

**Die Rolle von NFATc1 und NFATc2 bei der Immunpathogenese
von Experimenteller Autoimmuner Enzephalomyelitis (EAE),
dem Tiermodell der Multiplen Sklerose**



**The role of NFATc1 and NFATc2 in experimental autoimmune
encephalomyelitis (EAE), the animal model of multiple sclerosis**

Dissertation zur Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Julius-Maximilians-Universität Würzburg

Vorgelegt von Lena Dietz

Geburtsort: Duisburg

Dezember 2013

Eingereicht am: _____

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender: _____

Gutachter: Prof. Dr. Edgar Serfling

Gutachter: Priv.-Doz. Dr. Robert Hock

Tag des Promotionskolloquiums: _____

Doktorurkunde ausgehändigt am: _____

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bei allen Unterstützern, Kollegen und Freunden bedanken, die mir bei der vorliegenden Arbeit zur Seite standen.

Mein besonderer Dank geht zuerst an Frau Dr. Friederike Berberich-Siebelt! Für die hervorragende wissenschaftliche und persönliche Betreuung meiner Doktorarbeit. Vor allem durch ihre stets fachkundige Unterstützung in wissenschaftlichen Fragen und Problemen. Ich danke ihr für die gemeinsame Zeit, die mich wissenschaftlich sehr geprägt hat. Sie hat mir auch die Möglichkeit gegeben meine Daten auf Kongressen und Tagungen einem Fachpublikum zu präsentieren, wodurch ich sehr viel an positivem Input bekommen habe. Dies hat wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Danke auch für alle Freiräume, die mir von ihr bei der wissenschaftlichen Durchführung dieser Arbeit gewährt wurden. Trotzdem konnte ich jederzeit auf Rat und Unterstützung ihrerseits zurückgreifen. Ein besonderer Dank auch für die Unterstützung meiner PostDoc-Australien-Pläne.

Danken möchte ich Herrn Professor Dr. Edgar Serfling für die Übernahme des Erstgutachtens meiner Doktorarbeit. Seine Begeisterung für das Gebiet der NFAT-Forschung ist noch immer, trotz langer Forschungstätigkeit, ungebrochen. Danke für stets konstruktive Kritik sowie fachkundige Ratschläge.

Weiterhin möchte ich Herrn PD Dr. Robert Hock für die Übernahme des Zweitgutachtens danken.

Allen Kollegen der Arbeitsgruppe „Molekulare Pathologie“ sowie meinem direkten Laborkollegen Dr. Martin Väth danke ich für ein schönes Arbeitsklima. Ohne die „richtigen“ Kollegen kann Wissenschaft manchmal ernüchternd sein. Ihr habt es aber immer geschafft, sowohl durch persönliches als auch wissenschaftliches Beistehen den Laboralltag bunt zu gestalten. Danken möchte ich an dieser Stelle speziell allen Kollegen und Ex-Kollegen meiner Arbeitsgruppe: Martin Väth, Nadine Winter, Anna-Lena Vogel und Janina Findeis. Ansonsten geht mein Dank auch an alle der Arbeitsgruppe Serfling: Dr. Stefan-Klein-Hessling, Dr. Amyia Patra, Dr. Khalid Muhammad, Dr. Andris Avots, Tobias Pusch, Duong Pham Ahn, Hani Alefrai und Krishna Murti, sowie an Doris Michel, Ilona Pietrowski und Angelika

Skiadas. Ein besonderer Dank geht an Rhoda Busch: Danke für ein stets offenes Ohr für alle meine Probleme wissenschaftlicher oder privater Natur!

Danke auch im Besonderen an „Fritzi“ aus der Arbeitsgruppe von Prof. Ari Waisman für die nette gemeinsame Würzburger Zeit. Ohne dich wäre ich nie zum EAE-Experten geworden. Danke für die kompetente wissenschaftliche Unterstützung, die dazu beigetragen hat das EAE-Modell in unserem Labor zu etablieren. Danke auch für alle Ratschläge persönlicher Art.

Danke auch an meine Familie, die nie richtig verstanden hat, was ich eigentlich 24/7 im Labor so treibe, aber mich trotzdem immer in Allem unterstützt hat und unterstützen wird.

Für zwei besondere Menschen:

“Being deeply loved by someone gives you strength, while loving someone deeply gives you courage.” Lao Tzu

“The most exciting phrase to hear in science, the one that heralds the most discoveries, is not

“Eureka!” (I found it!) but “That’s funny...”

Isaac Asimov

1. EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG (GEM. § 4 ABS. 3 SATZ 3, 5 ,8 PROM.-ORDN.)	1
2. ZUSAMMENFASSUNG	2
2.1 Zusammenfassung in deutscher Sprache	2
2.2 Zusammenfassung in englischer Sprache (<i>Abstract</i>).....	3
3. EINLEITUNG.....	4
3.1 Das Immunsystem.....	4
3.1.1 T-Lymphozyten.....	5
3.1.2 Autoimmunität.....	13
3.2 Multiple Sklerose	14
3.2.1 Die Immunpathogenese von Multipler Sklerose	16
3.2.2 Tiermodelle der Multiplen Sklerose	21
3.3 Die Transkriptionsfaktoren <i>Nuclear Factor of Activated T cells</i> (NFAT)	23
3.3.1 Die Rolle von NFAT in Lymphozyten.....	28
3.3.2 NFATc1 und NFATc2 in CD4 ⁺ T-Zellen	30
3.4 Zielsetzung der Arbeit	34
4. MATERIAL UND METHODEN.....	35
4.1 Materialien	35
4.1.1 Chemikalien und Reagenzien.....	35
4.1.1.1 Verwendete Chemikalien.....	35
4.1.1.2 Stimulantien.....	36
4.1.1.3 Zusätze für die Zellkultur.....	36
4.1.1.4 Radioaktiv-markierte Stoffe	37
4.1.1.5 Größenstandards.....	37
4.1.2 Verwendete Labormaterialien und Geräte	37
4.1.2.1 Labormaterialien.....	37
4.1.2.2 Geräte/Instrumente	38
4.1.3 Antikörper.....	39
4.1.3.1 Antikörper für FACS-Analysen	39
4.1.3.2 Primäre Antikörper für Westernblot und Immunfluoreszenz	40
4.1.3.3 HRP-konjugierte Sekundärantikörper für Westernblot.....	40

4.1.3.4 Sekundärantikörper für Immunfluoreszenz	41
4.1.4 Oligonukleotide.....	41
4.1.4.1 Maus-Genotypisierungsprimer	41
4.1.4.2 Sequenzierprimer	42
4.1.4.3 RT-PCR Primer.....	42
4.1.4.4 Realtime PCR Primer	42
4.1.4.5 Chromatinimmunopräzipitations (ChIP) Primer	43
4.1.5 Verwendete Zelllinien.....	44
4.1.6 Verwendete Mauslinien	44
4.1.7 Verwendete Standard-Puffer	45
4.1.8 Elektronische Datenverarbeitung.....	45
4.2 Methoden	46
4.2.1 Zelluläre Methoden	46
4.2.1.1 Zentrifugation von Zellen.....	46
4.2.1.2 Bestimmung der Zellzahl und Vitalität	46
4.2.1.3 Präparation von primären Zellen aus Thymus, Milz und Lymphknoten	47
4.2.1.4 Präparation von Immunzellen aus dem ZNS	47
4.2.1.5 Kultivierung von primären Zellen.....	48
4.2.1.6 Kultur von Zelllinien	49
4.2.1.7 Negativ-Isolation von CD4 ⁺ T-Zellen.....	49
4.2.1.8 Positiv-Isolation von CD4 ⁺ T-Zellen	50
4.2.1.9 Differenzierungskulturen naiver CD4 ⁺ T-Zellen zu T-Helfer-Zellen	51
4.2.1.10 Stimulation von primären Immunzellen	52
4.2.1.11 MOG ₃₅₋₅₅ Reaktivierungskultur	52
4.2.1.12 Proliferationsbestimmung durch ³ [H]-Thymidin Inkorporation	53
4.2.1.13 Transfektion von Zelllinien	54
4.2.1.14 Luciferase-Reportergen Analysen.....	54
4.2.1.15 Durchflusszytometrische Analyse von Zellen (FACS®)	55
4.2.1.16 Zytospin-Zentrifugation von Zellen	57
4.2.2 <i>In vivo</i> Experimente und Mausmodelle	57
4.2.2.1 Aktive MOG ₃₅₋₅₅ EAE Induktion.....	57
4.2.2.2 Passive EAE Induktion	58
4.2.2.3 Generierung von Knochenmarkschimären	58
4.2.3 Arbeiten mit Proteinen.....	59
4.2.3.1 Enzym-linked Immunosorbent Assay (ELISA)	59
4.2.3.1 Herstellung von Kern- und Zytoplasmalysaten.....	60
4.2.3.3 Bestimmung der Proteinkonzentration.....	61
4.2.3.4 Immunoblotting von Proteinen (Westernblot).....	61
4.2.3.5 Ko-Immunopräzipitation (Co-IP).....	63

4.2.4 Arbeiten mit Nukleinsäure	64
4.2.4.1 Isolation von genomischer DNA.....	64
4.2.4.2 Präparation von RNA mit Trizol	65
4.2.4.3 Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA.....	65
4.2.4.4 Reverse Transkription von RNA in cDNA	65
4.2.4.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	66
4.2.4.6 Quantitative Real-time PCR (qRT-PCR) Analyse von mRNA mit SYBRgreen®	66
4.2.4.7 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA.....	67
4.2.4.4 Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP).....	67
4.2.5 Histologische Methoden.....	68
4.2.5.1 Präparation von ZNS-Gewebe.....	68
4.2.5.2 Herstellung von Kryoschnitten	68
4.2.5.3 H&E-Färbung.....	68
4.2.5.4 Immunfluoreszenzfärbung.....	69
4.2.6 Bildgebende Verfahren.....	70
4.2.6.1 Konfokale Mikroskopie.....	70
4.2.6.2 Fluoreszenzmikroskopie.....	70
4.2.6.3 Graphische Aufarbeitung von Daten und Statistik.....	70
5. ERGEBNISSE	71
5.1 Die Rolle von NFATc1 und NFATc2 bei der Immunpathogenese von Experimenteller Autoimmuner Enzephalomyelitis (EAE)	71
5.1.1 Analyse der <i>Nfatc1^{fl/fl} x Cd4cre⁺</i> Mäuse	71
5.1.1.1 NFATc1-defiziente CD4 ⁺ T-Zellen zeigen Aktivierungs- und Differenzierungsdefekte (<i>in vitro</i>)	71
5.1.1.1.1 Verminderte Proliferation und IL-2-Sekretion nach CD4 ⁺ T-Zellstimulation	71
5.1.1.1.2 Gestörte <i>in vitro</i> T-Helfer-Zell Differenzierung von primären CD4 ⁺ T-Zellen aus <i>Nfatc1^{fl/fl} x Cd4cre⁺</i> Mäusen	73
5.1.1.2 Der Verlust von NFATc1 wirkt sich positiv auf den Krankheitsverlauf der EAE aus	75
5.1.1.2.1 <i>Nfatc1^{fl/fl} x Cd4cre⁺</i> Mäuse zeigen einen verminderten EAE-score mit reduzierter Anzahl von CD4 ⁺ T-Zellen im ZNS.....	75
5.1.1.2.2 CD4 ⁺ T-Zellen von <i>Nfatc1^{fl/fl} x Cd4cre⁺</i> Mäusen zeigen nach MOG ₃₅₋₅₅ -Restimulation ein reduziertes enzephalitogenes Potential.....	78
5.1.1.2.3 <i>Ex vivo</i> NFATc1-defiziente CD4 ⁺ T-Zellen aus dem ZNS zeigen ein stark reduziertes pathogenes Zytokinprofil.....	80
5.1.1.2.4 Das Fehlen von NFATc1 in CD4 ⁺ T-Zellen hat keinen Einfluss auf die Durchlässigkeit der Blut-Hirn-Schranke	82
5.1.2 Analyse der <i>Nfatc2^{-/-}</i> Mäuse	84
5.1.2.1 Der Verlust von NFATc2 resultiert in einer abgeschwächten EAE.....	85

5.1.2.1.1 Reduzierter klinischer <i>score</i> in <i>Nfatc2</i> ^{-/-} Mäusen.....	85
5.1.2.1.2 Das Fehlen von NFATc2 wirkt sich auf Effektorfunktionen von CD4 ⁺ T-Zellen während der Immunreaktion einer EAE aus	87
5.1.2.1.3 <i>Nfatc2</i> ^{-/-} CD4 ⁺ T-Zellen zeigen ein verändertes pathogenes Zytokinprofil während der EAE	89
5.1.2.1.4 Die Durchlässigkeit der Blut-Hirn-Schranke bleibt durch das Fehlen von NFATc2 unbeeinflusst.....	91
5.1.2.1.5 Der positive Einfluss des Fehlens von NFATc2 auf den EAE-Krankheitsverlauf ist CD4 ⁺ T-Zell-spezifisch.....	92
5.1.2.2 Die molekulare Grundlage für die erhöhte Produktion von IL-17 in <i>Nfatc2</i> ^{-/-} CD4 ⁺ T-Zellen...	94
5.1.2.2.1 NFATc2-defiziente CD4 ⁺ T-Zellen zeigen eine erhöhte Expression des Transkriptionsfaktors IRF4	94
5.1.2.2.2 Das Fehlen von NFATc2 führt zu mehr NFATc1 im Kern von differenzierten CD4 ⁺ T-Zellen.....	97
5.1.3 Doppel-defiziente Mäuse für NFATc1 und NFATc2 sind vollständig vor EAE geschützt.....	99
5.2 Der SUMOylierungsstatus von NFATc1 beeinflusst den Krankheitsverlauf der EAE.....	101
5.2.1 SUMOylierung reguliert die differentielle transkriptionelle Aktivität der NFATc1-Isoformen in primären CD4 ⁺ T-Zellen.....	101
5.2.1.1 Generierung und Phänotypisierung der <i>Nfatc1</i> / <i>C^{ΔSUMO}</i> Maus	101
5.2.1.1.1 Einführung von Punktmutationen führt zur Inaktivierung der SUMOylierungsmotive von NFATc1/C	101
5.2.1.1.2 <i>Nfatc1</i> / <i>C^{ΔSUMO}</i> CD4 ⁺ T-Zellen produzieren erhöhte Mengen an IL-2 und reduzierte Mengen an Effektorzytokinen.....	103
5.2.1.1.3 Direkte und indirekte Effekte der fehlenden SUMOylierung auf CD4 ⁺ T-Zellen	105
5.2.2 <i>Nfatc1</i> / <i>C^{ΔSUMO}</i> Mäuse zeigen eine abgeschwächte EAE	112
5.2.2.1 Reduzierter klinischer <i>score</i> von <i>Nfatc1</i> / <i>C^{ΔSUMO}</i> Mäusen.....	112
5.2.2.1.2 Im ZNS von <i>Nfatc1</i> / <i>C^{ΔSUMO}</i> Mäusen befinden sich mehr protektive Tregs.....	114
5.2.2.1.3 CD4 ⁺ T-Zellen, die nicht NFATc1/C nicht SUMOylieren können, sind weniger enzephalitogen	116
5.2.2.1.4 Auch im passiven EAE-Modell sind <i>Nfatc1</i> / <i>C^{ΔSUMO}</i> CD4 ⁺ T-Zellen protektiv	119
6. DISKUSSION	122
6.1 Die Rolle von NFATc1 und NFATc2 bei der Immunpathogenese von EAE	122
6.1.1 Der Verlust von NFATc1 und NFATc2 mildert die Stärke von EAE – NFAT-Inhibition als möglichen therapeutischen Ansatz in Multipler Sklerose?.....	130
6.2 Der Einfluss der SUMOylierung von NFATc1/C auf eine CD4⁺ T-Zell-vermittelte (Auto-) Immunantwort.....	132

7. LITERATURVERZEICHNIS	138
ANHANG	161
Abkürzungsverzeichnis	161
Einheiten	164

1. Eidesstattliche Erklärung (gem. § 4 Abs. 3 Satz 3, 5, 8 Prom.-Ordn.)

Hiermit erkläre ich, Lena Dietz (geboren am 10.04.1982 in Duisburg), an Eides statt, die vorliegende Arbeit „Die Rolle der Transkriptionsfaktoren NFATc1 und NFATc2 bei der Immunpathogenese von Experimenteller Autoimmuner Enzephalomyelitis (EAE), dem Tiermodell von Multipler Sklerose“ eigenständig verfasst zu haben. Ich habe nach bestem Gewissen nur die angebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet. Ich erkläre außerdem, diese Dissertation in gleicher oder ähnlicher Form keinem anderen Prüfungsausschuss als dem der Biologischen Fakultät der Universität Würzburg vorgelegt zu haben.

Würzburg, im Dezember 2013

Lena Dietz

I hereby confirm that my PhD thesis „The role of the transcription factors NFATc1 and NFATc2 in the immune pathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), the animal model of multiple sclerosis“ is my own work. All sources and materials used are listed and specified in the thesis. Furthermore, I confirm that this thesis has not been submitted to any other examination progress except that of the Faculty of Biology of the University of Würzburg.

2. Zusammenfassung

2.1 Zusammenfassung in deutscher Sprache

Multiple Sklerose (MS) ist eine Autoimmunkrankheit, welche durch Infiltration autoreaktiver Immunzellen in das Zentrale Nervensystem (ZNS) gekennzeichnet ist. Hierbei gelten insbesondere Th1- und Th17-Zellen als wichtige Mediatoren der ZNS-Entzündungsreaktion. Beide T-Helfer-Zellarten können durch regulatorische T-Zellen (Tregs) in ihrer Funktion supprimiert werden. NFAT (*Nuclear Factors of Activated T cells*)-Transkriptionsfaktoren werden nach TCR-Antigen-Stimulation induziert und regeln – als pleiotrope Transkriptionsfaktoren – viele funktionelle Prozesse in T-Zellen. Um die Rolle dieser Faktoren bei der Immunpathogenese von MS zu analysieren, wurden unterschiedliche NFAT-defiziente Mausstämme auf den Krankheitsverlauf des Tiermodells Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis (EAE) hin untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl der einzelne Verlust von NFATc1 und NFATc2 in CD4⁺ T-Zellen als auch das Fehlen einer spezifischen C-terminalen Proteinmodifikation von NFATc1, die SUMOylierung, sich abmildernd auswirkten. Der verminderte klinische Ausgang der EAE beruhte allerdings je nach *knock-out* auf unterschiedlichen Mechanismen. Im Fall des T-Zell-spezifischen Verlustes von NFATc1 (*Nfatc1^{fl/fl} x Cd4cre⁺* Mäuse), erwies sich die EAE aufgrund einer stark eingeschränkten Aktivierung und Effektorzellentwicklung von CD4⁺ T-Zellen als vermindert. Dies konnte durch eine reduzierte Produktion an pathogenen Effektorzytokinen, wie IFN γ , IL-17A, GM-CSF sowie IL-22 und weniger an IL-17A⁺ IFN γ ⁺ Doppelproduzenten im ZNS gezeigt werden. Der Verlust von NFATc2 resultierte in einer starken Th2-Antwort im ZNS von *Nfatc2^{-/-}* EAE-Mäusen einhergehend mit protektiven IL-4- und IL-10-Produzenten. Interessanterweise konnten auch mehr nicht-pathogene Th17-Zellen nachgewiesen werden. *Nfatc1/C^{ΔSUMO}* CD4⁺ T-Zellen sezernierten sowohl nach *in vitro* als auch nach *in vivo* Stimulation erhöhte Mengen von IL-2. *In vitro* Kulturen von Th1- und Th17-Zellen wiesen neben dieser erhöhten IL-2-Sekretion eine verminderte Produktion von IFN γ und IL-17A auf. In Übereinstimmung mit diesen *in vitro* Befunden zeigte sich auch in der EAE ein reduziertes Krankheitsbild mit weniger Th1- und Th17-Zellen, dafür aber eine IL-2-geförderte Erhöhung der Treg-Population. Anhand der Erkenntnis, dass NFAT-Faktoren die (Auto)-Immunreaktion entscheidend beeinflussen, könnte die Inhibition einzelner NFAT-Faktoren ein neues Ziel für eine MS-Therapie darstellen.

2.2 Zusammenfassung in englischer Sprache (*Abstract*)

Multiple sclerosis (MS) is an inflammatory autoimmune disease affecting the central nervous system (CNS). T helper cells, in particular Th1 and Th17 cells, are important mediators of this progress and are antagonized by regulatory T cells (Tregs). Members of the transcription factor family “Nuclear Factors of Activated T cells” (NFAT) are induced in response to TCR stimulation and act as pleiotropic regulators of T cell function. To investigate the role of single NFAT factors in the pathophysiology of MS we used several NFAT deficient mice in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), the animal model of the human disease. We could show that not only the deficiency of NFATc1 or NFATc2, but also the absence of the C-terminal (specific) SUMOylation of NFATc1 reduces the clinical severity of EAE. Regardless of a comparable influence on the disease, the reasons are distinct.

In case of T cell specific loss of NFATc1 (*Nfatc1^{fl/fl} x Cd4cre⁺* mice) the clinical score was diminished due to impaired effector functions of CD4⁺ T cells lacking all NFATc1 isoforms. This was demonstrated by lower levels of pathogenic effector cytokines producing CD4⁺ T cells, such as IFN γ , IL-17A, GM-CSF, IL-22 producers as well as IL-17A⁺ IFN γ ⁺ double producers in the CNS of *Nfatc1^{fl/fl} x Cd4cre⁺* mice compared to *wild type* siblings. Also the course of EAE in *Nfatc2^{-/-}* mice was found to be ameliorated. The deficiency of NFATc2 resulted in a striking defect of CD4⁺ T cells in producing IFN- γ , but an enhanced immune responses with Th2-like characteristics. CD4⁺ T-cells in the ZNS of *Nfatc2^{-/-}* EAE-diseased mice showed a profound production of protective IL-4 and IL-10 lymphokines. Interestingly, also more non-pathogenic IL-17A producers were found. CD4⁺ T cells from *Nfatc1/C^{ΔSUMO}* mice produce significantly more IL-2 *in vitro* and *in vivo*, whereas cultured Th1 and Th17 cells express less IFN γ and IL-17A, respectively. Consistently, the MOG₃₅₋₅₅-induced EAE in *Nfatc1/C^{ΔSUMO}* mice revealed an ameliorated clinical disease severity compared to *wild type* controls with a robust IL-2-driven increase in Tregs and a reduction in effector T helper cells producing lymphokines. In summary, we could show that individual NFAT factors and their modifications play a distinct role in the pathogenesis of MS. Therefore, targeting or modulating specific NFAT factors could be a therapeutic approach to inhibit undesired NFAT functions in the respective human disease context of MS.

3. Einleitung

3.1 Das Immunsystem

Das Immunsystem ist ein zelluläres Abwehrsystem, welches den Organismus vor Pathogenen und damit verbundenen Krankheiten schützt. Wichtig ist hierbei die Unterscheidung zwischen „Fremd“ und „Selbst“, d. h. die Fähigkeit der Immunzellen, Krankheitserreger von körpereigenen Strukturen, aber auch von verändertem „Selbst“, differenzieren zu können. Traditionell wird das Immunsystem in zwei Bereiche gegliedert, die angeborene und die erworbene (adaptive) Immunität.

