmark mittels FACS (Camara et al., 2013).	63
Abbildung 17: Albuminfärbung zur Überprüfung einer intakten Blut-Hirnschranke. Vergleich zwischen Kontrolltieren und OX8- bzw. 341-behandelten Tieren.	64
Abbildung 18: EAE-Aktivität nach Adoptivem-Zelltransfer von enzephalitogenen CD4 ⁺ T-Zellen.	65

Abbildung 19: Der adoptive Zelltransfer von enzephalitogenen CD4 ⁺ T-Zellen führt sowohl in wildtypischen Geschwistertieren (n = 4), als auch in CD8KO-Tieren (n = 4) zu einer gleich starken Krankheitsaktivität in der EAE (Camara et al., 2013).	66
Abbildung 20: Adoptiver Transfer von mit gpMBP <i>ex vivo</i> stimulierten CD4 ⁺ T-Zellen, die aus den drainierenden Lymphknoten immunisierter CD8KO-Ratten und deren wildtypischen Geschwistertieren isoliert wurden, in wildtypische Rezipienten.....	67
Abbildung 21: Funktionelle Analyse von T-Zellen aus nicht-immunisierten bzw. immunisierten Lewis-Ratten.	69
Abbildung 22: Kinetik von CD4 ⁺ und CD8 ⁺ T-Zell-Antworten nach der gpMBP-Immunisierung von normalen Lewis-Ratten.....	70
Abbildung 23: Ratten IFN- γ ELISpot Analyse zur Detektion von T-Zellen, die präsentierte gpMBP-Peptide erkennen.	72
Abbildung 24: Repräsentative FACS-Dotplots von Raji Zellen.....	73
Abbildung 25: Detektion von gpMBP-spezifischen Interferon- γ -sezernierenden T-Zellen in den drainierenden Lymphknoten von immunisierten Lewis Ratten.	75
Abbildung 26: Detektion von gpMBP-spezifischen Interferon- γ -sezernierenden T-Zellen in den drainierenden Lymphknoten von immunisierten Lewis Ratten.	75
Abbildung 27: Detektion von gpMBP-spezifischen Interferon- γ -sezernierenden T-Zellen in den drainierenden Lymphknoten von immunisierten Lewis Ratten (Camara et al., 2013).76	
Abbildung 28: Detektion von gpMBP-spezifischen Interferon- γ -sezernierenden T-Zellen in den drainierenden Lymphknoten von immunisierten Lewis Ratten..	77
Abbildung 29: gpMBP-Sequenz (ENSCPOT00000008506 von Ensembl Genome Browser).....	78
Abbildung 30: Schematische Übersicht der Schritte zur Detektion von gpMBP-spezifischen CD8 ⁺ T-Zellen.	79
Abbildung 31: Detektion von gpMBP-spezifischen CD8 ⁺ T-Zellen durch FACS-Analysen.79	
Abbildung 32: Modelldarstellung der Interaktion zwischen CD8 ⁺ und CD4 ⁺ T-Zellen in peripheren lymphoiden Organen.	84

10 TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Einteilung der EAE-Symptome in einen Stärkegrad von 0-10	12
Tabelle 2: Unterschiedlich retroviral transduzierte Rajizellen, die im ELISpot als Stimulatoren eingesetzt wurden.	74

11 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

α	alpha
Abb.	Abbildung
AIRE	Autoimmun Regulator
APZ (APC)	Antigen präsentierende Zelle (Antigen presenting cell)
AP	alkalische Phosphatase
AT-EAE	Adoptive Transfer-EAE
β	beta
BSA	Bovines Serumalbumin (bovine serum albumin)
BSS	Hanks balanced salt solution
CD	Differenzierungsantigen (cluster of differentiation)
CD8KO	CD8 knock out
CFA	komplettes Freund'sches-Adjuvans
CTLA-4	zytotoxisches T-Lymphozyten assoziiertes Antigen 4
DAB	Diaminobenzidin
DMEM	Dulbeco's modified eagle medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS (DNA)	Desoxyribonukleinsäure (deoxyribonucleic acid)
dUTP	Desoxyuridintriphosphat
EAE	Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis
ELSA	enzyme-linked immunosorbent assay
ELISpot	enzym linked immunospot
et al.	et aliter
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FB	Flachboden
Fc	kristallisierbare Fraktion eines Immunglobulins
FCS	Fötales Kälberserum (fetal calf serum)
FITC	Fluoreszein-Isothiocyanat
Foxp3	forkhead box P3