Eine primäre Verteidigungslinie üben unterschiedliche Epithelschichten aus, die eine mechanische und physiologische Hürde für Mikroorganismen bilden. Zusätzlich sind die Zelltypen des angeborenen Immunsystems darauf spezialisiert, eingedrungene Krankheitserreger gezielt zu neutralisieren, indem sie diese phagozytieren oder infizierte Zellen lysieren. Neben dieser direkten Bekämpfung schütten Immunzellen biologisch aktive Botenstoffe, wie Interferone und Interleukine, zur Verstärkung der Entzündungsreaktion – mit Beteiligung von Zellen des erworbenen Immunsystems – aus. Ebenso wird das Komplementsystem, welches aus verschiedenen Plasmaproteinen zur gezielten Opsonisierung von Pathogenen besteht, zur angeborenen Immunität gezählt¹. Zellen des angeborenen Immunsystems sind Makrophagen, dendritische Zellen (DCs), Mastzellen, Monozyten, Granulozyten sowie natürliche Killerzellen (NK-Zellen), die aus myeloiden Vorläuferzellen des hämatopoetischen Stammzellsystems gebildet werden. Diese Zellen können fremde Strukturen anhand von allgemeinen Krankheitserreger-assoziierten Strukturen (*pathogen-associated molecular patterns*, PAMPs) mit spezielle Rezeptoren, den sogenannten *pattern recognition receptors* PRRs, erkennen². Im Laufe einer Immunreaktion präsentieren die myeloiden Zellen über MHC-Moleküle (*major histocompatibility complex*, MHC) Bruchstücke der neutralisierten Pathogene an die Zellen des adaptiven Immunsystems. Dadurch helfen sie, eine hochspezifische Immunität, die durch die Zellen des adaptiven Immunsystems gewährleistet wird, aufzubauen³. Diese Zell-Zell-Interaktionen finden in den peripheren Organen des Immunsystems, wie den Lymphknoten und der Milz, statt.

Das adaptive Immunsystem zeichnet sich dadurch aus, dass neben der hochspezifischen Erkennung von Krankheitserregern auch ein immunologisches Gedächtnis aufgebaut wird. Dies sorgt bei einer zweiten Infektion mit demselben Pathogen, für eine sehr gezielte und

schnelle Bekämpfung durch langlebige Gedächtniszellen^{4, 5, 6}, die bei der primären Immunantwort gebildet wurden. Bei der adaptiven Immunität kommen Zellen der humoralen Immunantwort, die antikörperproduzierenden Plasmazellen der B-Zelllinie und Zellen der zellulären Antwort, die T-Zellen, zum Einsatz. Beide Zelltypen werden unter dem Überbegriff Lymphozyten zusammengefasst und entstehen aus lymphoiden Vorläuferzellen des hämatopoetischen Stammzellsystems. Die für das adaptive Immunsystem charakteristische Spezifität wird erworben, indem durch somatische Rekombination ein individueller B-Zell-(BCR) oder T-Zellrezeptor (TCR) für ein Antigen entsteht.

Neben der lebenswichtigen Funktion des Immunsystems, den Organismus vor Pathogenen und Infektionen zu schützen, gibt es allerdings auch Krankheiten, die dem Immunsystem zugeordnet werden. So entsteht bei einer fehlgeleiteten Erkennung von körpereigenen Strukturen das Krankheitsbild der Autoimmunität, welches unterschiedliche Organe betreffen kann. Aber auch chronische Entzündungskrankheiten, Allergien und Krebs entstehen durch Störungen des Immunsystems⁷.

3.1.1 T-Lymphozyten

T-Zellen sind Lymphozyten, die durch ihre Entstehung im Thymus und durch die Expression von heterodimeren Rezeptoren ($\alpha\beta$ - bzw. $\gamma\delta$ -TCR), in Assoziation mit dem CD3-Komplex, definiert sind. Der CD3-Komplex ist ein Proteinkomplex aus vier Ketten, der entscheidend über sogenannte ITAM (*immunoreceptor tyrosin-based activation motif*)-Motive zur TCR-Stimulation beiträgt^{8, 9}. Im Knochenmark werden aus multipotenten hämatopoetischen Stammzellen (*hematopoietic stem cells*, HSCs) zwei Immunvorläuferzellarten gebildet. Zum einen die sogenannten „gemeinsamen lymphoiden Vorläuferzellen“ (*common lymphoid progenitors*, CLPs), aus denen sich sowohl B- als auch T-Zellen sowie NK-Zellen, aber keine Zellen des myeloiden Systems, entwickeln können¹⁰, und zum anderen entstehen die sogenannten „gemeinsamen myeloiden Vorläuferzellen“ (*common myeloid progenitors*, CMPs), welche die Ursprungszellen der myeloiden Linie des Immunsystems sind und aus denen sich keine T- und B-Zellen oder NK-Zellen entwickeln¹⁰. Die CLPs wandern nach der Bildung im Knochenmark über den Blutstrom in den Thymus ein. Dort angekommen verlieren sie ihr Potential zur Entwicklung von B-Zellen oder NK-Zellen und werden auf die Entwicklung von T-Zellen festgelegt. In diesem Stadium werden sie als „*committed T cell progenitors*“ bezeichnet¹¹. Im Thymus werden aus diesen noch für CD4 und CD8 doppel-

negativen (*double-negative*, DN) Thymozyten reife T-Zellen gebildet, wobei T-Zellen mit einem $\alpha\beta$ -TCR und einem $\gamma\delta$ -TCR entstehen^{10, 11, 12}. Während der Entwicklung des Fötus und im juvenilen Lebensalter sorgt der Thymus für eine zahlenmäßig große Neubildung an T-Zellen. Mit dem Alter nimmt diese Neubildung ab und die periphere Population an T-Zellen wird durch Zellteilung von bereits reifen (*mature*) T-Zellen aufrechterhalten^{12, 13}

Der Thymus kann histologisch und funktionell in zwei Bereiche eingeteilt werden, in den äußeren Kortex und die innenliegende Medulla. Der Thymus bietet den einwandernden lymphoiden Vorläuferzellen ein dichtes Netz aus Epithelzellen, Makrophagen und dendritischen Zellen¹¹. Diese Zell-Umgebung, die sich in ihrer Zusammensetzung zwischen Kortex und Medulla unterscheidet, bietet die Grundlage für Entwicklungsprozesse, die unreife T-Zellen durchlaufen, um schließlich als reife T-Zellen in die Peripherie entlassen zu werden. Die Phasen der thymalen T-Zell-Entwicklung können grob wie folgt beschrieben werden.

Zunächst wandern die DN Vorläuferzellen, welche noch keine für reife T-Zellen charakteristischen Oberflächenmoleküle wie CD3, CD4 und CD8 exprimieren, in den kortikalen Bereich des Thymus ein. Die kortikalen Epithelzellen (*cortical thymic epithelial cells*, cTECs) bilden die zelluläre Umgebung, um aus den DN T-Zellvorläufern (pro-T-Zellen) CD8 CD4 doppel-positive (*double-negative*, DP) T-Zellen zu generieren¹⁴. Im Laufe dieses Prozesses werden die V(D)J-Gene des TCRs somatisch rekombiniert. Die Zellen tragen zunächst noch einen prä-T-Zellrezeptor, der aus einer noch unarrangierten α -Kette besteht (*pre-TCR- α*), auf der Oberfläche. Durch somatische Rekombination des Genlocus der β -Kette wird, unter der Beteiligung von RAG-Proteinen (*recombination activating gene*, RAG), ein prä- $\alpha\beta$ -TCR auf der Oberfläche der DN T-Zellen gebildet. Nach dieser β -Kettenselektion wird dann ebenfalls die α -Kette somatisch rekombiniert, und nach Verlust der prä-TCR- α -Kette wird so ein neuer, reifer heterodimerer $\alpha\beta$ -Rezeptor auf der Oberfläche exprimiert. Dieser assoziiert mit dem CD3-Komplex¹¹. Anschließend erfolgt die Differenzierung zu single-positiven (*single-positive*, SP) T-Zellen, die entweder CD8 oder CD4 in Assoziation mit CD3 auf ihrer Oberfläche tragen. Dieser Prozess beinhaltet die positive bzw. die negative Selektion, in der die unreifen DP Thymozyten auf die Erkennung von MHC-I bzw. MHC-II-Molekülen durch den $\alpha\beta$ -TCR selektioniert werden.

Aus dem DP Stadium werden diejenigen T-Zellen positiv selektioniert, die ein Selbstpeptid, welches von einem MHC-Molekül präsentiert wird, mit geringer Avidität erkennen. Die Aufgabe der MHC-Peptid-Präsentation übernehmen hier die cTECs sowie DCs¹⁴. cTECs exprimieren auf ihrer Oberfläche körpereigene Peptid-MHC-Komplexe, mit denen DP-Thymozyten interagieren. Falls der TCR funktionell ist und die Zellen mit geringer bis

mittlerer Avidität diese Peptid-MHC-Komplexe erkennen, erhalten die DP Zellen ein Überlebenssignal. Je nachdem, ob sie MHC-I oder MHC-II reaktiv sind, wird ein TCR für CD8 (MHC-I) oder CD4 (MHC-II) an der Oberfläche dieser sogenannten *single positive* (SP) T-Zellen, gebildet. Dies ist der Prozess der Positivselektion auf MHC-Moleküle. Diejenigen Zellen, die körpereigene Peptiden im Kontext mit MHC-Molekülen nicht erkennen werden hierbei über den programmierten Zelltod (Apoptose) eliminiert. Dieser Prozess wird als negative Selektion bezeichnet^{11, 14}. Zusätzlich sterben alle DP Zellen, deren TCR nicht funktionell ist, da diese kein Überlebenssignal erhalten. Dieser Vorgang wird als *death by neglect* bezeichnet. Somit überleben aus dem großen Repertoire an Vorläuferzellen im Kortex nur 3-5% an funktionell nützlichen SP T-Zellen, welche in die Medulla zu einer weiteren Selektion und zur schließlich vollständigen Reifung einwandern¹⁴.

In der Medulla übernehmen spezielle medulläre Epithelzellen (*medullary thymic epithelial cells*, mTECs) die weitere Selektion von potentiell autoreaktiven T-Zellen. Dieser wichtige Prozess, der als medulläre Toleranz bezeichnet wird, beinhaltet die Expression von gewebsspezifischen Antigenen durch mTECs unter der Kontrolle des Transkriptionsfaktors AIRE (*autoimmune regulator*). SP T-Zellen, die diese Selbstantigene erkennen, werden durch Apoptose eliminiert. Zusätzlich zu diesem Selektionsmechanismus ist die Medulla Bildungsstätte von natürlichen regulatorischen T-Zellen (*natural regulatory T cells*, nTregs). Diese werden durch die Expression des Transkriptionsfaktors Foxp3 definiert¹⁵ und sind für die Aufrechterhaltung der peripheren Toleranz gegenüber körpereigenen Antigenen wichtig. Im Gegensatz zur negativen Selektion von konventionellen T-Zellen, die körpereigene Peptide mit zu hoher Affinität erkennen und demzufolge eliminiert werden, zeigen nTregs ein primär autoreaktives TCR-Repertoire und müssen somit der negativen Selektion in der Medulla entgehen¹⁶. Hierbei handelt es sich um eine positive Selektion von nTregs, was über die Interaktion des TCRs mit Selbstpeptid-beladenen MHC-Molekülen auf der Oberfläche von mTECs oder DCs^{17, 18} im Zusammenspiel mit einer starken Kostimulation über CD28 geregelt wird¹⁹. Eine neue Studie zu dieser TCR/CD28-Selektion von autoreaktiven nTregs zeigt, dass ein weiterer Signalweg zum Überleben dieser Zellen und somit zur positiven Selektion die Interaktion von CD27 auf nTregs mit CD70 auf mTECs und DCs in speziellen Nischen der Medulla benötigt wird²⁰. Die Prozesse der positiven Selektion (auch MHC-Restriktion genannt) und der negativen Selektion von potentiellen autoreaktiven T-Lymphozyten im Thymus werden als zentrale Toleranz bezeichnet²¹. Die funktionell reifen, aber noch naiven T-Zellen wandern schließlich aus der Medulla in die Peripherie aus. Im

Folgenden soll nun spezifisch auf die immunologischen Aufgaben von $CD4^+$, $CD8^+$ und Tregs eingegangen werden.

$CD8^+$ T-Lymphozyten werden auch als zytotoxische T-Zellen (*cytotoxic T-Lymphocytes*, CTLs) bezeichnet. Wie der Name impliziert ist die Hauptaufgabe von peripheren $CD8^+$ T-Zellen die Lyse bzw. das Abtöten von infizierten Körperzellen. Somit bilden sie die Abwehr gegen intrazelluläre Pathogene, wie Bakterien, Viren und Protozoen. Naive $CD8^+$ T-Zellen werden aktiviert, indem ihrem TCR MHC-I-Moleküle mit endogen synthetisierten Peptiden präsentiert werden²². Die effektive Bekämpfung solcher intrazellulären Infektionen erfolgt auch, weil nahezu jede kernhaltige Körperzelle MHC-I Molekül auf ihrer Oberfläche trägt, und somit $CD8^+$ Zellen in den meisten Geweben Infektionen bekämpfen können^{23, 24}. Hierbei sind CTLs in der Lage, über zwei Hauptmechanismen die spezifische Lyse von infizierten Zellen zu verursachen. Zum einen nutzen sie die Ausschüttung von Granzymen und Perforinen, die die Zellmembran zerstören und somit lytisch wirken^{25, 26, 27}. Zum anderen nutzen sie den Weg der Apoptose-Induktion in Zielzellen. Dies erfolgt durch FasL/Fas-Rezeptor Interaktion, wobei FasL auf den CTLs heraufreguliert wird und somit zu einer Aggregation des Todesrezeptors Fas auf den zu tötenden Zellen führt^{25, 26, 27}. Zusätzlich sekretieren aktivierte $CD8^+$ T-Zellen auch Zytokine, wie $IFN\gamma$ und $TNF\alpha$, wodurch sie Zellen des angeborenen Immunsystems wie Neutrophile und Makrophagen zur Bekämpfung der Infektion anlocken und aktivieren²⁸.

Tregs sind eine spezielle Art von $CD4^+$ T-Zellen die für die Aufrechterhaltung der normalen Homöostase des Immunsystems wichtig sind. Sie beenden nicht nur eine Immunantwort, sobald das Pathogen erfolgreich von Zellen des adaptiven und des angeborenen Systems bekämpft wurde²⁹, sondern kontrollieren auch die Stärke einer Immunreaktion. Zusätzlich obliegt den Tregs die wichtige Aufgabe, die sogenannte periphere Toleranz gegen Selbstantigene aufrechtzuerhalten bzw. zu kontrollieren³⁰. Kommt es zu Störungen bei der Entwicklung oder bei der Funktion dieser Subpopulation an $CD4^+$ T-Zellen, so resultiert dies in Autoimmunkrankheiten oder Krankheiten, die einer überschießenden Immunantwort, wie zum Beispiel chronische Entzündungen, zugeordnet werden können³⁰. nTregs, die sich im Thymus entwickeln, können anhand der konstitutiv hohen Expression von $CD25$ ³¹, der α -Kette des IL-2-Rezeptors, und dem Transkriptionsfaktor Foxp3 identifiziert werden^{15, 32}. nTregs sind daher definiert als $CD4^+ CD25^+ Foxp3^+$ T-Zellen. Grundsätzlich unterscheidet man zwischen nTregs, welche im Thymus gebildet werden und als reife nTregs in die Peripherie entlassen werden^{33, 34}, und induzierten regulatorischen T-Zellen, den iTregs. iTregs entstehen in der Peripherie aus naiven $CD8^+$ oder $CD4^+$ T-Zellen und können in verschiedene

weitere Subtypen untergliedert werden. Man kann hierbei zwischen Foxp3⁺ und Foxp3⁻ iTregs unterscheiden³³. Die CD4⁺Foxp3⁺ iTregs, die auch als Th3-Zellen bezeichnet werden – jetzt aber als iTregs im engeren Sinne definiert werden – entstehen in der Peripherie durch die Konversion von naiven CD4⁺CD25⁺ T-Zellen durch den Einfluss der Zytokine IL-2 und TGFβ und sind durch eine hohe Sekretion von TGFβ gekennzeichnet³³. *In vitro* können CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ iTregs ebenfalls durch Stimulation mit TGFβ und hohen Mengen IL-2 aus naiven CD4⁺ T-Zellen generiert werden^{35, 36}. Eine zweite Art dieser suppressiver CD4⁺ T-Zellen sind Foxp3⁻. Die Bildung dieser, aus peripheren CD4⁺ T-Zellen, wird durch das Zytokin IL-10 induziert. Sie werden als Tr1-Zellen bezeichnet und sezernieren selbst in erhöhtem Maße IL-10 zur Suppression von konventionellen CD4⁺ T-Zellen³³. Tregs supprimieren neben naiven CD4⁺ T-Zellen und CD4⁺ Effektorzellen auch CD8⁺ T-Zellen, B-Zellen und auch Zellen des angeborenen Immunsystems wie NK-Zellen und DCs^{30, 37, 38}. Die Suppression von anderen Immunzellen durch nTregs und iTregs beinhaltet zum einen direkte Zell-Zell-Kontakte, aber auch die Sekretion von immunsuppressiven Zytokinen wie TGFβ und IL-10 oder auch Granzymen und Perforinen zur direkten Zerstörung von Zielzellen wird genutzt³⁰. Ein Suppressionsmechanismus, der eine direkte Treg-Zielzell-Interaktion benötigt, ist die Bindung des auf der Oberfläche von Tregs vermehrt vorliegende ko-inhibitorischen Moleküls CTLA-4 an die Moleküle CD80/CD86 auf DCs. Durch diese Interaktion werden DCs in ihrer Funktion gehemmt. Dies wiederum führt dann indirekt zur Proliferationshemmung von CD4⁺ T-Zellen. Zusätzlich erfolgt so auch die Inhibition der Differenzierung von CD4⁺ Zellen zu Effektorzellen^{30, 38}. Bei der Inhibition ohne direkten Zell-Kontakt, sondern durch Sekretion der immunsuppressiven Zytokine IL-10 und TGFβ, wird ebenfalls die Effektorfunktion von verschiedenen T-Helfer-Zell-Subtypen sowie die Proliferation dieser Zellen gehemmt. Auch der kompetitive Konsum von IL-2 ist ein Mechanismus der Treg vermittelten Eindämmung einer Immunantwort^{39, 40}. Da Tregs selbst kein IL-2 produzieren können, sie aber stark davon abhängig sind und demzufolge große Mengen an CD25 auf der Oberfläche exprimieren, können sie somit mit Effektorzellen erfolgreich um IL-2 konkurrieren, was dann ebenfalls zur Proliferationsinhibition und zur Apoptoseinduktion führt⁴⁰. Interessant ist, dass nicht nur die Differenzierung der jeweiligen iTregs durch das Mikromilieu bestimmt wird, sondern auch nTregs zur besseren Suppression von CD4⁺ T-Helfer-Subtypen sich den jeweiligen inflammatorischen Bedingungen anpassen. Das heißt im Speziellen, dass sie die Expression von einzelnen spezifischen Transkriptionsfaktoren der beteiligten T-Helfer-Subtypen „adaptieren“. Dies ermöglicht den nTregs, z. B. dieselben „Homing“-Rezeptoren zu exprimieren und so gezielt relevanten

Effektorzellen zu supprimieren²⁹. Im Folgenden soll nun auf die unterschiedlichen T-Helfer-Zelltypen und deren Differenzierung aus naiven peripheren CD4⁺ T-Zellen eingegangen werden.

CD4⁺ T-Helfer-Zellen nehmen innerhalb der adaptiven Immunantwort eine zentrale Rolle ein, da sie, dem Namen entsprechend, verschiedene andere Zellen des Immunsystems in ihrer Funktion unterstützen. So stimulieren sie B-Zellen zur gezielten Antikörperproduktion, verstärken durch Zytokinsekretion die antimikrobielle Wirkung von Makrophagen und locken Neutrophile, Eosinophile und Basophile zur Infektionsstelle⁴¹. Somit orchestrieren sie eine Vielzahl von verschiedenen Immunzellen, um eine effiziente Immunantwort zu gewährleisten. Hierbei gibt es verschiedene Subtypen (siehe Abbildung 3.1), die je nach Art des Pathogens spezialisiert sind. Th1-Zellen entstehen bei Infektionen mit Viren oder intrazellulären Bakterien, während Th2- und Th17-Zellen bei Wurmbefall, extrazellulären Bakterien und Pilzinfektionen gebildet werden^{29, 41}. Im Jahr 1986 legten Mosmann und Coffmann die Grundlage der T-Helfer-Zelldefinitionen, da sie entdeckten, dass es zwei unterschiedliche langlebige CD4⁺ T-Zellpopulationen gibt, die sich anhand ihrer Zytokinproduktion und in ihrer Funktion unterscheiden. Sie beschrieben die IFN γ -produzierenden Th1-Zellen und die IL-4-produzierenden Th2-Zellen⁴². Seitdem sind weitere Subtypen mit spezialisierten Aufgaben und Zytokinen entdeckt worden. So gibt es neben den Th1- und Th2-Zellen auch Th17-, Th9- und folliculäre T-Helfer-Zellen (Tfh) (Abbildung 3.1).

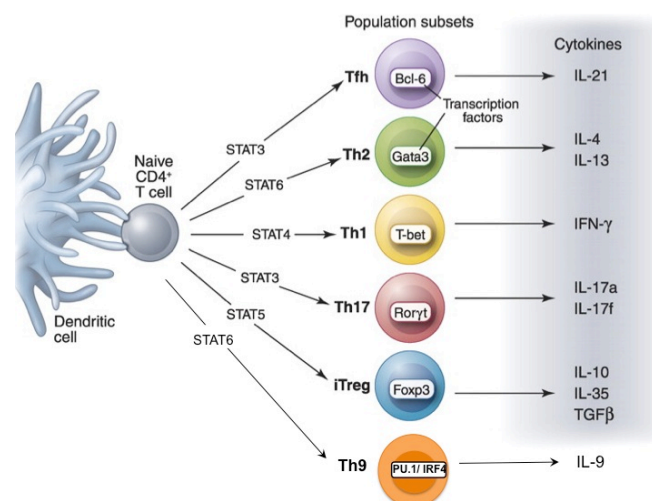


Abbildung 3.1: CD4⁺ T-Helfer-Subtypen

Dargestellt sind verschiedene T-Helfer-Zellarten, die in der Peripherie aus naiven CD4⁺ T-Zellen nach Antigenkontakt durch APCs gebildet werden. Jeder T-Helfer-Zelltyp ist durch die Expression eines eigenen „Master“-Transkriptionsfaktors und der Sekretion von spezifischen Zytokinen definiert. Bei der Differenzierung in die jeweiligen Subtypen sind sowohl die Aktivierung durch ein Antigen, als auch das Zytokimmilieu und die dadurch aktivierten STAT-Faktoren entscheidend (modifiziert nach O’Shea 2010⁴³).

Th1-Zellen sind durch die Expression ihres „Master“-Transkriptionsfaktors T-bet sowie der Expression von STAT1 und STAT4 (*signal transducer and activator of transcription*, STAT) und der Produktion von IFN γ , ihrem Leitzytokin, charakterisiert^{44, 45}. IL-12 und IFN γ sind die Zytokine, welche nach TCR-MHC-II-Antigenkontakt die Differenzierung von Th1-Zellen initiieren⁴⁵. IL-12, welches von aktivierten DCs sekretiert wird, sorgt in den CD4⁺ T-Zellen für die Aktivierung von STAT4. STAT4 führt im Zusammenspiel mit T-Zellrezeptorsignalen, wie z. B. NFAT-Faktoren zur Expression von IFN γ und dies wiederum aktiviert über einen autokrinen Signalweg STAT1, durch den die Transkription des „Master“-Regulators T-bet induziert wird⁴⁴. Durch T-bet wird die Produktion von IFN γ in den Th1-Zellen weiter verstärkt und der IL-12 Rezeptor (IL12R β 2) an der Oberfläche hochreguliert. Zusätzlich dazu wird von T-bet auch die Differenzierung zu Th1-Zellen durch die Hemmung von Th2- und Th17-assoziierten Transkriptionsfaktoren, wie GATA3 (Th2) und ROR γ t (Th17), verstärkt bzw. festgelegt^{46, 47}. Zur weiteren Ausdifferenzierung von Th1-Zellen induziert IL-12 über den STAT4-Signalweg außerdem die Heraufregulation des IL-18-Rezeptors (IL-18R α). Über IL-18 wird im Zusammenspiel mit IL-12 dann eine TCR-Stimulations-unabhängige Produktion von IFN γ vermittelt wodurch Th1-Zellen ausdifferenziert sind⁴⁸. Th1-Zellen übernehmen eine wichtige Rolle bei der Bekämpfung von intrazellulären Krankheitserregern. So locken sie über IFN γ die phagozytierenden Zellen des angeborenen Immunsystems, insbesondere Makrophagen, an. Zusätzlich aktivieren sie CD8⁺ zytotoxische T-Zellen. Dagegen spielen Th1-Zellen bei Autoimmunkrankheiten, wie z. B. bei Multipler Sklerose, eine wichtige krankheitsfördernde Rolle^{49, 50}.

Th2-Zellen sind wichtig für die Bekämpfung von extrazellulären Erregern, wie Würmern, extrazellulären Bakterien und Pilze. Zusätzlich spielen sie die Hauptrolle bei Allergien und Asthma⁴⁸. Die vornehmliche Aufgabe von Th2-Zellen ist die Anregung von B-Zellen zur Antikörperproduktion, was unter anderem durch das sezernierte Zytokin IL-4 vermittelt wird⁵¹. Neben IL-4 sekretieren Th2-Zellen noch IL-5, IL-13, IL-9, IL-10 und IL-25⁴¹.

IL-4 treibt autokrin – zusammen mit IL-2 – naive CD4⁺ T-Zellen in die Differenzierung zu Th2 Zellen^{52, 53}. Durch die IL-4-vermittelte Aktivierung von STAT6 wird die Induktion des „Master“-Transkriptionsfaktors der Th2-Zellen, GATA3, vermittelt^{54, 55}. Neben der Induktion der Th2-spezifischen Zytokinproduktion trägt GATA3 zur Differenzierung von Th2-Zellen auch durch Interaktion mit T-bet und der dadurch vermittelten Hemmung der Th1-Zell-Entwicklung bei. Darüberhinaus rekrutiert GATA3 den Transkriptionsfaktors Gfi-1, welcher selektiv die Proliferation von Th2-Zellen induziert⁵⁶. Zusätzlich zum IL-4-vermittelten STAT6-Signalweg ist für die Differenzierung von Th2-Zellen auch die IL-2-vermittelte

Aktivierung von STAT5 notwendig⁵⁷. STAT5 bindet zusammen mit GATA3 an den *Il4*-Promotor und induziert so dessen Expression⁵⁸. Auch die Kooperation der Transkriptionsfaktoren IRF4 und NFATc2 spielt bei der Induktion der *Il4* Expression eine wichtige Rolle⁵⁹.

Eine dritte T-Helfer-Sublinie sind die Th17-Zellen. Diese wurden 2003 von verschiedenen Arbeitsgruppen zum ersten Mal anhand der Sekretion von IL-17 beschrieben^{60, 61, 62} und 2005 schließlich von Harrington und Murphy als eigenständiger T-Helfer-Zelltyp, neben Th1- und Th2-Zellen, definiert⁶³. Th17-Zellen sind wichtige Immunzellen im Kampf gegen extrazelluläre Bakterien und besonders gegen Pilzinfektionen. Neben diesen immunologisch nützlichen Aufgaben besitzen sie im Kontext mit Autoimmunkrankheiten jedoch eine pathogene Wirkung⁶⁴. Sie sind durch die Sekretion von Mitgliedern der IL-17-Zytokinfamilie, wozu IL-17A, IL-17F, IL-22 und IL-21 gehören, definiert. IL-17A führt zur Induktion von proinflammatorischen Zytokinen, wie IL-6, IL-1 und TNF α , und rekrutiert so entzündungsfördernde Immunzellen des angeborenen Immunsystems zur Infektionsstelle^{64, 65}. Für die Differenzierung von Th17-Zellen sind die Zytokine IL-6, TGF β , IL-21 und IL-23 wichtig. Prinzipiell kann man die Differenzierung in die Th17-Linie in drei Stufen einteilen. Nämlich in die Initiierung durch IL-6 und TGF β , die Auto-Amplifikation durch IL-21 und schließlich die Festlegung der Th17-Linie durch IL-23⁴⁸. Hierbei führt die Ausreifung der Th17-Zellen durch IL-23 zu Th17-Zellen, denen ein sehr pathogenes Potential im Kontext mit Autoimmunkrankheiten zugesprochen wird⁶⁶. TGF β und IL-6 wirken bei der Induktion der Expression des Th17 „Master“-Regulators, dem Transkriptionsfaktor ROR γ t, zusammen^{67, 68}. ROR γ t selbst vermittelt durch direkte DNA-Bindung die Produktion von IL-17A und IL-17F⁶⁵. Bei der Th17-Differenzierung hat auch der über IL6, IL-21 und IL-23 aktivierte STAT3-Signalweg eine entscheidende Rolle. STAT3 inhibiert nicht nur T-bet und Foxp3 und somit die Th1- und iTreg-Differenzierung, sondern induziert neben ROR γ t zusätzlich die Expression von IL-17A und IL-17F⁶⁹. Nachdem so die Liniendifferenzierung festgelegt wurde, erfolgt über IL-21 ein autokriner *feedback loop*, der zur gezielten Proliferation von Th17-Zellen führt⁷⁰. In diesem Prozess und bei der terminalen Differenzierung spielt der Transkriptionsfaktor IRF4 eine wichtige Rolle, da er neben der Expression von IL-21 auch die Expression des IL-23-Rezeptors auf der Oberfläche hervorruft⁷¹. Das Vorkommen des IL-23-Rezeptors definiert die Endphase der Th17-Zellentwicklung, da durch DC-generiertes IL-23 die Th17-Linie stabilisiert wird^{72, 73}.

Somit wurde die ursprüngliche Annahme von Mosmann und Coffmann – von zwei unterschiedliche T-Helfer-Zelltypen (Th1 und Th2) – mittlerweile um drei weitere T-Helfer-

Zellarten (Th17, Th9 und Tfh) erweitert. Darüber hinaus gibt es Hinweise, dass diese verschiedenen Subtypen nicht uneingeschränkt stabil sind und ineinander übergehen können⁷⁴. Dieses Phänomen wird als CD4⁺ T-Zell-Plastizität bezeichnet. So können Th17-Zellen zu Th1-Zellen konvertieren⁷⁵ oder sogar nach IL-4-Exposition (*in vitro*) in Th2-Zellen umgewandelt werden⁷⁶. Ebenso können Mischzellen entstehen, sogenannte Doppelproduzenten, die z. B. IFN γ und IL-17A gleichzeitig sekretieren und unter dem Einfluss von IL-12 aus Th17-Zellen entstehen⁷⁷. Weiterhin sind Th17-Zellen und iTregs reziprok reguliert, was bedeutet, dass je nach Zytokinmilieu diese beiden sich jeweils in den anderen Zelltypen umwandeln können⁷⁸. Neben der hohen Plastizität, die Th17-Zellen und iTregs zugeschrieben wird, gibt es Hinweise, dass die beiden vermeintlich stabileren Th1- und Th2-Zellen diese Plastizität zeigen. So können Th2-Zellen unter dem Einfluss von TGF β zu Th9 Zellen konvertieren⁷⁹ oder Th2-Zellen zu Th1/Th2-Hybridzellen werden⁸⁰. Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass es nicht nur spezielle CD4⁺ T-Helfer-Zellen gibt, die spezifisch für die Art einer Infektion sind und dementsprechend dazu beitragen, diese zu bekämpfen, sondern aufgrund der Plastizität der Subtypen diese Spezifität und Effektivität sogar gesteigert bzw. angepasst werden kann.

3.1.2 Autoimmunität

Als Autoimmunität bezeichnet man das fehlgeleitete Erkennen und Bekämpfen von körpereigenen Geweben durch Zellen des Immunsystems. Durch diese Störung kommt es innerhalb von Geweben oder Organen zu Entzündungsreaktionen, die von selbstreaktiven (selbst = körpereigen) Zellen des adaptiven Immunsystems ausgelöst werden. Solche immunassoziierten Entzündungsreaktionen werden als Autoimmunkrankheiten definiert. Hierzu zählen beispielsweise Multiple Sklerose, Typ1 Diabetes, Rheumatoide Arthritis, Hashimoto Thyreoiditis, Psoriasis und Systemischer Lupus erythematodes. Grundsätzlich besitzt jeder Mensch selbstreaktive Immunzellen, welche aber im gesunden System von regulatorischen Mechanismen, wie Tregs und dem Mechanismus der T-Zell-Anergie, kontrolliert werden. Dies wird als periphere Toleranz gegen Selbstantigene bezeichnet. Zusätzlich gibt es die Mechanismen der zentralen Toleranz, bei denen potentiell autoreaktive Immunzellen während der Entwicklung spezifisch eliminiert werden. Das Fehlen oder Störungen dieser Toleranzmechanismen resultieren in der Aktivierung von selbstreaktiven Immunzellen und den damit verbundenen Autoimmunkrankheiten. Es gibt verschiedene

Theorien bzw. Vorgänge, wie es zu Störungen dieser Toleranz gegen Selbstantigene kommt. Ein Faktor kann eine genetische Aberration oder Prädisposition für Autoimmunkrankheiten sein. So sind z. B. Mutationen im *FOXP3*-Gen beim Menschen mit Autoimmunkrankheiten und schweren Immunstörungen, die als IPEX-(*Immunodysregulation Polyendocrinopathy Enteropathy X-linked*)-Syndrom bezeichnet werden, assoziiert^{81, 82}. Ebenso gibt es Hinweise, dass Polymorphismen innerhalb der MHC-Gene beim Menschen zu Störungen bei der MHC-TCR Interaktion und so zu einer verstärkten Aktivierung von autoreaktiven T-Zellen führen können⁸³. Neben diesen genetischen Ursachen werden auch unterschiedlichste Umwelteinflüsse diskutiert, die Autoimmunkrankheiten begünstigen können. Ein Mechanismus, der hierbei zu nennen ist, wird als molekulare Mimikry bezeichnet^{84, 85}. Dies ist ein Vorgang, bei dem Krankheitserreger Antigene exprimieren, die körpereigenen Antigenen von der Struktur her sehr ähnlich sind. Innerhalb einer Immunreaktion gegen diese Pathogene kann es dann zur Kreuz-Reaktivität (*cross-reactivity*) von aktivierten T-Zellen gegen körpereigenes Gewebe kommen^{84, 85, 86}. Bei der Ausbildung von Autoimmunkrankheiten sind auch Störungen der Funktion von Tregs wichtig. So gibt es Studien, die zeigen, dass Tregs in Mausmodellen menschlicher Autoimmunkrankheiten notwendig sind, um diese abzumildern bzw. zu unterdrücken⁸⁷.

Eine Therapie von Autoimmunkrankheiten ist die Gabe von Immunsuppressiva, um die Entzündungsreaktionen, die von selbstreaktiven Immunzellen hervorgerufen werden, einzudämmen. Allerdings werden als unerwünschte Nebenwirkung nicht nur die autoreaktiven Zellen inhibiert, sondern insgesamt Funktionen des Immunsystems. Infektionen mit Krankheitserregern können so nicht mehr effizient bekämpft werden und es kommt oft zu unerwünschten opportunistischen Infektionen. Deshalb wird in der aktuellen medizinischen Forschung nach spezialisierteren Therapien anstelle einer „Breitband-Immunsuppression“ gesucht wird.

3.2 Multiple Sklerose

Multiple Sklerose (MS) ist eine Autoimmunkrankheit, die das Zentrale Nervensystem (ZNS) betrifft. Weltweit sind mehr als eine Million Menschen, von denen die Mehrzahl weiblichen Geschlechts sind, betroffen⁴⁹. In 80-90% der Fälle beginnt MS mit der schubartigen Verlaufsform (*relapsing-remitting course*, RR-MS)^{49, 50}. Dieses Anfangsstadium ist geprägt von Phasen, in denen die Patienten stark unter den Symptomen der MS, wie Ataxie,

Koordinationsstörungen, spastischen Lähmungen und kognitiven, sensorischen und visuellen Einschränkungen leiden⁵⁰. Dazwischen liegen Phasen, in denen die Patienten völlig symptomfrei leben können. Allerdings geht die RR-MS im Laufe der Krankheitsgeschichte häufig in eine progressive Form (*secondary progressive phase*, SP-MS) über. Da bei jedem Schub nicht-reversible neuronale Schädigungen in der weißen Substanz des ZNS entstehen, nehmen die symptomfreien Phasen mit Dauer der MS-Erkrankung ab, was dann schließlich zur sekundären progressiven Form führt⁸⁸.

Ein zweite Art einer MS-Erkrankung, die primäre progressive Form (*primary progressive course*, PP-MS), befällt 10-20% der MS-Patienten^{49, 50}. Hier kommt es ab Krankheitsbeginn zu immer stärkeren neurologischen Störungen, so dass diese Patienten nie symptomfreie Phasen durchleben und im Laufe der Krankheit kontinuierlich mehr und mehr eingeschränkt werden⁸⁸. Bei einem sehr geringen Anteil an MS-Patienten ist diese primäre progressive Form so stark ausgeprägt, dass es innerhalb weniger Monate zu schweren körperlichen Beeinträchtigungen und sogar zum Tod führen kann^{49, 50}.

Ursache der verschiedenen neurologischen Symptome sind Läsionen im ZNS, die aufgrund von Demyelinisierung und axonalen Schädigungen der Neurone entstehen. In diesen Läsionen findet man T-Zellen (CD4⁺, CD8⁺ und $\gamma\delta$), Makrophagen, aktivierte Mikrogliazellen und B-Zellen^{50, 88, 89}. Normalerweise ist das ZNS ein immunprivilegiertes Organ, d. h. es ist vor der Infiltration durch Immunzellen geschützt⁹⁰. Dies ist im Falle des ZNS wichtig, da Neurone zu den postmitotischen Zellen gehören und sich nicht wie andere Körperzellen wie z. B. Hautzellen, durch Zellteilung erneuern können. Ein Verlust oder eine Schädigung von Neuronen ist daher fatal.

Für die Aufrechterhaltung dieses Immunprivilegs ist die Blut-Hirn-Schranke (BHS) verantwortlich. Die BHS ist eine physiologische Barriere aus zerebralen Endothelzellen innerhalb der Kapillare, die das ZNS umgeben^{91, 92}. Diese Schicht schützt das ZNS zum einen vor im Blut zirkulierenden Krankheitserregern, Toxinen und Immunzellen und zum anderen gewährleistet sie die Versorgung mit Nährstoffen und den Abtransport von Stoffwechselprodukten. Eine Disruption dieser schützenden Barriere ist bei MS mit dem Einwandern von autoreaktiven Immunzellen assoziiert^{91, 92, 93, 94}. Diese Infiltration ist die Grundlage für den Beginn der Entzündungsreaktionen, die im ZNS von MS-Patienten ablaufen. Dass MS ursächlich eine immunzell-assoziierte Krankheit ist, zeigen Studien mit dem Antikörper Natalizumab. Dieser ist gegen das $\alpha 4$ -Integrin (CD49d) gerichtet, welches auf Lymphozyten nach Aktivierung hochreguliert und aktiviert (*inside-out-signaling*) wird und zum Überqueren der Blut-Hirn-Schranke notwendig ist⁹⁵. Blockiert man diese primäre

und für die weitere Pathogenese notwendige Infiltration von Immunzellen durch die Blockade des α 4-Intergrins, so führt dies zur Inhibierung der ZNS-Inflammation und zur weitgehenden neurologischen Symptomfreiheit von MS-Patienten mit schubartiger Verlaufsform^{95, 96, 97, 98}. Dementsprechend korrelieren bei der schubartigen Form die Krankheitsschübe mit der inflammatorischen Störung der BHS und der Invasion des ZNS durch Immunzellen⁸⁸. Bei einer MS-Erkrankung spielen auch genetische Faktoren eine Rolle. So gibt es bei ca. 15-20% der Fälle einen familiären Hintergrund^{88, 99, 100}. Diese genetische Prädisposition betrifft vor allem Gene, die dem Immunsystem zugeordnet werden können. So betreffen genetische Aberrationen die menschlichen HLA (*human leucocyte antigens*) Klasse-II-Antigene (MHC-II)¹⁰¹ sowie Gene, die für die IL-2 Rezeptor alpha-Kette (IL2R α) und für die IL-7 Rezeptors alpha-Kette (IL7R α) codieren⁹⁹. Zusätzlich wird auch Umweltfaktoren eine Rolle bei der Entstehung von MS zugeschrieben. So wird die Infektion mit einigen Virusstämmen mit der Wahrscheinlichkeit an MS zu erkranken in Verbindung gebracht^{49, 102}, wobei hier der Prozess der molekularen Mimikry involviert ist⁸⁴. Ebenso gibt es Studien, die zeigen, dass klimatische Bedingungen und die Ernährung sich in der Prävalenz an MS-Erkrankungen niederschlagen¹⁰³. Zu diesen Erkenntnissen passt, dass Vitamin D einen schützenden Effekt in Bezug auf MS zeigt¹⁰⁴.

3.2.1 Die Immunpathogenese von Multipler Sklerose

In erster Linie ist MS ein Prozess der von autoreaktiven T-Zellen, die nach Aktivierung in der Peripherie in das ZNS einwandern, ausgelöst wird. Dort verursachen diese ein proinflammatorisches Milieu, was dann schließlich zu einer Entzündungsreaktion mit Beteiligung von weiteren Immunzellen führt (Abbildung 3.2). Im Rahmen dieser Entzündungsreaktion entstehen erste Schädigungen an den Neuronen, vor allem in der weißen Substanz des Gehirns und des Rückenmarks. Immunzellen sind die Mediatoren der MS-Erkrankung, wobei im Laufe der Krankheitsgeschichte die immunologische Pathogenese sich mehr zu einer neurodegenerativen Krankheit weiter entwickelt⁸⁸. Viele Erkenntnisse zur Immunpathogenese von MS wurden mit Hilfe des Tiermodells Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis (EAE) gewonnen, da die Zusammensetzung der Infiltrate und die Entzündungsreaktion mit der einhergehenden Läsionsbildung stark dem humanen Vorbild der MS ähnelt^{50, 105}. Die Tatsache, dass in Tiermodellen der MS durch Immunisierung mit Myelinpeptiden oder durch adoptiven Transfer von Myelin-reaktiven T-Zellen eine MS-

ähnliche Krankheit ausgelöst wird^{106, 107}, unterstreicht die Hypothese, dass MS primär eine Autoimmunkrankheit ist^{50, 88}. Zusätzlich wurden im Blut von MS-Patienten Myelin-spezifische T-Zellen nachgewiesen^{108, 109}. Obwohl man diese selbstreaktiven T-Zellen auch in gesunden Personen findet, ist ihre Zahl in MS-Patienten stark erhöht^{109, 110}. Weiterhin konnte nachgewiesen werden, dass diese T-Zellen speziell die immundominanten Epiptope p85-99 des Myelin-Basisproteins (*myelin basic protein*, MBP) mit erhöhter Avidität erkennen und dadurch aktiviert werden^{110 88}.

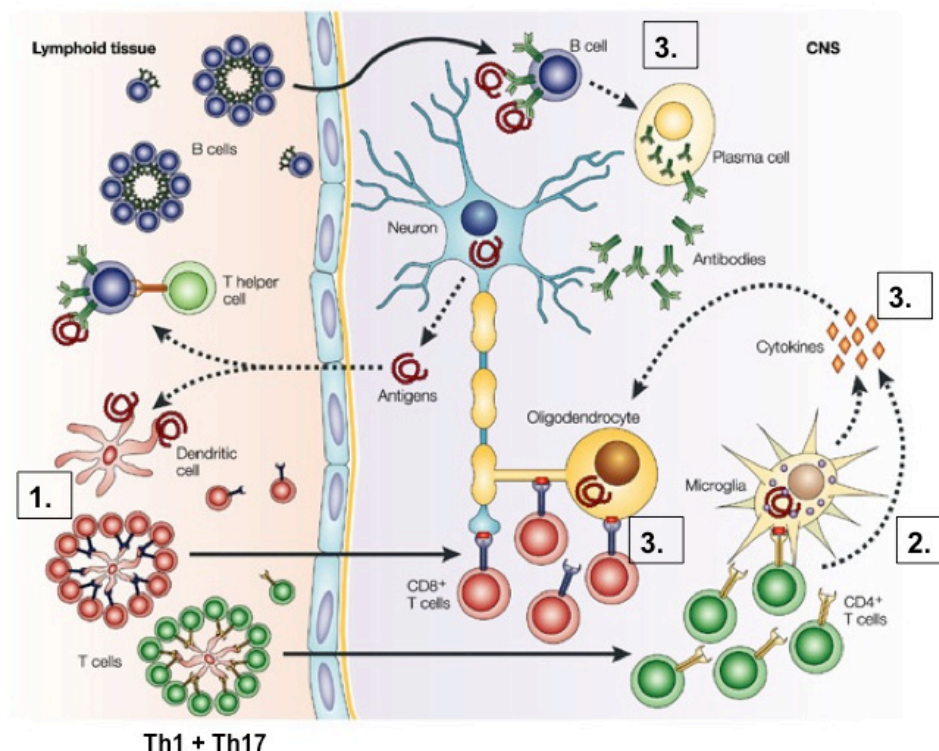


Abbildung 3.2: Vorgänge und beteiligte Immunzellen bei der Immunpathogenese von Multipler Sklerose.

(1.) Zuerst findet in der Peripherie eine Aktivierung von selbstreaktiven Immunzellen (T-Zellen, B-Zellen) statt. Hierbei werden ZNS-spezifische Antigene den T-Zellen durch dendritische Zellen oder anderen APCs, wie z. B. B-Zellen, präsentiert. Diese aktivierten $CD4^+$ T-Zellen (Th1 und Th17), sowie B-Zellen und $CD8^+$ T-Zellen können die Blut-Hirn-Schranke überqueren und in das ZNS einwandern. (2.) Im ZNS findet dann eine Reaktivierung statt, woraufhin (3.) die $CD4^+$ Effektorzellen über die Sekretion von proinflammatorischen, pathogenen Zytokinen; die $CD8^+$ T-Zellen durch ihre zytotoxische Wirkung und B-Zellen durch die Produktion von Autoantikörpern die Zerstörung der Oligodendrozyten und der Neurone vermitteln. Abbildung modifiziert nach Hemmer⁴⁹.