$\gamma\delta$	gamma delta
gpMBP	guinea pig (Meerschweinchen) myelin basic protein
HRP	horserashisch peroxidase
IFN- γ	Interferon-gamma
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IPEX	immunodysregulation, polyendokrinophathy X-linked syndrom
IRF	Interferon regulierender Faktor (interferon regulatory factor)
MHC	major histocompatibility complex
MS	Multiple Sklerose
nmlg	normales Maus Immunglobulin
NBT/BCIP	Nitroblue tetrazolium/ 5-Brom-4-chlor-3-indolyolphosphat
PE	Phycoerythrin
PFA	Paraformaldehyd
PMA	phorbol 12-myristate 13-acetate
rpm	rotations per minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute, ein Zellkulturmedium
RT	Raumtemperatur
RT1.A ^I	MHC Klasse I der Lewis-Ratte
RT1.B ^I	MHC Klasse II der Lewis-Ratte
SC	supplemental complete
TBS	Tris-Puffer (Tris-buffered saline)
TH-Zelle	T-Helferzelle
Treg	regulatorische T-Zelle
TUNEL	TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling
TZR	T-Zell-Rezeptor
VB	V-Boden
ZNS (CNS)	Zentrales Nervensystem (central nervous system)

12 EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG (englisch/deutsch)

Affidavit

I hereby confirm that my thesis entiteled „The role of CD8⁺ T cells in the pathogenesis of the experimental autoimmune encephalomyelitis of the Lewis-rat“ is he result of my own work. I did not receive any help or support from commercial consultants. All sources and / materials applied are listed and specified in this thesis.

Furthermore, I confirm that this thesis has not yet been submitted as part of another examination process neither in identical nor similar form.

Würzburg,

Monika Camara

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation „Die Rolle der CD8⁺ T-Zellen in der Experimentellen Autoimmunen Enzephalomyelitis der Lewis-Ratte“ eigenständig, d.h. insbesondere selbständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters, angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Ich erkläre außerdem, dass die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Würzburg,

Monika Camara

13 DANKSAGUNG

Mein größter Dank gilt meinem Betreuer PD Dr. Thomas Kerkau in dessen Arbeitsgruppe ich die Arbeit anfertigen konnte. Für die guten Diskussionen und konstruktiven Tipps, sowie sein hervorragender Stil im Umgang mit seinen Mitarbeitern.

Vielen Dank an PD Dr. Andreas Weishaupt, Sabrina Braunschweig und Gabriele Köllner aus der Neurologie für die einwandfreie Zusammenarbeit durch die wesentliche Teile dieser Arbeit zustande gekommen sind.

Des Weiteren möchte ich mich bei Professor Dr. Thomas Herrmann und seiner Arbeitsgruppe bedanken, dass sie mir ihr Wissen, sowie Geräte und Materialien zur Verfügung gestellt haben, wodurch die molekularbiologischen Arbeiten ermöglicht wurden.

PD Dr. Niklas Beyersdorf danke ich für die Einführung in die Methoden der Immunologie, seinen konkreten Beitrag zu einigen der hier gezeigten Experimente und dafür, dass er für Fragen ebenfalls immer ein offenes Ohr hatte und mit ausführlichem Rat zur Seite stand.

Ein großer Dank auch an Nelli Wolf und Sandra Werner für die Hilfe bei manchen Experimenten, sowie insgesamt ein großer Dank an die AG Kerkau für die durchweg sehr schöne Arbeitsatmosphäre.

Professor Dr. Holger Reichardt möchte ich danken, dass in seinem Labor die abschließenden EAE-Experimente für diese Arbeit durchgeführt werden konnten. Hier geht mein Dank insbesondere auch an Henrike J. Fischer und Julian Koch für ihre Hilfe bei diesen Experimenten.

Zusätzlich möchte ich Professor Dr. Holger Reichardt, Dr. Jens van den Brandt und Dr. Marco Herold für die Vorarbeiten danken, auf die diese Arbeit aufbaute.

Vielen Dank auch an die Graduierten Schule durch die ich die Möglichkeit hatte, an vielen interessanten und hilfreichen Seminaren teil zu nehmen.

Zum Schluss möchte ich Professor Dr. Thomas Hünig und Professor Dr. Thomas Müller dafür danken, dass sie sich als weitere Betreuer für meine Arbeit zur Verfügung gestellt haben und sich für die jeweiligen Treffen Zeit nahmen und Interesse und Ratschläge mitbrachten.

14 LEBENSLAUF