Prinzipiell werden vorhandenen autoreaktiven T-Zellen in der Peripherie aktiviert. Auf den aktivierten T-Zellen werden verschiedene Chemokinrezeptoren, Adhäsionsmoleküle und Integrine hochreguliert, wodurch die autoreaktiven Zellen die Möglichkeit erhalten, die BHS zu durchqueren und in das ZNS gelangen⁹⁴. Die Mechanismen dieser peripheren Aktivierung

sind nicht komplett aufgeklärt. Wahrscheinlich spielt molekulare Mimikry während einer viralen oder bakteriellen Infektion und einer dadurch verbundenen Kreuz-Reaktivität eine Rolle. Ebenso können antigenpräsentierende Zellen im ZNS, die mit Myelinpeptiden beladene MHC-II-Moleküle tragen, durch eine gestörte BHS-Funktion in die Peripherie gelangen und dort autoreaktive T-Zellen aktivieren⁵⁰.

Im ZNS treffen die primär in der Peripherie aktivierten T-Zellen wiederum auf ihre spezifischen Antigene und werden dadurch reaktiviert. Dies führt zur lokalen Ausschüttung von Zytokinen und dem Aufbau eines proinflammatorischen Milieus im ZNS. Im Folgenden soll auf die Rolle der CD4⁺ T-Zellen, insbesondere der Th1- und Th17-Zellen sowie auf die Rolle von CD8⁺ T-Zellen und B-Zellen eingegangen werden.

CD4⁺ T-Zellen gelten als die Auslöser der ZNS-Entzündungsvorgänge. Insbesondere die beiden T-Helfer-Typen Th1- und Th17-Zellen sind die ursächlichen Mediatoren. Th1-Zellen galten lange Zeit als die pathogenen Effektorzellen bei EAE und Multipler Sklerose. Dies wurde durch Studien belegt, die zeigten, dass die Krankheitsschwere von MS mit der Menge von IL-12 und IFN γ im Serum und im ZNS sowie in der Zerebralflüssigkeit korreliert^{111, 112, 113}. Zusätzlich zeigte sich im EAE-Modell, dass T-bet-defiziente Mäuse (*Tbx21*^{-/-}) vor der Entwicklung der EAE geschützt sind¹¹⁴. Auch die Gabe von IL-12-neutralisierenden Antikörpern hatte im EAE-Modell einen protektiven Effekt¹¹⁵. In passiven Transferexperimenten wurde die pathogene Rolle von Th1-Zellen ebenfalls bestätigt, da deren adoptiver Transfer in Empfänger-mäusen EAE auslöste¹¹⁶. Paradoxe Weise zeigten IL-12- und IFN γ -defiziente Mäuse keine Protektion, sondern sogar eine verstärkte EAE^{117, 118}. Solche Studien warfen die Frage auf, ob Th1-Zellen alleine als Mediatoren für die ZNS-Inflammation angesehen werden können. Ein Teil dieser Frage wurde mit der Studie von Becher *et al.* 2002 beantwortet. Um die Rolle von IL-12 in der EAE zu untersuchen, wurden *Il12p40*^{-/-} und *Il12p35*^{-/-} knock-out Mäuse generiert¹¹⁸. IL-12 setzt sich aus den beiden Untereinheiten p40 und p35 zusammen. Es zeigte sich, dass das Fehlen der p40 Untereinheit einen schützenden Effekt hatte, wohingegen die Defizienz der p35-Untereinheit die EAE verstärkte¹¹⁸. Dieser Unterschied konnte aufgeklärt werden, als entdeckt wurde, dass neben der p35-Einheit auch p40 einen heterodimeren Komplex mit p19 bilden kann, was zur Bildung des Zytokins IL-23 führt. IL-23 ist ein wichtiges Differenzierungszytokin für pathogene Th17-Zellen. In den *Il12p40*^{-/-} Mäusen waren somit sowohl die Th1-als auch die Th17-Zellen betroffen, was sich in der Nichtausbildung von EAE-Symptomen niederschlug. In den *Il12p35*^{-/-} waren zwar die Th1-Zellen betroffen, aber dadurch, dass IL-23 noch produziert werden konnte, war eine vermehrte Anzahl an Th17 Zellen vorhanden, was sich in

einer Verstärkung der Krankheit äußerte¹¹⁹. Dadurch wurde belegt, dass neben den Th1-Zellen auch die Th17-Zellen eine wichtige Rolle in der Immunpathogenese der EAE spielen. Dies wurde durch Erkenntnisse bestätigt, dass *Il23p19*^{-/-} Mäuse vor EAE geschützt sind und IL-23 für die Ausbildung enzephalitogener Th17-Zellen wichtig ist^{61, 72}.

Die Rolle der Th17-Zellen und des Zytokins IL-17 für die humane MS-Erkrankung konnte durch die Anwesenheit von IL-17 im Blut, in der Zerebralflüssigkeit und in akuten Entzündungsherden im Gehirn von MS-Patienten nachgewiesen werden^{120, 121}. Der adoptive Transfer von Th17-Zellen im EAE-Modell zeigte sogar eine stärkere pathogene Induktion als der adoptive Transfer von Th1-Zellen⁷². Versuche mit IL-17-neutralisierenden Antikörpern erwiesen sich als therapeutisch wirksam, da dies eine Abmilderung der EAE zur Folge hatte¹²². Humane Th17-Zellen tragen auch zur Disruption der BHS bei, und für sie wurde sogar eine direkte Zerstörung von Neuronen nachgewiesen¹²³. Obwohl Th1- und Th17-Zellen auch alleine eine ZNS-Entzündung hervorrufen können – wenn auch mit unterschiedlichen Auswirkungen¹¹⁶ – so ist es die gemeinsame Wirkung beider T-Helfer-Zelltypen, die sich in der Stärke der Pathogenese der MS niederschlägt. Th1-Zellen rekrutieren vor allem Makrophagen und Monozyten, während Th17-Zellen für den Aufbau eines proinflammatorischen Milieus sorgen und Neutrophile aktivieren und rekrutieren. Mit Hilfe des EAE-Modells konnte gezeigt werden, dass es in der akuten Phase der EAE T-Helfer-Zellen gibt, die gleichzeitig sowohl IFN γ als auch IL-17A produzieren, und dass diese Population von Doppelproduzenten besonders pathogen ist⁷⁷. Diese spezielle Art IFN γ ⁺IL-17A⁺CD4⁺ T-Zellen findet sich auch bei der humanen MS¹²⁴.

Im Gegensatz zu Th1- und Th17-Zellen wird den Th2-Zellen und den Tregs eine protektive Rolle zugeschrieben. Th2-Zytokine, insbesondere IL-4, besitzen im Kontext von Autoimmunkrankheiten einen anti-inflammatorischen Effekt, d. h. sie dämpfen eine Entzündungsreaktion ein. Im EAE-Modell wurde gezeigt, dass die Gabe von IL-4 in einer abgeschwächten EAE mit weniger Demyelinisierung und einer verminderten Produktion von proinflammatorischen Zytokinen resultiert¹²⁵. Auch der adoptive Transfer von Th2-Zellen zeigte, dass eine Th2-Immunantwort einen schützenden Effekt hat¹²⁶. In der MS-Therapie gibt es daher Ansätze einen sogenannten Th1 zu Th2 *shift* hervorzurufen. Die Gabe von Tryptophan-Kataboliten erwies sich als ein therapeutisches Agens, welches eine protektive Veränderung einer Th1- zu einer Th2-Immunantwort in MS-Patienten hervorruft¹²⁷. Auch die Gabe von Glatirameracetat in Patienten mit RR-MS zeigt durch Förderung einer Th2-Immunantwort diese protektive Wirkung¹²⁸.

Wie bereits beschrieben, sind Tregs wichtige Zellen des Immunsystems, da sie für die Prävention von Autoimmunität wichtig sind. Zusätzlich tragen sie dazu bei, eine laufende Entzündungsreaktion zu kontrollieren und wieder einzudämmen. Im EAE-Modell zeigte sich, dass die Erholung (*recovery*) von EAE-Symptomen stark mit der Anzahl an $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ T-Zellen im Gehirn und der dadurch verbundenen IL-10-Sekretion korreliert^{129, 130, 131}. In MS-Patienten gibt es Hinweise, dass sich eine Störung in der Funktion von Tregs in der Stärke der Pathogenese niederschlägt. Zunächst belegen Studien eine reduzierte Anzahl an Tregs in MS-Patienten^{132, 133}. Zusätzlich gibt es aber auch Hinweise, dass die Suppressionseigenschaft von Tregs in MS-Patienten herabgesetzt ist^{134, 135, 136}. Daher wurden therapeutische Ansätze entwickelt, die Funktion von Tregs positiv zu beeinflussen bzw. ihre Anzahl zu erhöhen^{137, 138}. Als Therapie ist hier die Gabe von $IFN\beta$ zu nennen¹³⁸. Neben den $CD4^+$ T-Zellen spielen auch $CD8^+$ T-Zellen in der Immunpathogenese von MS/EAE eine wichtige Rolle. Grundsätzlich kann man sagen, dass $CD4^+$ T-Zellen (Th1 und Th17) die initialen Auslöser sind, während die Zerstörung der Axone und die Demyelinisierung – außer von Makrophagen – von $CD8^+$ zytotoxischen T-Zellen verursacht wird.

Studien zur Rolle von $CD8^+$ T-Zellen in MS-Patienten ergaben, dass $CD8^+$ T-Zellen in den Läsionsherden im ZNS zu finden sind und aus Patienten isolierte zytotoxische T-Zellen sehr effizient *in vitro* menschliche Oligodendrozyten, d. h. die Myelinschicht-bildenden Gliazellen um die Neurone, lysieren können^{50, 89, 139}. $CD8^+$ T-Zellen sind auch im EAE-Modell in der Lage, eine MS-ähnliche Krankheit hervorzurufen¹⁴⁰. Die lytische Wirkung auf Axone wird von den $CD8^+$ T Zellen zum einen durch direkte Zell-Zell-Kontakte, aber auch durch die Ausschüttung von Lymphotoxinen, vornehmlich $LT\alpha$ der TNF-Zytokinfamilie, hervorgerufen¹⁴¹. Diese von $CD8^+$ T-Zellen sekretierten Lymphotoxine sind in Läsionen nachweisbar und für Oligodendrozyten toxisch^{141, 142}. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass MBP-reaktive $CD8^+$ T-Zellen aus MS-Patienten proinflammatorische Zytokine wie $IFN\gamma$ und TNF sekretieren¹⁴³. In einer aktuellen Studie zur Rolle von IL-17A sezernierenden $CD8^+$ -Zellen (Tc17) konnte gezeigt werden, dass $CD8^+$ T-Zellen auf zweierlei Arten unterstützend für eine $CD4^+$ T-Zell Antwort im EAE-Modell wirken. Zum einen sind sie wichtig für die Infiltration von $CD4^+$ T-Zellen ins ZNS von EAE-Mäusen und zum anderen unterstützen sie durch die Sekretion von IL-17A die Th17-Immunantwort von $CD4^+$ T-Zellen im ZNS¹⁴⁴.

In den letzten Jahren wurde der Fokus der MS-Forschung auf die Funktion von B-Zellen ausgeweitet. B-Zellen können über verschiedene Mechanismen zur Immunpathogenese der MS beitragen^{145, 146}. Prinzipiell können sie als antigenpräsentierende Zellen wirken, die über

MHC-II Moleküle die Myelin-reaktiven T-Zellen aktivieren. Eine andere Funktion ist die Produktion von Autoantikörpern, die Myelinstrukturen erkennen und somit zur Zerstörung der Axone beitragen indem das Komplementsystem und phagozytierende Immunzellen aktiviert werden. So können beim EAE-Modell im Plasma der Mäuse Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein(MOG)-spezifische Autoantikörper nachgewiesen werden, und auch bei MS-Patienten finden sich ZNS-Antigen spezifische Autoantikörper^{147, 148}. Als dritte Komponente des B-Zell-Beitrages zur Pathogenese ist die Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen wie Lymphotoxinen und TNF zu nennen¹⁴⁶. Interessanterweise gibt es aber auch regulatorische B-Zellen, die durch die Sekretion von IL-10 und der Expression von CD1d und CD5 definiert sind. Diese regulatorischen B-Zellen zeigen im EAE-Modell einen protektiven Einfluss^{149, 150, 151}. Therapeutische Ansätze mit Rituximab, einem Antikörper, der B-Zellen über die Erkennung von CD20 depletiert, zeigen einen positiven Effekt auf den MS-Krankheitsverlauf, wobei hierbei neben der Depletion pathogener B-Zellen auch die Population an IL-10 produzierenden regulatorischen B-Zellen positiv beeinflusst wird¹⁵².

Bei der Immunpathogenese der Multiplen Sklerose sind also nicht nur CD4⁺ T-Zellen involviert. Trotzdem spielen sie eine zentrale Rolle, und zwar besonders zu Beginn der ZNS-Inflammation. Es sind die autoreaktiven T-Zellen, die als erstes in das ZNS einwandern und dann dort ein Milieu aufbauen, was zur Entwicklung einer schweren Entzündungsreaktion führt, bei der folgend andere Immunzellen beteiligt sind. Zusätzlich belegen die genetischen Prädispositionen, die menschliche MHC-II Gene (HLA-DR und HLA-DQ) betreffen, den zentralen Charakter der CD4⁺ T-Zell vermittelten MS-Induktion, da es CD4⁺ T-Zellen sind, die über MHC-II Moleküle von APCs die körpereigenen Peptide präsentiert bekommen. Insbesondere konnten im Blut von MS-Patienten stark vermehrt Autoantigen-spezifische CD4⁺ T-Zellen mit einem speziellen MOG₉₇₋₁₀₉ MHC-II-Tetramer detektiert werden¹⁵³.

3.2.2 Tiermodelle der Multiplen Sklerose

Alle Tiermodelle der Multiplen Sklerose können unter dem Überbegriff EAE zusammengefasst werden. Dabei handelt es sich um eine, experimentell durch Immunisierung mit Myelin-Antigenen hervorgerufene, ZNS-Entzündungsreaktion. Bereits 1933 wurde von Thomas M. Rivers dieses Tiermodell beschrieben. Er immunisierte Primaten mit einer Emulsion aus Kaninchengehirnen, was zu einer ZNS-Inflammation und Demyelinisierungen

im ZNS der Affen führte¹⁵⁴. Heute wird das EAE-Modell hauptsächlich in Nagetieren, wie Ratten und Mäuse, induziert. Es gibt verschiedene Ansätze dieses Tiermodells, die sowohl von der jeweiligen Maus-/Rattenlinie als auch von der Fragestellung abhängen. Das klassische Konzept ist die aktive Immunisierung mit Myelin-Antigenen, wie dem Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein (MOG), dem Myelin-Basisprotein (MBP) oder dem Proteolipid-Protein (PLP) zusammen mit Freund's Adjuvanz zur Anregung einer Immunreaktion¹⁰⁶. Dadurch werden CD4⁺ T-Zellen in der Peripherie durch Myelin-Antigene aktiviert, was zur Migration dieser Zellen ins ZNS und dort zu einer Reaktivierung der Myelin-spezifischen T-Zellen und zu einer darauf folgenden ZNS-Entzündungsreaktion führt. Die ersten Symptome einer EAE treten zwischen Tag acht und zehn nach Immunisierung auf. Grundsätzlich beginnt die EAE bei Mäusen zuerst mit einer Schwanzlähmung, die graduell voranschreitet und zu weiteren Lähmungserscheinungen, vor allem der Hinterläufe, führt. Manchmal kann auch eine Paralyse der Vorderbeine auftreten. Je nach Mauslinie und abhängig vom verwendeten Myelinpeptid kann man sowohl eine monophasische ZNS-Entzündungsreaktion sowie eine *relapsing-remitting* Reaktion induzieren^{105, 106}. In C57/BL6 Mäusen, die mit dem MOG₃₅₋₅₅-Peptid aktiv immunisiert wurden, entsteht die chronische oder monophasische Form der EAE. In diesem Modell erholen sich die Mäuse nach der Krankheitsspitze (*peak*) wieder. Das Modell der schubartigen Verlaufsform ist die aktive Immunisierung von SJL/J Mäusen mit PLP₁₃₉₋₁₅₁^{105, 106}. Neben der aktiven Immunisierung gibt es auch die Möglichkeit über adoptiven Transfer entweder direkt über Myelin-spezifische T-Zelllinien oder indirekt über Myelin-reaktive CD4⁺ T-Zellen, die zuvor aus einem immunisierten Spendertier isoliert werden, EAE zu induzieren¹⁰⁷.

Viele Erkenntnisse zur Rolle von Th1- und Th17-Zellen sowie den zusätzlich beteiligten Immunzellen bei einer MS-Erkrankung wurden mittels der EAE-Modelle gewonnen. Auch wurden einige therapeutische Ansätze, die erfolgreich bei Menschen angewendet werden, mit Hilfe von EAE-Modellen entwickelt. Hierbei ist zum Beispiel die tierexperimentelle Wirkungserforschung der IFN β -¹⁵⁵, Glatirameracetat-¹⁵⁶ und Natalizumab-¹⁵⁷ Therapie zu nennen. Allerdings gibt es prinzipielle Unterschiede zwischen dem Immunsystem des Menschen und der Maus, was das murine EAE-Modell eben nur zu einem Modellsystem der vielschichtigen MS-Erkrankung des Menschen macht. Wie aber im Abschnitt 3.2.1 beschrieben, finden sich viele Hinweise auf die zellulären Komponenten und Demyelinisierungsvorgänge, die während der ZNS-Inflammation im EAE-Modell zu finden sind, auch bei MS-Patienten wieder. Durch die vielen Möglichkeiten, die die unterschiedlichen EAE-Modelle bieten, kann man das breite Krankheitsspektrum gut

nachbilden. Der Vorteil, dass Mäuse genetisch manipuliert werden können, indem spezifische Gene inaktiviert werden, eröffnet die Möglichkeit, bestimmte Immunzell-assoziierte funktionelle Faktoren und deren pathogene Rolle im EAE-Modell zu erforschen. Dies stellt nicht nur für das Verständnis, sondern auch für die Entwicklung neuer und spezifischer MS-Therapien einen großen Nutzen dar.

3.3 Die Transkriptionsfaktoren *Nuclear Factor of Activated T cells* (NFAT)

Im Jahr 1988 wurde von Jeng Pyng Shaw aus der Arbeitsgruppe von Gerald Crabtree zum ersten Mal ein Proteinkomplex beschrieben, der in einer aktivierten human T-Zelllinie (Jurkatzellen) spezifisch an den Promotor des menschlichen *IL2*-Gens bindet¹⁵⁸. Zur gleichen Zeit wurde in murinen EL-4-Zellen ein spezifischer Faktor, der an mehreren Stellen des *IL2*-Promotors mit hoher Affinität bindet, gefunden¹⁵⁹. Dieser durch T-Zell-Stimulation induzierbarer Faktor wurde als *Nuclear Factor of Activated T cells* (NFAT) definiert. Seit dieser ersten Beschreibung wurden weitere NFAT-Transkriptionsfaktoren entdeckt, so dass man heutzutage von einer NFAT-Transkriptionsfaktorfamilie spricht. Innerhalb des Immunsystems ist die Expression von Mitgliedern der NFAT-Transkriptionsfaktorfamilie nicht nur auf T-Zellen beschränkt. NFAT-Faktoren werden auch in B-Zellen, dendritischen Zellen, Makrophagen, Mastzellen und Megakaryozyten exprimiert^{151, 160, 161, 162, 163}. Auch ist mittlerweile bekannt, dass Mitglieder dieser Familie nicht nur in Zellen des hämatopoetischen Systems, sondern auch in vielen anderen Körperzellen, wie in Herz-, Nieren-, Muskel- und Endothelzellen, Osteoklasten sowie Stammzellen exprimiert werden^{164, 165, 166, 167, 168}. Neben der Regulation der Funktion und Differenzierung von Immunzellen steuern NFAT-Faktoren auch wichtige Entwicklungsschritte während der Embryogenese. So sind sie bei der Entwicklung von Organen wie dem Herzen, der Niere, der Haut, dem Skelett und dem Muskelapparat als auch bei der Ausbildung des Blutgefäßsystems involviert^{160, 169, 170}.

Die Familie der NFAT-Transkriptionsfaktoren besteht aus fünf Mitgliedern: NFATc1, NFATc2, NFATc3, NFATc4 und NFAT5 (auch *tonicity enhancer binding protein*, TonEBP). Diese Transkriptionsfaktoren bestehen aus verschiedenen strukturellen Domänen, welche unterschiedlich stark zwischen den einzelnen Familienmitgliedern konserviert sind (siehe Abbildung 3.3). Zu diesen Domänen zählt eine regulatorische Domäne, die als NFAT-Homologie Region (NHR) bezeichnet wird. Diese regulatorische Domäne grenzt an eine Transaktivierungsdomäne (TAD) nahe des N-terminus und umfasst viele regulatorische

Motive, wie die Calcineurinbindungsstelle und Phosphorylierungsstellen, die in Serin-reichen Aminosäuresequenzmotiven SRR (*serin rich repeats*) und SP (*SPXX-repeat*) organisiert sind, sowie eine Kerntranslokationssequenz (*nuclear localisation sequence*, NLS). Unaktiviert liegen die NFAT-Proteine – an den Serin-reichen Motiven phosphoryliert – im Zytoplasma vor. Eine hochkonservierte Strukturdomäne für die DNA-Bindung wird als REL-Homologie-Region (RHR) bezeichnet. Diese Struktur erhält ihren Namen aus der strukturellen Ähnlichkeit mit Transkriptionsfaktoren der REL-Proteinfamilie (NF- κ B Transkriptionsfaktorfamilie). Auf diese Struktur folgt der C-terminale Teil eines NFAT-Proteins, der bei den einzelnen Isoformen jedes Faktors unterschiedlich lang ausfällt, bzw. – wie im Falle von NFATc1/ α A – fehlt^{160, 169, 171}.

Die Familienmitglieder NFATc1 bis NFATc4 besitzen eine Calcineurinbindungsstelle mit der Konsensussequenz PxIxIT (x steht für eine beliebige Aminosäure) und werden durch den Calcium (Ca^{2+})-Signalweg reguliert^{164, 169}. Das fünfte Familienmitglied dagegen wird in Zellen vor allem durch osmotischen Stress induziert^{172, 173}.

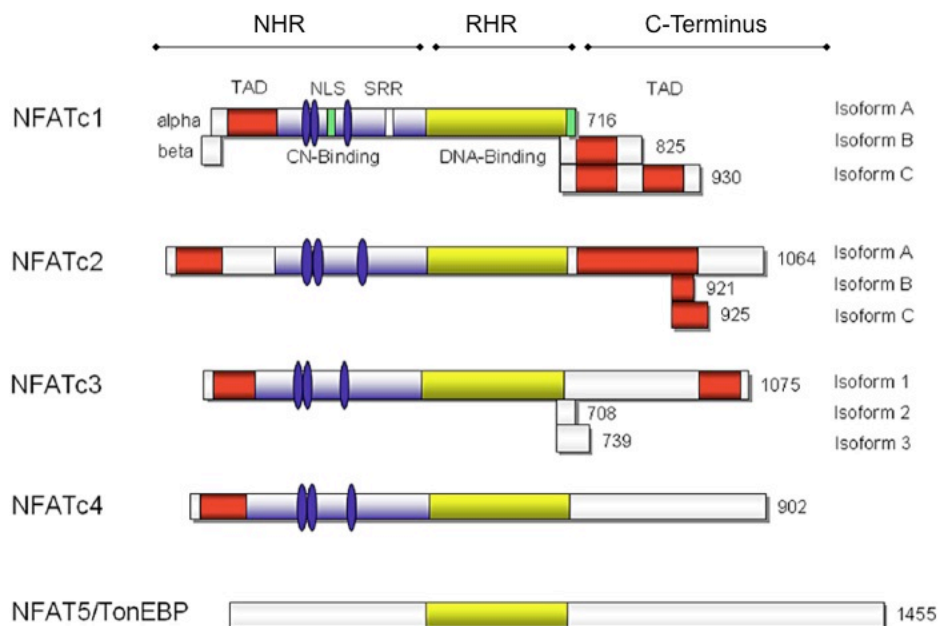


Abbildung 3.3: Die Familie der NFAT-Transkriptionsfaktoren

Dargestellt sind alle fünf Mitglieder der NFAT-Proteinfamilie. Die Domänenstruktur ist zwischen den einzelnen Mitgliedern unterschiedlich stark konserviert. Prinzipiell besitzen sie aber alle den gleichen Aufbau in die NHR- und RHR-Domänen und den C-Terminus. Zusätzlich kommen NFATc1, NFATc2 und NFATc3 in mehreren Isoformen vor. Abbildung verändert nach Serfling¹⁷⁴.

Im Folgenden soll auf den Mechanismus der NFAT-Aktivierung in Lymphozyten durch den Ca^{2+} -Signalweg eingegangen werden (siehe Abbildung 3.4). Nach Immunzellrezeptorstimulation, d. h. nach Stimulation des TCR bei T-Zellen und des BCR bei B-Zellen, aber auch von $\text{Fc}\gamma$ -Rezeptoren wird über Rezeptor-assoziierten Tyrosin-Kinasen die Phospholipase $\text{C}\gamma$ ($\text{PLC}\gamma$) aktiviert. Diese hydrolysiert daraufhin das in der Plasmamembran vorliegende Phospholipid Phosphatidyl-Inositol-4,5-Bisphosphat ($\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$) zu Diacylglycerol (DAG) und Inositol-1,4,5-Triphosphat (InsP_3). Letzteres bindet an seine Rezeptoren (InsP_3 -R), die in der Membran des endoplasmatischen Retikulums (ER) vorliegen und induziert dadurch die Freisetzung von Ca^{2+} aus den intrazellulären Speichern des ER in das Zytoplasma. Spezielle Sensoren in der Membran des ER, die sogenannten STIM1- und STIM2-Moleküle (*stromal interaction molecule*, STIM) registrieren diese Ausschüttung an Ca^{2+} und regen die Öffnung der CRAC-Kanäle (*calcium-release-activated calcium channels*, CRACs) in der Plasmamembran an, was zu einer weiteren Erhöhung der Ca^{2+} Konzentration im Zytoplasma führt. Dort wird die Ca^{2+} -sensitive Phosphatase Calcineurin durch das Calciumsensorprotein Calmodulin aktiviert¹⁷⁵. Aktiviertes Calcineurin bindet an das PxIxIT-Motiv der Calcineurinbindungsstelle in der NHR-Domäne der NFAT-Proteine. Die Phosphataseaktivität von Calcineurin führt zu einer Dephosphorylierung und der damit verbundenen Exposition der Kernlokalisationssequenz, wodurch die so aktivierten NFAT-Transkriptionsfaktoren aus dem Zytoplasma in den Kern transportiert werden.

Im Kern vermitteln die NFAT-Transkriptionsfaktoren durch Bindung an Zielgene deren Expression^{160, 169}. NFAT-Faktoren binden meist in heterodimeren Komplexen mit verschiedenen transkriptionellen Partnern an die DNA. Hier sind die Mitglieder der AP1-Proteine (Aktivatorprotein 1), FOS und JUN, zu nennen¹⁷⁶. Je nach Zelltyp und Stimulationsbedingungen interagiert NFAT aber auch mit anderen Transkriptionsfaktoren, z. B. mit T-bet oder GATA3^{177, 178}. Unter Anergie-Induktion bilden sich dem gegenüber vor allem homodimere NFAT-Komplexe aus^{179, 180}.

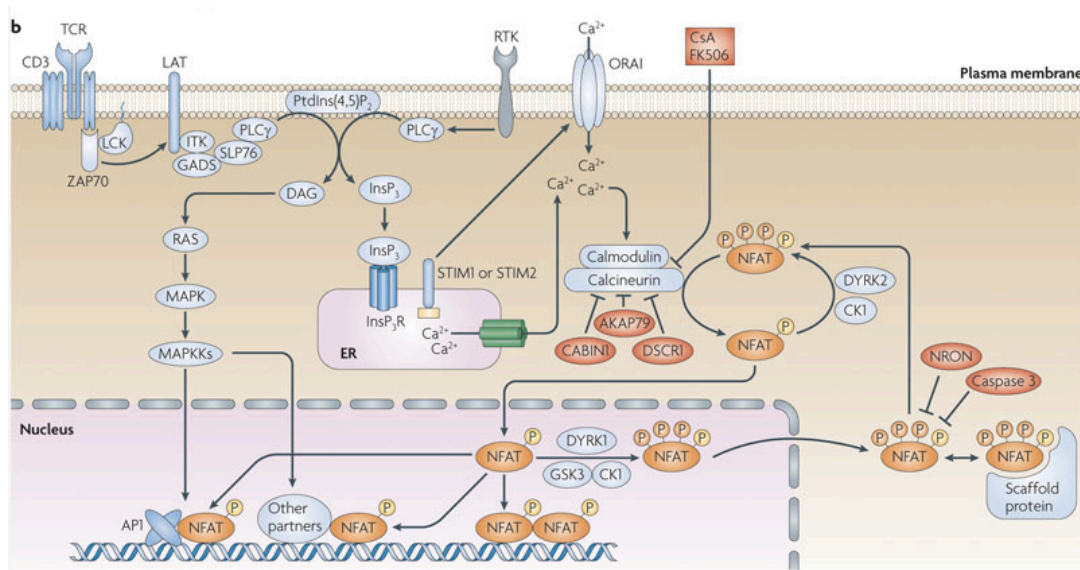


Abbildung 3.4 : Die Aktivierung von NFAT durch den Ca²⁺ Signalweg

Nach TCR-Aktivierung wird eine Signalkaskade angeschaltet, welche nach Hydrolyse von PtdIns(4,5)P₂ zu DAG und InsP₃ zu einem Ca²⁺-Ausstrom aus intrazellulären Speichern des ER führt. Zusätzlich wird ein Ca²⁺-Einstrom aus dem extrazellulären Raum in das Zytoplasma über CRAC-Kanäle angeregt. Durch diese Erhöhung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration wird Calcineurin aktiviert. Diese Phosphatase dephosphoryliert die NFAT-Faktoren. Nach Exposition der Kernlokalisationssequenz (NLS) wandert NFAT in den Zellkern und erfüllt dort seine Funktion als Transkriptionsfaktor. Hierbei bindet NFAT zusammen mit anderen transkriptionellen Partnern an Zielgene. Dieser Weg der NFAT Aktivierung kann durch verschiedene Inhibitoren (rot) und durch spezielle Kinasen, wie DYRK1/2, CK1 und GSK3, blockiert werden. Abbildung aus Müller,Rao.¹⁶⁰

Der Ca²⁺-regulierte Signalweg kann auf verschiedenen Ebenen kontrolliert werden. Zum einen gibt es innerhalb des Zytoplasmas Kinasen, die den Phosphorylierungsstatus der NFAT-Proteine aufrechterhalten und damit den Kerntransport blockieren. Diese werden als „Erhaltungskinasen“ bezeichnet. Hier sind die CK1-Kinase und die DYRK2-Kinase zu nennen^{160, 181, 182}. Zusätzlich gibt es Kinasen (GSK3, DYRK1 und CK1), die innerhalb des Zellkerns die aktivierten NFAT-Faktoren re-phosphorylieren und somit für den Export zurück ins Zytoplasma sorgen. Diese Kinasen werden auch als Exportkinasen bezeichnet^{181, 183}. Für die Stabilisierung des zytoplasmatischen, also des phosphorylierten Zustands der NFAT-Proteine, dienen sogenannte Gerüstproteine (*scaffold proteins*). Diese bilden stabile Proteinkomplexe um die NFAT-Faktoren aus, wodurch die aktivierende Dephosphorylierung durch Calcineurin erschwert wird¹⁸⁴. Weiterhin kann die Calcineurin-vermittelte NFAT-Aktivierung durch unterschiedliche Inhibitoren von Calcineurin blockiert werden. Die endogenen Inhibitoren umfassen CABIN1, Calcipressin (CSP), Rcan1 (DSCR1) und AKAP79^{160, 169}. Experimentell kann Calcineurin durch die Gabe von Cyclosporin A (CsA) oder Tacrolimus (FK506) effektiv gehemmt und so die Aktivierung von NFAT blockiert werden. Die Wirkung dieser Inhibitoren beruht auf der Blockade der Calcineurin-Funktion.

Diese Inhibition ist nicht NFAT-spezifisch, da auch andere Transkriptionsfaktoren, wie NF- κ B, durch Calcineurin reguliert sind und somit auch gehemmt werden können. Anhand des PxIxIT Motivs, welches von Calcineurin spezifisch in der Aminosäuresequenz von NFAT-Proteinen erkannt wird, konnte ein synthetisches Peptid generiert werden, welches durch kompetitive Hemmung die direkte Calcineurin-NFAT-Interaktion blockiert. Dieses Peptid heißt entsprechend seiner Aminosäureabfolge VIVIT. Calcineurin besitzt eine deutlich höhere Affinität für VIVIT als für das PxIxT-Motiv der NFAT-Proteine. Dadurch kann sehr spezifisch die NFAT-Aktivierung verhindert werden¹⁸⁵. Da es von diesem synthetischen Peptid mittlerweile zellpermeable Versionen gibt – was zum Beispiel durch Anhängen von elf Argininresten (11R-VIVIT) erreicht wurde¹⁸⁶ – bietet dies neue therapeutische Ansätze zur Immunsuppression. CsA wird schon seit vielen Jahren nach Organtransplantationen zur Suppression des Immunsystems eingesetzt. Die Behandlung ist allerdings mit deutlichen Nebenwirkungen verbunden, wobei CsA vor allem zu Leber- und Nierenschädigungen führt, da nach neueren Erkenntnissen in den T-Zellen selbst neben NFAT auch NF- κ B inhibiert wird¹⁸⁷.

Es gibt nicht nur verschiedene Signale, die zur Ca²⁺-Mobilisierung und NFAT-Aktivierung führen, sondern auch Regulationsmechanismen, die die NFAT-Expression selbst betreffen. Von den in Immunzellen exprimierten NFAT-Proteinen, nämlich NFATc1, NFATc2 und NFATc3, werden die beiden letzteren konstitutiv exprimiert. Eine besondere Rolle nimmt NFATc1 ein. Dieses Familienmitglied kommt in insgesamt sechs Isoformen vor, die durch die zwei Promotoren P1 und P2 sowie durch unterschiedliche Spleiß- und Polyadenylierungsstellen generiert werden. Grundsätzlich kann man zwischen drei Hauptisoformen NFATc1/A, NFATc1/B und NFATc1/C (siehe Abbildung 3.3), die in der Länge ihres C-Terminus variieren, unterscheiden. Die beiden langen Isoformen NFATc1/B und NFATc1/C werden hauptsächlich konstitutiv exprimiert, was durch den P2-Promotor und der nach den B- und C-Exonen angeordneten Polyadenylierungsstelle pA2 gesteuert ist. Die kurze Isoform NFATc1/ α A ist dagegen durch Antigen-Rezeptorstimulation auf T- und B-Zellen induzierbar, da dadurch präferentiell der induzierbare P1 Promotor und die vor den B- und C-Exonen gelegene Polyadenylierungsstelle pA1 verwendet wird. Durch einen positiven *feedback loop* von NFATc1/A auf seine eigene Expression, dominiert nach Immunrezeptor-Aktivierung hauptsächlich die kurze Isoform NFATc1/ α A in T- und B-Zellen^{188, 189}.

Ein weiterer Mechanismus der Feinregulation der NFAT-Funktion ist die posttranslationale Modifikation durch SUMO-Proteine (*small ubiquitin-like modifier*, SUMO)^{190, 191}, die

sogenannte SUMOylierung. Diese Modifikation von Transkriptionsfaktoren resultiert oft in einer Veränderung der Funktion. So wird oft ein Aktivator zu einem Repressor¹⁹². Oder es werden über die Interaktion mit der SUMO-Einheit andere transkriptionelle Partner zur Expression von Zielgenen hinzugezogen, was dann in einer stärkeren oder schwächeren Induktion der Genexpression resultiert¹⁹². Die SUMOylierung erfolgt häufig an Lysinen die innerhalb der Konsensussequenz Ψ -Lys-X-Glu/Asp liegen (Ψ muss eine hydrophobe Aminosäure sein)¹⁹². Für NFATc2 wurden zwei Lysine publiziert, welche SUMOyliert werden, nämlich Lys(684) und Lys(897). Diese SUMOylierung von NFATc2 stellt einen Mechanismus einer Kernverankerung und damit der Beeinflussung der transkriptionellen Aktivität der unterschiedlichen Isoformen dar¹⁹⁰. Auch für NFATc1 wurde von Nayak *et al.* gezeigt, dass die lange Isoform NFATc1/C zwei SUMOylierungsmotive aufweist und an den Lysinen Lys(702) und Lys(914) SUMOyliert wird. *In vitro* Studien zur Funktion der SUMOylierung von NFATc1/C zeigten, dass im Kontext der *Il2*-Transkription Histon-Deacetylasen (HDACs) rekrutiert werden sobald NFATc1/C SUMOyliert ist. Diese Rekrutierung von HDACs und damit verbundener Deacetylierung von Histonen, erfolgt in sogenannten promyelotischen Leukämie-Kernkörperchen (*promyelocytic leukemia nuclear bodies*, PML-nbs). Diese Rekrutierung in die PMLs zieht eine lokale Deacetylierung von Histonen im *Il2*-Promotor nach sich¹⁹¹. Neben dieser Repression der *Il2*-Genexpression werden Effektorzytokine wie IL-13 und IFN γ gegenläufig durch die SUMOylierung reguliert, was in einer verstärkten Transkription resultiert¹⁹¹. Somit stellt diese besondere posttranslationale Modifikation einen Mechanismus der Feinregulation der einzelnen Isoformen von NFATc1-Proteinen dar, was spezifisch die lange Isoform NFATc1/C betrifft.

3.3.1 Die Rolle von NFAT in Lymphozyten

NFAT-Proteine, besonders NFATc1 und NFATc2, sind wichtige funktionelle Regulatoren der Genaktivität in Lymphozyten. So wurde NFAT ursprünglich als IL-2-induzierender Transkriptionsfaktor in aktivierten T-Zellen entdeckt^{158, 159}. Seit dieser Entdeckung wurden weitere wichtige Funktionen beschrieben, die NFAT-Familienmitglieder in Lymphozyten steuern. So spielen sie eine Rolle bei der Entwicklung von T-Zellen und bei der CD4⁺ T-Helfer-Zelldifferenzierung. Außerdem sind sie wesentlich an Mechanismen der T-Zell-vermittelten Toleranz beteiligt, da sie nicht nur Aspekte des *Activation-induced cell death* (AICD) und der Anergie von T-Zellen^{171, 193}, sondern auch die Entwicklung von iTregs

regulieren¹⁹⁴. Die Induktion von T-Zell-Anergie beruht auf der Kerntranslokation von NFAT, die aufgrund der TCR-Stimulation in Abwesenheit von CD28-Kostimulation hervorgerufen wird. Fehlt die Aktivierung der NF- κ B und MAPK-Signalwege durch CD28, so kann NFAT keine heterodimeren Komplexe mit AP1-Proteinen im Zellkern ausbilden. Dies führt dann nicht zur Induktion des T-Zellaktivierungsprogramms, sondern von Genen, die mit der Anergie-Entstehung, assoziiert sind. Auf diese Weise werden T-Zellen anergisiert, d. h. sie können nachfolgend nicht mehr auf TCR-Signale reagieren¹⁹⁵.

Neben T-Zellen steuern Mitglieder der NFAT-Transkriptionsfaktorenfamilie aber auch Differenzierungsmechanismen und die Funktion von B-Zellen. NFATc1 reguliert nicht nur die Entwicklung von B-Zell-Subtypen, sondern auch ihre Funktion und Antikörperproduktion. So gibt es Studien, die zeigen, dass die Defizienz von NFATc1 in Mäusen zu einem Fehlen der B-1a B-Zellpopulation führt, wohingegen die Defizienz von NFATc2 keinen Einfluss auf die Entwicklung dieser B-Zellen hat¹⁹⁶. B-1a B-Zellen sind eine Untergruppe von peripheren B-Zellen, die durch die Expression von CD5, CD43, IgM und B220 definiert sind. Diese B-Zellen sezernieren in hohem Maße IgM und IgA. Da die CD5-Expression durch NFATc1 gesteuert wird, ist die Defizienz von diesem Familienmitglied mit einer Differenzierungsstörung der B-1a Zellen verbunden¹⁹⁶. Auch eine Studie von Bhattacharyya *et al.* aus dem Jahr 2011 untersuchte die Defizienz von NFATc1 in Knochenmarks-, Milz- und Keimzentrums-B-Zellen. Hierbei konnte gezeigt werden, dass NFATc1 ein wichtiger Faktor in B-Zellen der Milz ist, der die Proliferation nach BCR-Stimulation steuert. Die Defizienz von NFATc1 resultierte in funktionellen Störungen von B-Zellen der Milz. Diese zeigten eine Störung der T-Zell unabhängigen Typ-II Antigen Immunantwort und der dazugehörigen IgG3-Antikörperproduktion sowie einen verminderten Ca^{2+} Einstrom nach BCR-Stimulation von B-Zellen. Zusätzlich äußerte sich das Fehlen von NFATc1 auch in einer erhöhten Produktion von IL-10 durch B-Zellen, was in einer verminderten EAE resultierte¹⁵¹.

Wie wichtig NFAT in Lymphozyten ist wurde anhand von verschiedenen NFAT-*knock-out* Mäusen belegt. So zeigen NFATc2-defiziente Mäuse eine Lymphozyten-assoziierte Hyperproliferation, die mit einer erhöhten T- und B-Zellimmunantwort einhergeht. So ist die Keimzentrumsbildung erhöht und CD4^+ T-Zellen zeigen eine deutlich verstärkte Th2-Immunantwort mit erhöhter IL-4- und verminderter $\text{IFN}\gamma$ -Produktion^{197, 198, 199}. Die totale Defizienz von NFATc1 ist in Mäusen aufgrund einer gestörten Herzentwicklung embryonal letal. Nach Komplementation von RAG2-defizienten Blastozysten resultierte das Fehlen von NFATc1 in einer eingeschränkten Proliferation von T-Zellen und einer reduzierten

Besiedelung von Thymus und peripheren lymphoiden Organen. Ebenso wurde ein Defekt in der Th2-Antwort gezeigt^{200, 201}. Die Defizienz von NFATc3 hat massive Auswirkungen auf die thymale Entwicklung von CD4 und CD8 einzel-positiven T-Zellen und einer erhöhten Apoptoserate von doppel-positiven Thymozyten zur Folge²⁰². Auch doppel-defiziente Mäuse für NFATc1 und NFATc2, sowie NFATc2 und NFATc3 zeigen eine massive Störung der Lymphozytenfunktionen^{201, 203, 204}. So wurde für die Doppeldefizienz von NFATc1/c2 und NFATc2/c3 gezeigt, dass die Population an iTregs in ihrer Entwicklung und in der Induktion von Foxp3 gestört ist, was sich in der Anzahl an iTregs niederschlägt. Allerdings ist die Funktion dieser doppel-defizienten iTregs nicht eingeschränkt¹⁹⁴.

Für den doppelten *knock-out* von NFATc2 und NFATc3 ist gezeigt worden, dass dieser den Einzelphänotyp der NFATc2-defizienten Maus deutlich verstärkt, was in massiver Hyperproliferation von peripheren B- und T-Zellen, sowie in einer massiven Th2-Immunantwort resultierte²⁰⁴. Zusätzlich zeigten diese Mäuse, bedingt durch die starke Herabregulierung des Liganden FasL, eine Resistenz gegenüber dem programmierten Zelltod (Apoptose)^{171, 203, 205}.

3.3.2 NFATc1 und NFATc2 in CD4⁺ T-Zellen

In diesem Abschnitt soll auf die Funktionen von NFATc1 und NFATc2 bei der T-Helfer-Zellentwicklung sowie bei der Differenzierung und Funktion von Tregs eingegangen werden. Diese beiden Transkriptionsfaktoren der NFAT-Familie sind in CD4⁺ T-Zellen besonders stark exprimiert und scheinen in verschiedenen Aspekten funktionelle Gegenspieler zu sein. Die Differenzierung von T-Helfer-Zellen erfolgt in der Peripherie aus naiven CD4⁺ T-Zellen, die von APCs Peptide von Pathogenen im Kontext mit MHC-II-Molekülen präsentiert bekommen. Der Prozess der T-Helfer-Zellentwicklung beginnt mit einer primären Stimulation des TCRs. In dieser ersten Phase der T-Helfer-Zellentwicklung werden durch den TCR-vermittelten Ca²⁺-Signalweg NFAT-Transkriptionsfaktoren aktiviert, die dann im Zellkern zusammen mit transkriptionellen Partnerproteinen an Zielgene binden und deren Genexpression induzieren. Somit nehmen NFAT-Faktoren eine essentielle Rolle bei der T-Helfer-Zelldifferenzierung ein, weil neben dem umgebenden Zytokinmilieu die TCR-Stimulationsstärke durch das Antigen die spezifische Differenzierungsrichtung in Th1-, Th2- oder Th17-Zellen definiert^{206, 207}. Hierbei spielt die Kooperation von NFAT mit unterschiedlichen STAT-Faktoren eine wichtige Rolle, da diese Kooperation die Induktion

der Genexpression der linienspezifischen „Master“-Transkriptionsfaktoren, wie T-bet (Th1), GATA3 (Th2), ROR γ t (Th17) induziert^{169, 208}. Im Falle der Foxp3-Expression in iTregs kooperiert NFAT mit Smad-Faktoren¹⁹⁴. NFAT-Faktoren sind auch bei der Expression von T-Helfertyp spezifischen Zytokinen und Zytokinrezeptoren beteiligt, indem sie sowohl mit STAT-Faktoren als auch mit den „Master“-Transkriptionsfaktoren der einzelnen T-Helfer-Zelltypen interagieren. Eine weitere Rolle bei der Differenzierung der CD4⁺ T-Helfer-Zellen übernehmen NFAT-Faktoren bei der epigenetischen Stabilisierung der Genexpression für die jeweilige T-Helfer-Zell-Richtung¹⁶⁹. Durch Modifikationen des Chromatins werden die Gene, die für die Differenzierung zum jeweiligen T-Helfer-Zelltyp notwendig sind, besonders für Transkriptionsfaktoren zugänglich gemacht und nicht benötigte Gene stillgelegt. Diese Umstrukturierung des Chromatins involviert NFAT-Faktoren. Dies bewirkt zum Beispiel, dass NFATc2 zwar prinzipiell an die Promotoren der *Il4*- und *Ifng*-Gene binden kann, aber in Th1-Zellen es bevorzugt an den *Ifng*-Promotor und in Th2-Zellen bevorzugt an den *Il4*-Promotor bindet¹⁷⁷.

Im Fall der Th1-Zelldifferenzierung ist bekannt, dass NFATc2 an den Promotor und an Enhancerelemente des *Ifng*-Gens binden und so dessen Transkription induzieren kann^{209, 210, 211}. Da die DNA-Bindungsmotive für NFATc1 und NFATc2 konserviert sind, bindet mit hoher Wahrscheinlichkeit auch NFATc1 an Regionen des *Ifng*-Gens, um dessen Expression zu induzieren. In einem Ansatz mit einer konstitutiv aktiven Form von NFATc1 konnte passend dazu gezeigt werden, dass das eine erhöhte IFN γ -Produktion in Th1-Zellen hervorruft²¹². Durch die Expression von IFN γ wird über einen autokrinen Weg mehr STAT1 induziert, welches zusammen mit NFAT wiederum die Expression von T-bet verstärkt²⁰⁸. NFAT-Faktoren, insbesondere NFATc1 und NFATc2 sind also im Falle der Th1-Zelldifferenzierung nicht nur bei der primären Induktion der Differenzierung involviert, sondern auch an der Stabilisierung der Th1-Entwicklung.

Auch an der Th2-Differenzierung sind NFAT-Transkriptionsfaktoren beteiligt. Durch direkte Bindung an den *Il4*-Promotor trägt NFATc2 zur Induktion der *Il4*-Expression bei. Zusätzlich hilft NFATc2 bei der Stabilisierung der Th2-Zelllinie, da es zusammen mit GATA3, dem „Master“-Transkriptionsfaktor der Th2-Linie, bindet und zum anderen auch an die Promotoren der *Il13*- und *Il5*-Gene^{208, 213, 214}. Die Bindungen von NFATc2 an diese Zytokinpromotoren erfolgt ausschließlich in Th2-Zellen. Als transkriptionelle Partner dienen NFATc2 hierbei GATA3, STAT6, c-Maf und IRF4^{59, 208}. Für NFATc2 ist gezeigt worden, dass es in Kooperation mit IRF4 an einen Th2-spezifischen Enhancer des *Il10*-Gens bindet²¹⁵. Interessanterweise ist die *Il4*-Induktion durch

NFATc2 ein Prozess, der vor allem bei der primären Stimulation von Th2-Zellen stattfindet. Sobald die Th2-Richtung festgelegt ist und es zu einer erneuten Aktivierung durch ein Antigen kommt, nimmt NFATc2 eine repressive Rolle bei der *Il4*-Genexpression ein²¹⁶. Dies erklärt den Phänotyp von NFATc2-defizienten Mäusen, die zwar primär einen Defekt in der IL-4-Produktion zeigen, aber bei Sekundärstimulation der CD4⁺ T-Zellen eine überschießenden Th2-Immunantwort mit erhöhter Sekretion von IL-4 und anderen Th2-assoziierten Zytokinen zeigen.

Zur Differenzierung von Th17-Zellen gibt es ebenfalls Studien, die belegen, dass NFATc1 und NFATc2 Faktoren an linienspezifische Gene binden und diese zusammen mit transkriptionellen Partnern aktivieren. NFAT bindet an alle Promotoren der Th17-Leitzytokine, wie IL-17A, IL-17F, IL-21 und IL-22²⁰⁸. In einer Studie aus dem Jahr 2009 konnte gezeigt werden, dass NFATc1 direkt an den *Il17a*-Promotor bindet und an dessen Expression beteiligt ist²¹⁷. Ebenso konnte gezeigt werden, dass das humane *IL17a*-Gen zwei NFAT-Bindungsstellen aufweist und sowohl NFATc1 als auch NFATc2 dort binden²¹⁸. NFATc2 bindet zusätzlich auch an distale regulatorische Elemente von *Il17*-Genen²¹⁹. Zusätzlich ist bekannt, dass IRF4 ein entscheidender Transkriptionsfaktor bei der Th17 T-Zellentwicklung und bei der Linienstabilisierung durch Heraufregulation des IL23-Rezeptors ist und es direkte Bindungen mit NFATc1 und NFATc2 eingehen kann^{59, 220, 221}. Zusammen mit STAT3 vermitteln NFAT-Faktoren die Induktion des „Master“-Transkriptionsfaktors der Th17-Zellen, ROR γ t²⁰⁸. Zusätzlich vermittelt ROR γ t zusammen mit NFAT-Faktoren die Expression weiterer Th17-Gene, was zur Stabilisierung der Th17-Differenzierung beiträgt. Für die wichtige autokrine Proliferation von Th17-Zellen ist das Zytokin IL-21 zuständig. *Il21* ist ebenfalls ein Zielgen von NFAT-Faktoren²²². Da NFAT-Faktoren an viele Zielgene in Th17-Zellen binden, spielen sie neben anderen Transkriptionsfaktoren – mit denen sie synergistisch wirken – eine entscheidende Rolle bei der Th17-Differenzierung.

Neben der Funktion von NFAT, die für eine Immunantwort wichtige CD4⁺ T-Helfer-Zellentwicklung zu regulieren, sind NFAT-Faktoren bei der Kontrolle einer Immunantwort durch iTregs involviert. Beide Typen an regulatorischen T-Zellen, die nTregs und die iTregs, sind durch die Expression des Transkriptionsfaktors Foxp3 gekennzeichnet. Die Expression des *Foxp3*-Gens wird durch mehrere distale regulatorische Elemente gesteuert, welche unterschiedlich in nTregs und iTregs reguliert sind²²³. Bei dieser differentiellen Regulierung der *Foxp3*-Expression sind NFAT Faktoren involviert. So bindet NFAT zusammen mit Smad3 speziell an das Enhancerelement CNS1 des *Foxp3*-Gens, welches für die Expression

von Foxp3 bei der Entwicklung der peripheren iTregs notwendig ist, nicht aber an das für nTregs entscheidende CNS3^{194, 223, 224}. Hierbei scheint nicht unbedingt ein spezifischer NFAT-Faktor ausschlaggebend zu sein, sondern vielmehr ist die Menge an NFAT-Faktoren wichtig¹⁹⁴. Diese NFAT-Abhängigkeit der Foxp3-Induktion in Antwort auf TGFβ-Stimulation ist spezifisch für die Differenzierung von peripheren iTregs, da eine Defizienz von NFAT-Faktoren keinen Einfluss auf die Population der nTregs hat¹⁹⁴. Diese Unabhängigkeit der nTregs von NFAT konnte auch in einer Studie von Bopp *et al.* aus dem Jahr 2005 gezeigt werden. Diese wies nach, dass der kombinierte Verlust von NFATc2 und NFATc3 sich nicht auf Menge und damit auf die Entwicklung sowie auf die suppressive Funktion von nTregs auswirkt²²⁵. Zusammengefasst wurden viele zentrale Aufgaben der NFAT-Faktoren bei der Entwicklung und der Funktion von peripheren CD4⁺ T-Zellen – seien es T-Helferzellen oder iTregs – belegt.

3.4 Zielsetzung der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, welche funktionelle Rolle die einzelnen Mitglieder der NFAT-Transkriptionsfaktorfamilie, insbesondere NFATc1 und NFATc2, bei der Immunpathogenese der EAE, dem Tiermodell der humanen Autoimmunkrankheit MS, einnehmen. NFAT-Faktoren sind wichtige Regulatoren in Immunzellen, insbesondere in Lymphozyten. Nach Aktivierung durch den jeweiligen Antigenrezeptor steuern NFAT-Faktoren eine Vielzahl von funktionell wichtigen Zielgenen in Lymphozyten.

EAE und MS sind inflammatorische Erkrankungen des zentralen Nervensystems, die durch autoreaktive CD4⁺ T-Zellen ausgelöst werden. diesem Fall Myelin-reaktive CD4⁺ T-Zellen nach Antigenkontakt aktiviert werden und in das ZNS einwandern. Nach Reaktivierung im ZNS sind CD4⁺ T-Zellen entscheidend am Aufbau eines proinflammatorischen Milieus durch Ausschüttung von pathogenen Th1- und Th17-Zytokinen beteiligt. In dessen Folge kommt es zu einer Entzündungsreaktion mit massiven Schäden an der schützenden Myelinschicht von Neuronen und Axonen. Da NFAT-Faktoren nicht nur eine Rolle bei der Aktivierung von CD4⁺ T-Zellen besitzen, sondern auch maßgeblich an der Differenzierung zu Th1-, Th2- und Th17-Zellen beteiligt sind, sollte mit Hilfe unterschiedlicher NFAT knock-out Mauslinien der Verlust der beiden Faktoren NFATc1 und NFATc2 sowie er SUMOylierung von NFATc1/C auf den Krankheitsverlauf der EAE untersucht werden. Mit dem Ziel die Inhibition einzelner NFAT-Faktoren – oder der Modifikation dieser – als mögliches Ziel in der MS-Therapie zu identifizieren. Eine Therapie mit CsA, welches NFAT-Faktoren durch Inhibition des Ca²⁺-Signalwegs in ihrer Funktion blockiert, ist von vielen starken Nebenwirkungen begleitet. Da es auch andere durch den Ca²⁺-Signalweg gesteuerte Transkriptionsfaktoren, wie NF-κB inhibiert. Mit Hilfe der vorliegenden Arbeit soll daher untersucht werden, ob eine direktere spezifischere und einzelne Inhibierung der NFAT-Faktoren ein sinnvoller therapeutischer Ansatz sein kann.

4. Material und Methoden

4.1 Materialien

4.1.1 Chemikalien und Reagenzien

4.1.1.1 Verwendete Chemikalien

<u>Chemikalie</u>	<u>Hersteller</u>
Acrylamid/Bisacrylamid	Carl Roth GmbH
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Carl Roth GmbH
Bromphenolblau	Serva
Calciumchlorid	AppliChem GmbH
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	AppliChem GmbH
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth GmbH
Dinatriumhydrogenphosphat	Noras
Dithiothreitol (DTT)	AppliChem GmbH
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Carl Roth GmbH
Ethanol	Carl Roth GmbH
Ethidiumbromid	Carl Roth GmbH
Essigsäure	Carl Roth GmbH
Glycerin	Carl Roth GmbH
Glycin	Carl Roth GmbH
HEPES	Carl Roth GmbH
Isopropanol	Carl Roth GmbH
Kaliumchlorid	Sigma-Aldrich
Magnesiumchlorid	Carl Roth GmbH
β -Mercaptoethanol	Gibco/Life Technologies
Methanol	Carl Roth GmbH
Natriumazid	Carl Roth GmbH
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth GmbH
Natriumhydrogencarbonat	Carl Roth GmbH

Natriumhydrogenphosphat	Carl Roth GmbH
Natriumhydroxid	AppliChem GmbH
Natriumpyruvat	Carl Roth GmbH
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich
Phosphorsäure	Carl Roth GmbH
Propidiumiodid	Sigma-Aldrich
Ponceau S	AppliChem GmbH
Salzsäure	Carl Roth GmbH
Schwefelsäure	Carl Roth GmbH
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Carl Roth GmbH
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)	Carl Roth GmbH
Triton-X	Carl Roth GmbH
Trypanblau	Sigma Aldrich
Tween-20	Carl Roth GmbH

4.1.1.2 Stimulantien

Stimulanz

anti-CD3 ϵ (Klon 145-2C11)
anti-CD28 (Klon 37.51)
Ionomycin
TPA (PMA)

Hersteller

BD Pharmingen
BD Pharmingen
Sigma Aldrich
Merck

4.1.1.3 Zusätze für die Zellkultur

Reagenz

anti-murin-IFN γ (Klon 7DF3)
anti-murin-IL-4 (polyklonal)
anti-murin-IL-2 (Klon JES6-5H4)
humanes IL-2 (rekombinant)
humanes TGF β ₁ (rekombinant)
murines IFN γ (rekombinant)
murines IL-4 (rekombinant)

Hersteller

R&D Systems
R&D Systems
eBioscience
PeproTech
PeproTech
PeproTech
PeproTech

murines IL-6 (rekombinant)	PeptoTech
murines IL-12 (rekombinant)	PeptoTech
murines IL-21 (rekombinant)	PeptoTech
murines IL-23 (rekombinant)	R&D Systems

4.1.1.4 Radioaktiv-markierte Stoffe

<u>Reagenz</u>	<u>Hersteller</u>
[³ H]-Thymidin	Hartmann Analytics

4.1.1.5 Größenstandards

<u>Größenstandard</u>	<u>Hersteller</u>
DNA-Marker Gene Ruler 1 kb	Fermentas/ ThermoScientific
DNA-Marker Gene Ruler 100 bp	Fermentas/ ThermoScientific
Proteinmarker Page Ruler protein ladder	Fermentas/ ThermoScientific

4.1.2 Verwendete Labormaterialien und Geräte

4.1.2.1 Labormaterialien

<u>Materialie</u>	<u>Lieferant/ Hersteller</u>
Deckgläschen (Ø 12 mm)	Hartenstein/ Menzel
Einweghandschuhe	Ansell
Einwegspritzen(1, 5 und 10 ml)	Braun, BD
FACS Röhrchen	BD Biosciences
Filterpapier	Whatman
Gewebekulturplatten (6, 12, 24, 96-well)	Greiner, Nunc
Gewebekulturschalen (6 und 10 cm)	Greiner, Nunc
Kanülen (20G, 22G, 26G)	Braun
Küvetten (Kunststoff)	Braun
Maxisorb ELISA-Platten	Nunc, Costar
Nitrozellulose Transfermembran	Whatman

Objektträger	Menzel
Parafilm	Hartenstein/ Brand
Pasteurpipetten	Brand
Pipettenspitzen (10, 100, 1000 µl)	Sarstedt, Sorenson
Rasierklingen	Hartenstein
Reaktionsgefäße (1.5 und 2.0 ml)	Sarstedt, Eppendorf
Röntgenfilme	Hartenstein/ Kodak
Serologische Pipetten (5, 10, 25 ml)	Greiner
Sterilfilter (0.2 und 0.45 µm)	Machery-Nagel
Zellseparationssäulen LS	Miltenyi Biotec
Zellsiebe (70 µm)	Hartenstein
PP-Reaktionsgefäße (15 und 50 ml)	Greiner

4.1.2.2 Geräte/Instrumente

<u>Gerät</u>	<u>Hersteller</u>
Analyse-Waage	Hartenstein
Autoklav	Systemec
Brutschränke	Heraeus Instruments
Durchflusszytometer FACSCalibur	BD Biosciences
Durchflusszytometer FACScan	BD Biosciences
Eismaschine	Genheimer
ELISA-Reader Vmax	Molecular devices
Konfokales Fluoreszenzmikroskop TCS SP5 II	Leica Microsystems
Fluoreszenzmikroskop Zeiss Imager.Z1m	Zeiss
Heizblock	Heidolph
Magnetrührer	Heidolph
Lichtmikroskope	Leica Microsystems
PCR-Maschinen	MWG Biotec
Pipettierhilfe	Brand
pH-Meter	WTW
Photometer	Pharmacia
Photometer Nanodrop	PeqLab

Schüttler	Edmund Bühler
Spannungsgeräte PowerPac 2000	BioRad
Sterilbank	Heraeus Instruments
Tiefkühlschrank (-20°C)	Privileg
Tiefkühltruhe (-70°C)	Siemens
Überkopfdrehrad	Hartenstein
Vortexer	Hartenstein/ GLW
Westernblot-System	BioRad
Westernblotentwicklungs-System Fusion SL	Vilber Lourmat
Zentrifuge 5415C	Eppendorf
Zentrifuge Rotina 420R	Hettich Zentrifugen
Zytospin Zentrifuge	Shandon

4.1.3 Antikörper

4.1.3.1 Antikörper für FACS-Analysen

<u>Antikörper</u>	<u>Hersteller</u>
anti-B220-Biotin (Klon RA36B2)	BD Pharmingen
anti-CD3ε-Biotin (Klon 145-2C11)	BD Pharmingen
anti-CD4-APC/PE/FITC (Klon RM45)	eBioscience
anti-CD4-Alexa488 (Klon RM45)	BD Pharmingen
anti-CD8α-APC/FITC (Klon 53-6.7)	BD Pharmingen
anti-CD11b-PE (Klon M1/70)	BD Pharmingen/eBioscience
anti-CD19-Biotin/PE (Klon 1D3)	BD Pharmingen
anti-CD25-PE/APC (Klon PC61)	eBioscience
anti-CD44-FITC (IM7)	eBioscience
anti-CD45-FITC (Klon 30.F11)	eBioscience
anti-CD62L-Biotin (Klon MEL-14)	BD Pharmingen
anti-CD69-Biotin (Klon H1.2F3)	BD Pharmingen
anti-CD80-FITC (Klon 16-10A1)	BD Pharmingen
anti-CD86-FITC (Klon GL1)	BD Pharmingen
anti-CD90.1-Biotin/FITC (Klon HIS51)	BD Pharmingen
anti-CD90.2-Biotin (Klon 53-2.1)	BD Pharmingen

anti-Foxp3-FITC/PE/APC (Klon FJK-16s)	eBioscience
anti-GMCSF-PE (Klon MP1-22E9)	eBioscience
anti-IFN γ -APC (Klon XMG1.2)	eBioscience
anti-IL2-APC (Klon JE56-5H4)	eBioscience
anti-IL4-PE (Klon 11B11)	eBioscience
anti-IL9-PE (Klon RM9A4)	eBioscience
anti-IL10-APC (Klon JES5-16E3)	eBioscience
anti-IL17A-PE/APC (Klon eBio17B7)	eBioscience
anti-IL21-APC (Klon FFA21)	eBioscience
anti-IL22-APC (IL22JOP)	eBioscience
anti-TNF α -PE (Klon MP6-XT23)	eBioscience

4.1.3.2 Primäre Antikörper für Westernblot und Immunfluoreszenz

<u>Antikörper</u>	<u>Hersteller</u>
anti-CD4-Alexa488 (Klon RM45)	BD Pharmingen
Ziege-anti-Albumin	Bethyl Laboratories
Maus anti- β -Aktin (Klon AC-15)	Sigma-Aldrich
Ratte-anti-Foxp3 (Klon FJK-16s)	eBioscience
Kanninchen-anti-HDAC2	SantaCruz Biotechnology
Ratte-anti-IRF4	Cell signaling
Maus-anti-NFATc1 (7A6)	BD Pharmingen
Kanninchen-anti-NFATc1	ImmunoGlobe
Kanninchen-anti-NFATc1/ α	ImmunoGlobe
Kanninchen-anti-NFATc2	ImmunoGlobe
Ratte-anti-PECAM1 (CD31)	BD Pharmingen

4.1.3.3 HRP-konjugierte Sekundärantikörper für Westernblot

<u>Antikörper</u>	<u>Hersteller</u>
Ziege-anti-Kaninchen-HRP	Sigma-Aldrich
Ziege-anti-Maus-HRP	Sigma-Aldrich
Ziege-anti-Ratte-HRP	Sigma-Aldrich

4.1.3.4 Sekundärantikörper für Immunfluoreszenz

<u>Antikörper</u>	<u>Hersteller</u>
Esel-anti-Hamster-AlexaFluor488	Molecular Probes
Esel-anti-Maus-AlexaFluor488	Molecular Probes
Esel-anti-Maus-AlexaFluor555	Molecular Probes
Esel-anti-Kaninchen-AlexaFluor555	Molecular Probes
Esel-anti-Kaninchen-AlexaFluor647	Molecular Probes
Ziege-anti-Maus-CyChrom5	Dianova
Ziege-anti-Ratte-CyChrom3	Dianova
Ziege-anti-Ratte-CyChrom2	Dianova

4.1.4 Oligonukleotide

4.1.4.1 Maus-Genotypisierungsprimer

<i>Nfatc1/C^{ΔSUMO}</i> DL1	5' ACTGGCAGAACTTACCAGAGTC 3'
<i>Nfatc1/C^{ΔSUMO}</i> LOX1	5' CCGTATAATTGGAAGTGTGGAGAGGAAAG 3'
<i>Nfatc1/C^{ΔSUMO}</i> F7	5' GGAAGTTCGCTAGACTAGTACGCGTG 3'
<i>Nfatc1/C^{ΔSUMO}</i> WT	5' GCTAGGGAACTGTCTTCCAC 3'
<i>CD4 cre1</i>	5' CGAGTGATGAGGTTTCGCAAG 3'
<i>CD4 cre2</i>	5' TGAGTGAACGAACCTGGTTCG 3'
<i>Nfatc1</i> M111	5' AACATTTGGCCTGCTTGATAGAG 3'
<i>Nfatc1</i> M112	5' CAACAGAAGCCAGCTTTCACAG 3'
<i>Nfatc2</i> Glin1	5' CAAGCCTCAGTGACAAAGTATCCACTT 3'
<i>Nfatc2</i> Glin2	5' AGCGTTGGCTACCCGTGATATTGC 3'
<i>Nfatc2</i> Glin3	5' CGAGCTGCCCATGGTGGAGAGAC 3'
<i>2D2</i> Tg forward	5' CCCGGGCAAGGCTCAGCCATGCTCCTG 3'
<i>2D2</i> Tg reverse	5' GCGGCCGCAATCCCAGAGACATCCCTCC 3'
<i>2D2</i> + forward	5' CTAGGCCACAGAATTGAAAGATCT 3'
<i>2D2</i> + reverse	5' GTAGGTGGAAATTCTAGCATCATCC 3'

4.1.4.2 Sequenzierprimer

PT1	5' AACTTCGTACGTCCTCTTCGTATTAGAACCAGCTG 3'
PT5	5' TGAGTCCACATCTGAACAGTAGC 3'

4.1.4.3 RT-PCR Primer

<i>beta-Actin</i> forward	5' CAACTGGGACGACATGGAGAAG 3'
<i>beta-Actin</i> reverse	5' TTCTCCAGGGAGGAAGAGGATG 3'

4.1.4.4 Realtime PCR Primer

<i>Ifng</i> forward	5' GATGCATTCATGAGTATTGCCAAGT 3'
<i>Ifng</i> reverse	5' GTGGACCACTCGGATGAGCTC 3'
<i>Il17a</i> forward	5' CTCCAGAAGGCCCTCAGACTAC 3'
<i>Il17a</i> reverse	5' GGGTCTTCATTGCGGTGG 3'
<i>Il17f</i> forward	5' CTGTTGATGTTGGGACTTGCC 3'
<i>Il17f</i> reverse	5' TCACAGTGTTATCCTCCAGG 3'
<i>Il2</i> forward	5' TTCAATTGGAAGATGCTGAGA 3'
<i>Il2</i> reverse	5' ATCATCGAATTGGCACTCAA 3'
<i>Il10</i> forward	5' CCCTTTGCTATGGTGTCCCTT 3'
<i>Il10</i> reverse	5' TGGTTTCTCTTCCCAAGACC 3'
<i>Il4</i> forward	5' CGAGCTCACTCTCTGTGGTG 3'
<i>Il4</i> reverse	5' TGAACGAGGTCACAGGAGAA 3'
<i>Il13</i> forward	5' CCACTCCATACCATGCTGC 3'
<i>Il13</i> reverse	5' TGTGTCTCTCCCTCTGACCC 3'
<i>Tbx21</i> forward	5' CAACAACCCCTTTGCCAAAG 3'
<i>Tbx21</i> reverse	5' TCCCCAAGCAGTTGACAGT 3'
<i>Gata3</i> forward	5' AGAACCGGCCCTTATGAA 3'
<i>Gata3</i> reverse	5' AGTTCGCGCAGGATGTCC 3'
<i>Rorc</i> forward	5' CCGCTGAGAGGGCTTCAC 3'
<i>Rorc</i> reverse	5' TGCAGGAGTAGGCCACATTACA 3'
<i>Foxp3</i> forward	5' GGCCCTTCTCCAGGACAGA 3'

<i>Foxp3</i> reverse	5' GCTGATCATGGCTGGGTTGT 3'
<i>bactin</i> forward	5' GACGGCCAGGTCATCACTATTG 3'
<i>bactin</i> reverse	5' AGGAAGGCTGGAAAAGAGCC 3'
<i>Hprt</i> forward	5' AGCCTAAGATGAGCGCAAGT 3'
<i>Hprt</i> reverse	5' TTACTAGGCAGATGGCCACA 3'
<i>cmaf</i> forward	5' AAATACGAGAAGCTGGTGAGCAA 3'
<i>cmaf</i> reverse	5' CGGGAGAGGAAGGGTTGTC 3'
<i>Irf4</i> forward	5' CAAAGCACAGAGTCACCTGG 3'
<i>Irf4</i> reverse	5' TGCAAGCTCTTTGACACACA 3'
<i>Nfatc1</i> forward	5' GATCCGAAGCTCGTATGGAC 3'
<i>Nfatc1</i> reverse	5' AGTCTCTTTCCCGACATCA 3'
<i>Nfatc1 P1</i> forward	5' CGGGAGCGGAGAACTTTGC 3'
<i>Nfatc1 P1</i> reverse	5' CAGGGTCGAGGTGACACTAG 3'
<i>Nfatc1 P2</i> forward	5' AGGACCCGGAGTTCGACTTC 3'
<i>Nfatc1 P2</i> reverse	5' CAGGGTCGAGGTGACACTAG 3'
<i>Nfatc2</i> forward	5' TCATAGGAGCCCGACTGATTG 3'
<i>Nfatc2</i> reverse	5' CCATTCCCATCTGCAGCAT 3'
<i>Prmd1</i> forward	5' TAGACTTCACCGATGAGGGG 3'
<i>Prmd1</i> reverse	5' GTATGCTGCCAACAACAGCA 3'
<i>Bcl6</i> forward	5' GATACAGCTGTCAGCCGGG 3'
<i>Bcl6</i> reverse	5' AGTTTCTAGGAAAGGCCGGA 3'

4.1.4.5 Chromatinimmunopräzipitations (ChIP) Primer

<i>Il17a</i> promotor forward	5' AATAGATTCTCAATGGTAGCC 3'
<i>Il17a</i> promotor reverse	5' GAAAATTCTTACTTTTGTAACAG 3'
<i>Il2</i> promotor forward	5' CCACAACAGGCTGCTTACAG 3'
<i>Il2</i> promotor reverse	5' GTCGGGTTAGCCCACTTA 3'
<i>Il13</i> promotor forward	5' GAATTACTGGGGCGGAAGTT 3'
<i>Il13</i> promotor reverse	5' TCTCTGCTTTGTTGGGCATT 3'
<i>Ifng</i> promotor forward	5' CACAAACAAGGCTCCCTGT 3'
<i>Ifng</i> promotor reverse	5' CCACCTGTGCCATTCTTGT 3'
<i>Il4</i> promotor forward	5' GCTGAAACCAAGGGAAAATGAGT 3'

<i>Il4</i> promotor reverse	5' GGAAAATTTACCTGTTTCTC 3'
<i>Il10</i> CNS9 forward	5' CTTGAGGAAAAGCCAGCATC 3'
<i>Il10</i> CNS9 reverse	5' TTTGCGTGTTACCTGTGTT 3'
<i>Ifng</i> CNS-6 NFAT forward	5' ATAAATGAGTCACGTGGCGG 3'
<i>Ifng</i> CNS-6 NFAT reverse	5' CGTTGGTTGAACTCCTGGAA 3'
<i>Ifng</i> CNS-6 T-bet forward	5' AAAGAAAGTTCGCAGTCCCC 3'
<i>Ifng</i> CNS-6 T-bet reverse	5' CTCTCTGTGCGCTGCCTGTA 3'
<i>Ifng</i> NC-8 forward	5' GGCAGATACCTCCTGTCCTG 3'
<i>Ifng</i> NC-8 reverse	5' TAAGAGGCGCACATGAGATG 3'

4.1.5 Verwendete Zelllinien

<u>Zelllinie</u>	<u>Beschreibung / Herkunft</u>
HEK 293T	Humane embryonale Nierenzelllinie / DSMZ Nr. ACC305
EL-4	Murine T-Zell-Lymphom Linie / ATCC Nr. TIB-39

4.1.6 Verwendete Mauslinien

Die nachfolgenden aufgeführten Mäuse wurden nach Bedingungen des deutschen Tierhaltungsgesetzes zur Haltung von Versuchstieren gehalten. Tierhaltungsstätten waren das Zentrum für Experimentelle Medizin der Universität Würzburg sowie die Tierhaltungsräume der Neurologischen Klinik der Universität Würzburg. Die Tiere wurden bei einer Raumtemperatur von 22°C und vorgeschriebener Luftfeuchtigkeitsbedingung pathogen frei gehalten. Alle hatten stets Zugang zu frischem Wasser und Futter. Nachkommen wurden im Alter von 4 Wochen anhand von Schwanzspitzenbiopsien genotypisiert. Für tierexperimentelle *in vivo* und *ex vivo* Versuche wurden die Mäuse ab einem Mindestalter von acht Wochen verwendet. Hierbei wurden Geschwistertiere und nach Möglichkeit des gleichen Geschlechts verwendet. Die EAE Experimente wurden anhand der Richtlinien des bewilligten Tierschutzantrages AZ.55.2-2531.01-107/09 durchgeführt.

<u>Mauslinie</u>	<u>Herkunft</u>
<i>C57BL/6 wild type</i>	Jackson Laboratory, Charles River
<i>BALB/c wild type</i>	Jackson Laboratory, Charles River
<i>B6-Tg(Cd4-cre)1Cwi/Cwilbcm</i>	The European Mouse Mutant Archive
<i>Nfatc1^{fl/fl} (C57BL/6)</i>	Anjana Rao, Harvard University, Boston
<i>Nfatc2^{-/-} (C57BL/6)</i>	Laurie Glimcher, Harvard University, Boston
<i>Nfatc1/C^{ΔSUMO}(BL/6, BALB/c)</i>	Berberich-Siebelt, Pathologisches Institut Würzburg
<i>Cd90.1 (C57BL/6)</i>	Jackson Laboratory, Charles River
<i>Rag1^{-/-} (C57BL/6)</i>	Jackson Laboratory, Charles River
<i>2d2 (C57BL/6)</i>	Jackson Laboratory, Charles River

4.1.7 Verwendete Standard-Puffer

PBS (1x)	NaCl (pH 7,4) 137 mM Na ₂ HPO ₄ 10 mM KCl 2,6 mM KH ₂ PO ₄ 1,8 mM
FACS-Puffer	PBS (1x) BSA 0.1% (w/v)
TBS (1x)	Tris-HCl (pH 7.5) 25 mM Glycin 150 mM
TBST (1x)	Tris-HCl (pH 7,5) 25 mM Glycin 150 mM Tween-20 0,05% (w/v)
TAE (50x)	Tris-Acetat (pH 2,5 M) Na ₂ EDTA (pH 8,0) 50mM

4.1.8 Elektronische Datenverarbeitung

Folgende Software zur Datenauswertung und Präsentation wurden auf einem Macintosh iMac und einem Macintosh MacBook Air verwendet. Das Betriebssystem war jeweils Mac OsX.

<u>Software</u>	<u>Hersteller</u>
AxioVision	Zeiss
Excel 2011	Microsoft
Illustrator CS2	Adobe

Scanjet Software	HP
TreeStar Flow Jo 8.8.6	BD FACSDiva
Prism 5.0	GraphPad
Photoshop CS2	Adobe
Powerpoint 2011	Microsoft
Word 2011	Microsoft

4.2 Methoden

4.2.1 Zelluläre Methoden

4.2.1.1 Zentrifugation von Zellen

Primäre Immunzellen, wie z. B. Zellen der Milz, des Thymus, der Lymphknoten sowie gereinigte CD4⁺ T-Zellen und B-Zellen wurden, wenn nicht anders angegeben, bei 1500 rpm für 5 min und 4°C zentrifugiert. Die benutzte Zentrifuge war eine Rotina 420R der Firma Hettich.

4.2.1.2 Bestimmung der Zellzahl und Vitalität

Zur Bestimmung der Zellzahl sowie der Vitalität der Zellen wurden 10 µl Zellsuspension mit 90 µl Trypanblau verdünnt. Dies entspricht einem Verdünnungsfaktor von 10. Trypanblau ist ein anionischer Farbstoff der an Proteine bindet. Dieser nicht-zellpermeable Farbstoff gelangt nur in tote Zellen, da diese keine intakte Membranhülle mehr besitzen. Abgestorbene Zellen können somit unter dem Mikroskop anhand der Blaufärbung von lebenden Zellen unterschieden werden. Mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer kann die Zelldichte pro ml berechnet werden. Hierzu wurden 10 µl der 1:10 mit Trypanblau verdünnten Zellsuspension unter das Deckgläschen der Zählkammer pipettiert. Anschließend wurde die Zellzahl in den vier Großquadraten der Zählkammer bestimmt und anhand der folgenden Formel die Anzahl pro ml Zellsuspension berechnet:

$$D = \frac{N}{Q} \times V \times 10^4$$

D: Zelldichte (Zellen/ml), N: Gesamtzellzahl aller vier Großquadrate, Q: Anzahl der Großquadrate, V: Verdünnungsfaktor, 10⁴: Volumenfaktor für die Umrechnung von Zellen/µl auf Zellen/ml

4.2.1.3 Präparation von primären Zellen aus Thymus, Milz und Lymphknoten

Primäre Lymphozyten wurden durch Präparation der Organe Milz, Lymphknoten und Thymus gewonnen. Die Spendertiere wurden euthanisiert und die entsprechenden Organe herauspräpariert. Anschließend wurden Milz, Thymus und Lymphknoten jeweils mit dem Puffer BSS/BSA durch Zellsiebe zerrieben und die Zellsuspension zentrifugiert. Lymphknotenzellen und Thymuszellen wurden dann jeweils in PBS (0,1% BSA) resuspendiert. Bei Milzzellen erfolgte nach dem Durchreiben eine Lyse der Erythrozyten. Hierzu wurde das Pellet der Milzzellen in 1 ml 1x Ery-Lyse Puffer resuspendiert und für 2 min bei RT inkubiert. Nach 2 min erfolgte das Abstoppen der Lyse durch Zugabe von 10 ml BSS/BSA. Nach Zentrifugation wurden auch die Milzzellen in PBS (0,1% BSA) resuspendiert. Zur Einstellung der jeweiligen gewünschten Zelldichte die jeweiligen Zellsuspensionen gezählt.

10x Ery-Lyse Puffer:	NH ₄ Cl	84,9 g
	KHCO ₃	10 g
	EDTA	0,37 g
	add dH ₂ O	1 Liter

BSS/BSA:	BSS (0,1% BSA)
-----------------	----------------

4.2.1.4 Präparation von Immunzellen aus dem ZNS

Zur Gewinnung von Immunzellen aus dem ZNS von EAE-erkrankten Mäusen wurden die Tiere euthanisiert und anschließend mit PBS perfundiert. Das Perfundieren diente zur Entfernung von Blut aus den ZNS-versorgenden Blutgefäßen, um eine Isolation nur der ins ZNS-Gewebe einfiltrierten Immunzellen zu garantieren. Anschließend wurden Gehirn und Rückenmark präpariert und mittels einer Rasierklinge in einer Petrischale zerkleinert. Daraufhin wurde das ZNS-Gewebe in 2 ml PBS, welches mit 2 mg/ml Kollagenase D und 10 Units DNase I versetzt war 20 min bei 37°C inkubiert. Das dadurch angebaute Gewebe wurden mit einer 5 ml Spritze und einer 18G Kanüle durch mehrmaliges Resuspendieren homogenisiert. Nach Zentrifugation wurde das Homogenat in einer 70%igen Percoll-Lösung aufgenommen. Zur Auftrennung der ZNS-Bestandteile wurde eine Dichtezentrifugation eines Gradienten aus 30% : 37% : 70% Percoll-Lösungen verwendet. Hierzu wurde in einem 15 ml

Reaktionsgefäß eine 30%ige Percoll-Lösung mit einer 37%igen unterschichtet. Unter diese beiden Lösungen wurde anschließend die 70%ige Percoll-Homogenat-Lösung pipettiert. Dieser Gradient wurde für 20 min bei RT und mit 2000 rpm (ohne Bremse) zentrifugiert. Nach Zentrifugation wurden die Zellen, die sich zwischen der 70%igen und 37%igen Phase angereichert hatten, mit einer Plastikpasteurpipette abgenommen und in ein neues 15 ml Reaktionsgefäß überführt. Die so gewonnenen Zellen wurden zweimal, durch Zugabe von PBS gefolgt von einem Zentrifugationsschritt, gewaschen und anschließend für die FACS-Färbungen weiter verarbeitet. Herstellung der Percoll-Lösungen für die Dichtezentrifugation pro Gradientenansatz (entsprechend einem ZNS-Gewebe einer Maus):

100% Percoll-Lösung, 10ml:	1 ml 10x PBS 9 ml Percoll
30% Percoll-Lösung, 4ml:	1,2 ml 100% Percoll 2,8 ml 1x PBS
37% Percoll-Lösung, 4ml:	1,48 ml 100% Percoll 2,52 ml 1x HBSS
70% Percoll-Lösung, 4ml:	2,8 ml 100% Percoll 1,2 ml 1x PBS

4.2.1.5 Kultivierung von primären Zellen

Gesamtmilz- und Lymphknotenzellsuspensionen wurden in RPMI-Medium im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂-Sättigung kultiviert. Primäre CD4⁺ T-Zellen wurden je nach Versuchs- oder Differenzierungsansatz entweder in RPMI-Medium oder in IMDM-Medium kultiviert. RPMI-Medium stammte aus der Medienküche des Instituts für Virologie und Immunbiologie. IMDM wurde von der Firma Gibco bezogen.

RPMI-Medium versetzt mit:	5% FCS 100 U/ml Penicillin/Streptomycin 50 µM β-Mercaptoethanol
----------------------------------	---

IMDM-Medium versetzt mit:	5% FCS
	100 U/ml Penicillin/Streptomycin
	50 μ M β -Mercaptoethanol

4.2.1.6 Kultur von Zelllinien

HEK-293T Zellen und EL-4 (T-Zell-Lymphom) Zellen wurden unter feuchtigkeitsgesättigten Bedingungen bei 37°C und 5% CO₂-Sättigung im Brutschrank kultiviert. Für die HEK-293T Zellen wurde DMEM-Medium und für EL-4 Zellen RPMI-Medium (supplementiert mit 10% FCS, ansonsten wie angegeben unter 4.2.1.5) verwendet. Die adhärenenten HEK-293T Zellen wurden in 10 cm Petrischalen bis zu einer Konfluenz von ca. 80% kultiviert. Dann wurden sie in einer Verdünnung von 1:10 mit frischem Medium neu ausgesät und, bis zu einer erneuten 80%igen Konfluenz, weiter kultiviert. EL-4 Zellen sind Suspensionszellen und wurden zweimal pro Woche ebenfalls 1:10 mit frischem Medium verdünnt. Dieses Passagieren, bzw. Verdünnen der Zellen diente der Aufrechterhaltung von optimalen Wachstumsbedingungen, da zu dichte Zellen aufgrund von Kontaktinhibition das Wachstum einstellen. Durch Zugabe von frischem Medium wurde zusätzlich eine ausreichende Nährstoffversorgung gewährleistet. DMEM wurde von der Firma Gibco bezogen.

DMEM-Medium versetzt mit:	10% FCS
	100 U/ml Penicillin/Streptomycin
	50 μ M β -Mercaptoethanol

4.2.1.7 Negativ-Isolation von CD4⁺ T-Zellen

Zur negativen Isolation von naiven und unbehandelten CD4⁺ T-Zellen aus einer Gesamtzellsuspension von Milz- und Lymphknotenzellen wurde das Dynal[®] Negativ-Isolation Kit (Invitrogen) verwendet. Das Prinzip dieser negativen Isolation von CD4⁺ T-Zellen beruht auf der Gabe eines Antikörpermix, der gegen CD8⁺ T-Zellen, B-Zellen, Makrophagen, NK-Zellen, DCs sowie Monozyten und Granulozyten gerichtet ist. Mit Hilfe von magnetischen Kügelchen (Dynabeads[®]), die an die Antikörper des Mix binden, werden somit erfolgreich die oben aufgeführten Zellen depletiert und es bleiben unberührte T-Zellen übrig. Die im Folgenden angegebenen Volumina entsprechen den Herstellerangaben für eine

Zellzahl von $1,0 \times 10^7$ Zellen. Je nach Zellzahl wurde dieses Volumen um ein Vielfaches heraufskaliert. Zur Aufreinigung von $CD4^+$ T-Zellen wurden $1,0 \times 10^7$ Zellen in 100 μ l PBS (0,1% BSA) resuspendiert und 20 μ l FCS sowie 20 μ l der Antikörper-Mix-Lösung zugegeben. Nach 20 min Inkubationszeit bei 4°C wurden die Zellen dann mit PBS (0,1% BSA) gewaschen und in 800 μ l PBS (0,1% BSA) resuspendiert. Es erfolgte die Zugabe von 200 μ l, zuvor mit PBS (0,1% BSA) gewaschenen, magnetischen Kügelchen (Dynabeads®). Die Inkubation der Zellen mit den Dynabeads® erfolgte 15 min bei RT mittels bidirektionaler Rotation. Die anschließende Isolation der unberührten $CD4^+$ T-Zellen wurde mit einem Magnetständer durchgeführt. Die zu depletierenden Immunzellen, welche mit den magnetischen Dynabeads® beladen waren, wurden aufgrund des Magnetfeldes an die Innenwand des Reaktionsgefäßes gedrückt, während die T-Zellen in Suspension blieben. Die T-Zell-Suspension wurde dann mit einer serologischen Pipette in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Zur weiteren Aufreinigung von naiven $CD4^+$ T-Zellen wurde eine Selektion auf CD25 vorgenommen. CD25 ist ein Aktivierungsmarker von reifen $CD4^+$ T-Zellen. Somit exprimieren naive $CD4^+$ T-Zellen kein CD25 auf ihrer Oberfläche. Für diese weitere Aufreinigung wurden die zuvor isolierten $CD4^+$ T-Zellen mit einem PE-gekoppelten monoklonalen anti-Maus CD25 Antikörper (eBioscience) in einer 1: 400 Verdünnung für 45 min auf Eis inkubiert und anschließend mit magnetischen Kügelchen (Miltenyi Biotec), die gegen PE gerichtet waren, versetzt. Die Isolation der $CD4^+CD25^-$ Fraktion an naiven Zellen erfolgte wiederum mittels eines Magnetfeldes. Durch die Verwendung von magnetischen Säulen (LS-MACS® Säule, Miltenyi Biotec) wurden so die reifen $CD4^+CD25^+$ T-Zellen zurückgehalten und die naive Population an $CD4^+CD25^-$ T-Zellen reicherte sich im Durchfluss an.

4.2.1.8 Positiv-Isolation von $CD4^+$ T-Zellen

Zur positiven Aufreinigung von $CD4^+$ T-Zellen wurden magnetische $CD4$ (L3T4) MicroBeads von Miltenyi Biotec verwendet. Hierzu wurde, entsprechend der Herstellerangaben für $1,0 \times 10^7$ Zellen, eine Zellsuspension aus Milz- und Lymphknotenzellen mit 90 μ l PBS (0,1% BSA) und 10 μ l MicroBeads versetzt und für 20 min auf Eis inkubiert. Je nach Zellzahl wurden diese Volumina entsprechend heraufskaliert. Nach der Inkubation wurden die Zellen einmal, durch Zugabe von PBS (0,1% BSA) mit darauffolgender Zentrifugation, gewaschen. Anschließend wurde das Pellet in 2 ml PBS (0,1% BSA) resuspendiert und auf eine mit 3 ml PBS (0,1% BSA) äquilibrierte

LS-MACS[®] Säule geladen. Die mit den magnetischen MicroBeads beladenen CD4⁺ T-Zellen wurden in der Säule zurückgehalten, welche in einem Magneten befestigt war. Alle anderen Immunzellen sammelten sich dagegen im Durchfluss. Dieser Durchlauf wurde im Folgenden als APC-Suspension weiterverwendet. Nach dreimaligem Spülen der Säule mit jeweils 3 ml PBS (0,1% BSA) wurden die CD4⁺ T-Zellen mit 5ml PBS (0,1% BSA) aus der Säule in ein frisches Reaktionsgefäß gespült, sobald diese aus dem magnetischen Ständer entnommen wurde. Die Reinheit der CD4⁺ T-Zell-Isolation wurde mittels eines Durchflusszytometers bestimmt und lag stets über 95%.

4.2.1.9 Differenzierungskulturen naiver CD4⁺ T-Zellen zu T-Helfer-Zellen

Die durch Positiv-Selektion gereinigten primären CD4⁺ T-Zellen wurden in einem *in vitro* Differenzierungsansatz für drei Tage zu verschiedenen T-Helfer-Zellen ausdifferenziert. Hierzu wurden je nach gewünschtem Ansatz 6-, 12- oder 24-Well-Platten mit monoklonalem anti-Maus-CD3 ϵ und monoklonalem anti-Maus-CD28 Antikörpern für 2 h bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank beschichtet. Für diese Beschichtung wurden die oben genannten Antikörper in PBS verdünnt und in die Platten pipettiert. Für die Differenzierung zu Th0-, Th1- und Th2-Zellen wurde jeweils folgende Mengen an Antikörpern verwendet: 4 μ g/ml anti-CD3 und 2 μ g/ml anti-CD28. Für die Th17-Differenzierung wurden die Platten mit 1 μ g/ml anti-CD3 und 10 μ g/ml anti-CD28 beschichtet. Die so beschichteten Platten wurden vor dem Ausplattieren der CD4⁺ T-Zellen zweimal, durch Zugabe von PBS, gewaschen. Die Zelldichte betrug jeweils immer 1,0 x 10⁶ Zellen/ml. Die Kulturvolumina betragen in der 6-Well Platte 4-5 ml, in der 12-Well-Platte 2 ml und in der 24-Well-Platten 1 ml. Für die Differenzierungsansätze zu Th0-, Th1- und Th2-Zellen wurde jeweils RPMI-Medium verwendet. Th17-Zellen wurden dagegen in IMDM-Medium ausdifferenziert. Im Folgenden sind die verwendeten Zytokine für die *in vitro* Differenzierung von naiven CD4⁺ T-Zellen zu Th0-, Th1-, Th2- und Th17-Zellen aufgeführt.

Th0:	hIL-2	10 ng/ml
	anti-mIFN γ	5 μ g/ml
	anti-mIL-4	5 μ g/ml

Th1:	hIL-2	10 ng/ml
	hIL-12	10 ng/ml
	mIFN γ	50 ng/ml
	anti-mIL-4	5 μ g/ml
Th2:	hIL-2	10 ng/ml
	mIL-4	20 ng/ml
	anti-mIFN γ	5 μ g/ml
Th17:	hTGF β	2,5 ng/ml
	hIL-21	62,5 ng/ml
	mIL-6	50 ng/ml
	anti-mIFN γ	5 μ g/ml
	anti-mIL-4	5 μ g/ml
	anti-mIL-2	5 μ g/ml

4.2.1.10 Stimulation von primären Immunzellen

Für die Stimulation primärer Immunzellen wurde entweder der Phorboläther TPA zusammen mit dem Ionophor Ionomycin verwendet, oder es erfolgte eine Stimulation mit anti-CD3-Antikörper alleine oder in Kombination mit anti-CD28-Antikörpern. Die Stimulation mittels CD3/CD28 erfolgte je nach Ansatz entweder durch lösliche Zugabe zur Immunsuspension oder durch das Binden der Antikörper an die Plastikoberfläche von Zellkulturplatten. Die Zellen wurden für drei Tage in den beschichteten Platten kultiviert. Je nach Versuchsansatz wurde auch eine Stimulation über Nacht durchgeführt. Für die Stimulation mit TPA/Iono wurden 10 ng/ml TPA und 5 nM Ionomycin für die gewünschte Stimulationsdauer löslich in die Zellkultur gegeben. Meist erfolgte hierbei eine Stimulation von 5 h, teilweise erfolgte aber auch eine Stimulation über Nacht.

4.2.1.11 MOG₃₅₋₅₅ Reaktivierungskultur

Zur Bestimmung der MOG₃₅₋₅₅-spezifischen Proliferation und Zytokinsekretion von CD4⁺ T-Zellen wurden Gesamtmilzsuspensionen aus EAE-immunisierten Mäusen hergestellt und für

drei Tage mit unterschiedlichen Konzentrationen an MOG₃₅₋₅₅-Peptid kultiviert. Die Gesamtmilzsuspension enthält neben CD4⁺ T-Zellen auch APCs, die den MOG₃₅₋₅₅-spezifischen CD4⁺ T-Zellen das MOG₃₅₋₅₅-Peptid präsentieren und diese so aktivieren. Für die Messung der Zytokinsekretion durch ELISA (siehe 4.3.2.1) und für die Bestimmung der Proliferation (siehe 4.2.1.12) wurden in 96-Well-Platten die Gesamtmilzzellen mit einer Zellzahl von $2,0 \times 10^5$ Zellen pro Well ausgesät. Jeweils in Triplikaten wurden dann 0, 3, 10 oder 30 µg/ml MOG₃₅₋₅₅-Peptid sowie als positive Kontrolle für die CD4⁺ T-Zell-Stimulation 2,5 ng/ml anti-CD3 zugegeben. Am Tag drei der Kultur wurden zur Bestimmung der sekretierten Zytokine die Überstände geerntet und mit spezifischen OptEIATM ELISA-Kits der Firma BD Bioscience analysiert. Zur Bestimmung der Proliferation wurde der Einbau von ³[H]-Thymidin gemessen. Für eine qRT-PCR Analyse von Zytokinen und Transkriptionsfaktoren nach MOG₃₅₋₅₅-Restimulation von CD4⁺ T-Zellen wurden Gesamtmilzzellen in einer 6-Well-Platte in einer Dichte von $2,0 \times 10^7$ Zellen ausgesät und in Medium mit 30 µg/ml MOG₃₅₋₅₅ für drei Tage kultiviert. Als Kontrolle (unstimuliert) wurden die Zellen nur in Medium für drei Tage kultiviert. Anschließend wurden mittels einer Positiv-Selektion die CD4⁺ T-Zellen isoliert und von diesen RNA (siehe 4.2.4.2), für eine qRT-PCR Analyse (siehe 4.2.4.6), isoliert und in cDNA (siehe 4.2.4.4) umgeschrieben.

4.2.1.12 Proliferationsbestimmung durch ³[H]-Thymidin Inkorporation

Die Bestimmung der Proliferation von Lymphozyten wurde mittels des Einbaus von Thymidin, welches mit Tritium ³[H] radioaktiv markiert war, gemessen. Durch Zugabe von ³[H]-Thymidin in das Zellkulturmedium wird dies bei jeder Zellteilung in die DNA eingebaut, somit steigt mit Anzahl der Zellteilungen die radioaktive Strahlung an. Dieser, durch die Stärke der Proliferation bedingte Anstieg, wurde mittels eines Harvester (Tomtec) gemessen. Zur Messung der MOG₃₅₋₅₅-induzierten Stimulation wurde an Tag zwei 1,5 µCi ³[H]-Thymidin in die Ansätze der MOG₃₅₋₅₅-Kultur gegeben und für 18 h inkubiert, bevor die Messung erfolgte. Für die Bestimmung der Proliferation von CD4⁺ T-Zellen. In Folge einer anti-CD3 Stimulation wurden aufgereinigte CD4⁺ T-Zellen mit APCs und löslichem anti-CD3ε (in unterschiedlichen Konzentrationen) ko-kultiviert. Auch hier erfolgte 18 h vor Messung der Proliferation die Zugabe von 1,5 µCi ³[H]-Thymidin zu den Ansätzen.

4.2.1.13 Transfektion von Zelllinien

Zur transienten Transfektion von HEK-293T Zellen wurde die Methode der Transfektion mit Calciumphosphat verwendet. Hierbei bilden sich Calciumphosphat-DNA-Komplexe aus, die dann wahrscheinlich über Endozytose, in die Zelle aufgenommen werden. Für die Transfektion wurden die HEK-293T Zellen bis zu einer Konfluenz von 70-80% in 10 cm Zellkulturschalen in 8 ml DMEM-HEPES kultiviert. Für die Herstellung des Transfektionsmix aus Plasmid-DNA und Calciumphosphat wurden 850 μ l dH₂O mit 130 μ l CaCl₂ (2M) und 10 μ g an Plamid-DNA gemischt und unter Schütteln tropfenweise 200 μ l 2x HBS hinzugegeben. Dieser Transfektionsmix wurde für 30 min bei RT inkubiert, um eine vollständige Komplexbildung zu gewährleisten. Anschließend wurde pro 10 cm Schale dieser Mix tröpfchenweise und spiralförmig zu den Zellen gegeben. Die transfizierten Zellen wurden über Nacht bei 37°C und 5% CO₂-Sättigung im Brutschrank kultiviert. Am nächsten Tag erfolgte ein Mediumwechsel mit frischem DMEM-Medium. Je nach Versuchsansatz wurden die transfizierten Zellen dann weiter kultiviert oder über Nacht mit TPA (10 ng/ml) und Ionomycin (5 nM) stimuliert. Für die Transfektion zur Analyse von Luciferase-Reporterexperimenten wurden HEK-293T Zellen in 6-Well-Platten kultiviert und der Transfektionsansatz dementsprechend um herunterskaliert.

HBS-Puffer (2x):	HEPES (pH 7,05)	50 mM
	NaCl	280 mM
	KCl	10 mM
	Dextran	12 mM
	Na ₂ HPO ₄	1,5 mM

4.2.1.14 Luciferase-Reportergen Analysen

Mit Hilfe von Luciferase-Reportgen Analysen kann man die Aktivität von Promotoren *in vitro* untersuchen. Hierzu werden spezielle hergestellte Plasmid-Konstrukte verwendet in denen das Gen, das für das Enzym Luciferase kodiert, unter Kontrolle des zu untersuchenden Promotors steht. Wird die Luciferase dieser Plasmid-Konstrukte nach einer Transfektion in Zellen exprimiert, kann durch Zugabe des Substrates Luciferin, welches durch die Luciferase in Anwesenheit von ATP oxidiert wird, ein Rückschluss auf die Aktivität des zu untersuchenden Promotors gezogen werden. Das Prinzip hierbei ist eine enzymatisch

katalysierte Oxidation von Luciferin, die zu einer Emission von Licht führt. Diese Lichtreaktion kann dann mit einem Photometer gemessen werden. Die Stärke der Lichtemission, die hierbei entsteht ist direkt proportional zur Menge an synthetisierter Luciferase und somit zur Stärke der Promotoraktivität. Für Luciferase-Reportergen Analysen wurden in dieser Arbeit HEK-293T Zellen mit zu untersuchenden Reportgen-Plasmid-Konstrukten transient transfiziert (siehe 4.2.1.13) und je nach Ansatz über Nacht mit TPA/Iono stimuliert. Anschließend wurden die Zellen mit kaltem PBS geerntet und nach Zentrifugation das Pellet in 100 µl Ernte-Puffer resuspendiert, wodurch eine Lyse der Zellen erfolgte. 50 µl des Lysats wurden in speziellen 96-Well-Platten mit 50 µl Reaktionspuffer vermischt und 100 µl Luciferin-Lösung hinzugegeben. Die Lichtemission wurde an einem Photometer (FLUOstar, Omega) gemessen. Zusätzlich wurde aus dem Rest der Lysate jeweils die Proteinkonzentration bestimmt, um die gemessene Lumineszenz anhand der Proteinmenge zu normalisieren.

Ernte-Puffer:	Tris (pH 7,8)	50 mM
	MES	50 mM
	Triton-X-100	2% (v/v)
	DTT	1 mM
Reaktionspuffer:	Tris (pH 7,8)	50 mM
	MES	50 mM
	Mg(C ₂ H ₃ O ₂) ₂	20 mM
	ATP	10 mM
Luciferin-Lösung:	K ₂ PO ₄	5 mM
	Luciferin	10% (v/v)

4.2.1.15 Durchflusszytometrische Analyse von Zellen (FACS[®])

Mit Hilfe der Methode der Durchflusszytometrie kann man sowohl Oberflächenmarker von Zellen als auch intrazelluläre Proteine, wie Transkriptionsfaktoren und Interleukine mit spezifischen fluoreszenzmarkierten Antikörpern färben und auf Einzelzellebene an einem sogenannten FACS[®]-Gerät analysieren. Hierbei passieren die Zellen einzeln mehrere Laserstrahlen. Anhand der Streuung können so zum einen die Zellen in ihrer Größe und

Granularität unterschieden werden und zum anderen wird durch Anregung der fluorochrom-markierten Antikörper die dadurch entstehende Fluoreszenz detektiert, wodurch die Zellen auch anhand der gebundenen Antikörper analysiert werden können. Diese Methode ermöglicht sehr effizient eine große Menge an Zellen in kurzer Zeit zu analysieren. Zur Bestimmung von Oberflächenmarkern von Lymphozyten, wie zum Beispiel CD4, CD8, CD3 sowie CD19 und B220 wurden $1,0 \times 10^5$ Zellen in 100 μl FACS-Puffer (PBS 0,1% BSA) aufgenommen und mit jeweils 0,3 μl des entsprechenden fluoreszenzmarkierten Antikörper für 15 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit 500 μl FACS-Puffer gewaschen (10000 rpm, 3 min). Der Überstand wurde jeweils verworfen. Für die durchflusszytometrische Analyse am FACS[®]-Gerät wurden die Zellen dann in 200 μl FACS-Puffer resuspendiert und in FACS[®]-Röhrchen überführt. Für die intrazelluläre Färbung von Transkriptionsfaktoren wurde das Foxp3-Staining-Kit der Firma eBioscience nach Herstellerprotokoll verwendet. Für die Färbung von Interleukinen wurde für die Fixierung und Permeabilisierung der Zellen die Cyto-Fix/Perm-Puffer von eBioscience ebenfalls nach Herstellerangaben verwendet. Für jede Mehrfarbentfärbung wurde anhand von Einzelfärbungen mit den verwendeten fluorochrom-markierten Antikörpern eine Kompensation am FACS-Gerät durchgeführt. Die Kompensation ist notwendig um Fluoreszenzüberlagerungen und damit ein falsch positives Signal zu vermeiden. Wurden Gesamtlymphozytensuspensionen für eine FACS-Färbung verwendet erfolgte ein Fc-Rezeptor-Block, um unspezifische Färbung aufgrund des Fc-Rezeptors, der auf B-Zellen, NK-Zellen, Makrophagen sowie auf Monozyten und Granulozyten exprimiert wird, zu vermeiden. Hierfür wurden die Zellen vor Zugabe der Antikörper mit einem Fc-Block (eBioscience) für 10 min bei 4°C inkubiert. Die FACS-Analysen der vorliegenden Arbeit wurde an einem FACSCantoII[™] und an einem FACSCalibur[™] der Firma BD Bioscience durchgeführt.

FACS-Puffer (PBS 0,1% BSA):	NaCl	137 mM
	Na ₂ HPO ₄	10 mM
	KCl	2,6 mM
	KH ₂ PO ₄	1,8 mM
	BSA	0,1% (w/v)

4.2.1.16 Zytospin-Zentrifugation von Zellen

Für die konfokale Immunfluoreszenz-Mikroskopie von Zellen wurden diese mit Hilfe einer Zytospin-Zentrifuge auf Objektträger aufgebracht und anschließend mit entsprechenden Antikörpern gefärbt. Hierfür wurden jeweils 80 µl Zellsuspension in einen Trichters, der auf einen Objektträger gespannt wurde, pipettiert und anschließend die Zellen in einer speziellen Zentrifuge (Cytospin 2, Shandon) bei 360 rpm für 4 min auf die silanisierten Objektträger fixiert. Zur Eingrenzung der Zellen wurden diese mit einem Diamantstift auf dem Objektträger umrandet. Die Zytospins wurden vor der Immunfluoreszenzfärbung (siehe 4.2.5.4) für die konfokale Mikroskopie über Nacht getrocknet.

4.2.2 *In vivo* Experimente und Mausmodelle

4.2.2.1 Aktive MOG₃₅₋₅₅ EAE Induktion

Zur Induktion einer MOG₃₅₋₅₅-EAE wurde pro Maus 100 µl einer Paste, bestehend aus komplettem Freud'schen Adjuvant (CFA) und MOG₃₅₋₅₅-Peptid, subkutan am Schwanzansatz injiziert. Hierzu wurde Freud'sches Adjuvant mit einer Konzentration von 11 mg/ml an abgetöteten Mykobakterien Tuberkulosis (Stamm H37RA) in einem 1:1 Mischungsverhältnis mit MOG₃₅₋₅₅-Peptid (1 mg/ml), welches in dH₂O gelöst war, vermischt. Die benötigte Menge an CFA wurde in ein 15 ml Reaktionsgefäß vorgelegt und anschließend dasselbe Volumen an MOG₃₅₋₅₅ auf einem Vortexer tröpfchenweise zugeben, um eine gute Durchmischung zu garantieren. Diese „Voremulsion“ wurde durch eine Sonifizierung, bei einer Amplitude von 35% für 1-3 min auf Eis, zu einer festen Paste weiter verarbeitet. Jede Maus erhielt eine subkutane Injektion von 100 µl Paste dorsal oberhalb des Schwanzansatzes. Dadurch wurde jede Maus mit 50 µg MOG₃₅₋₅₅-Peptid und 550 µg CFA immunisiert. An Tag 0, dem Tag der Immunisierung, und an Tag 2 wurde zusätzlich 200 µl (200 ng) Pertussis-Toxin pro Maus intraperitoneal verabreicht. Der EAE-Krankheitsverlauf wurde anhand der folgenden *score*-Einteilung über einen Gesamtverlauf von vier Wochen dokumentiert:

<u><i>score</i></u>	<u>Beobachtung des Mausverhaltens</u>
0	Maus ohne Krankheitszeichen, normales Verhalten
0,5	Tonusabschwächung im Schwanz, Schwanzspitze schleift am Boden
1	Schwanz vollständig gelähmt, normaler Gang

1,5	breitbeiniger ataktischer Gang, Hinterteil tiefliegen
2	breitbeiniger ataktischer Gang, Hinterteil tiefliegend; Aufrichtungsreflex fehlend
3	Lähmung eines Hinterbeines
4	Lähmung beider Hinterbeine
5	Tetraparese
6	Tod durch EAE

4.2.2.2 Passive EAE Induktion

Für die passive EAE, einem adoptiven Transfer von MOG₃₅₋₅₅-spezifischen Zellen, wurde auf die 2D2-Mauslinie zurückgegriffen. Diese Mäuse besitzen einen MOG₃₅₋₅₅-spezifischen TCR²²⁶. Durch den passiven Transfer von CD4⁺ T-Zellen in *Rag1*^{-/-} Mäusen kann die Funktion von CD4⁺ T-Zellen ohne den *bystander*-Effekt von anderen Lymphozyten untersucht werden, da *Rag1*^{-/-} Mäuse keine reifen Lymphozyten besitzen. 2D2-Mäuse wurden mit *Nfatc1/C^{ΔSUMO}* verpaart um jeweils Mäuse zu erhalten, die MOG₃₅₋₅₅-spezifische und gleichzeitig für die SUMOylierung von NFATc1/C defiziente CD4⁺ T-Zellen besaßen. Nach Aufreinigung der CD4⁺ T-Zellen wurde diese für drei Tage *in vitro* zu Th1- und Th17-Zellen differenziert und anschließend in *Rag1*^{-/-} Mäuse transferiert. Als Kontrolle diente der adoptive Transfer von Th1- und Th17-Zellen aus reinen 2D2-Mäusen. Jede *Rag1*^{-/-} Maus erhielt 5,0 x 10⁶ Zellen eines 1:1 Mix aus Th1- und Th17-Zellen *i.v.* in die Schwanzvene. Zusätzlich wurden den Empfängermausen an Tag 0 (Tag der *i.v.* Injektion) und an Tag 2 200 µL (200 ng) Pertussis-Toxin gespritzt. Die EAE wurde nach der unter Punkt 4.2.2.2 genannten *score*-Einteilung täglich analysiert.

4.2.2.3 Generierung von Knochenmarkschimären

Eine andere Möglichkeit den CD4⁺ T-Zell-spezifischen Einfluss von NFATc2-defizienten CD4⁺ T-Zellen oder von CD4⁺ T-Zellen aus *Nfatc1/C^{ΔSUMO}* Mäusen zu analysieren, war die Generierung von Knochenmarkschimären (*bone marrow chimeras*, BMCs). Hierzu wurden wildtypische Empfängertiere vor dem Transfer sublethal mit 9 Gray bestrahlt, um das Knochenmark zu zerstören und so eine Neubildung von Zellen des hämatopoetischen Systems, insbesondere von Lymphozyten zu verhindern. Diese Neubildung sollte in den

BMCs aus dem transplantierten Knochenmark der Spendertiere erfolgen. Als Spendertiere wurden zum einen *Cd4^{-/-}* Mäuse verwendet, die keine CD4⁺ T-Zellen bilden können, sowie *Nfatc2^{-/-}*, *Nfatc1/C^{ΔSUMO}* und wildtypische Tiere. Es wurde ein Mix aus 80% Knochenmark von *Cd4^{-/-}* Mäusen und aus 20% Knochenmark von entweder *Nfatc2^{-/-}*, *Nfatc1/C^{ΔSUMO}* oder wildtypische Spendertieren hergestellt. Jede Empfängermaus erhielt nach Bestrahlung und Narkotisierung mit Ketanest, $2,0 \times 10^6$ Knochenmarkszellen *i.v.* über die retrobulbäre Augenvene. Die Rekonstitution des Immunsystems durch das transplantierte Knochenmark wurde anhand von Blutentnahme und anschließender FACS-Färbung von T- und B-Zellen analysiert. Dadurch, dass die Empfängermäuse den kongenen Marker CD90.1 und die Spendertieren CD90.2 besaßen, konnten so die neu gebildeten CD4⁺ T-Zellen nach Ursprung des Knochenmarks unterschieden werden. D. h. wie viele CD4⁺ T-Zellen aus dem Transplantat der Spendertiere nachgebildet wurden und somit CD90.2-positiv waren und wie viele aus Restnischen des Knochenmarks der Empfängertiere entstammten und demnach CD90.1-positiv waren. Nach 10 Wochen Rekonstitution wurde in den Knochenmarkschimären eine aktive MOG₃₅₋₅₅-EAE (wie unter Punkt 4.2.2.1 beschrieben) induziert.

4.2.3 Arbeiten mit Proteinen

4.2.3.1 Enzym-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Die stimulations-induzierte Sekretion von Zytokinen wurde mit ELISA bestimmt. Hierbei wurde das Prinzip eines sogenannten Sandwich-ELISA verwendet. Fänger-Antikörper, die gegen das zu detektierende Zytokin gerichtet sind, wurden in speziellen hoch-absorbierenden 96-Well-Platten an die Plastikoberfläche gebunden. Hierzu wurde nach Herstellerangaben die gewünschte Konzentration an Fänger-Antikörper in Beschichtungspuffer über Nacht bei 4°C in die Näpfe der 96-Well-Platte (Maxisorb, Nunc) gegeben. Anschließend erfolgte eine Blockierung von unspezifischen Bindungsstellen durch Inkubation mit Blockierungspuffer für 1 h bei RT. Nach mehrmaligem Waschen der Platte mit Waschpuffer wurden dann Zellkulturüberstände mit Assay-Verdünnungspuffer verdünnt und jeweils in Duplikaten in die Näpfe der beschichteten 96-Well-Platte pipettiert. Zusätzlich wurde in Duplikaten eine Standardverdünnungsreihe (1:2 Verdünnung) einer Zytokin-Standard-Lösung des zu messenden Zytokins hergestellt und in die Platte pipettiert. Anhand dieser Standardverdünnungsreihe konnte nach Vermessung der Platte die Zytokinkonzentration

berechnet werden. Standardreihe und Überstandproben wurden über Nacht bei 4°C in den Platten inkubiert. In dieser Inkubationszeit band das Zytokin an den spezifischen Fänger-Antikörper. Am nächsten Tag wurden der Überstand verworfen und die Platten mehrmals anhand Herstellerangaben mit Waschpuffer gewaschen. Dann erfolgte die Zugabe eines Detektions-Antikörpers, der wiederum das an den Fänger-Antikörper gebundene Zytokin erkannte. An diesen biotinylierten Detektions-Antikörper band in einem dritten Schritt Streptavidin-HRP (*horseradish peroxidase*). Durch Zugabe einer Substratlösung im letzten Schritt eines ELISA-Assays erfolgte aufgrund der Peroxidaseaktivität ein Farbumschlag der Substratlösung. Dieser Farbwechsel wurde mit einem ELISA-Reader (Vmax, Molecular devices) photometrisch bestimmt. Die Stärke des Farbumschlages war hierbei proportional zur Menge an Zytokin im Zellkulturüberstand. In der vorliegenden Arbeit wurden ELISA mit OptEIA™ Kits der Firma BD Bioscience nach Herstellerangaben verwendet.

Beschichtungspuffer:	0.1 M Natriumcarbonatlösung, pH 9,5
Blockierungspuffer/ Assay-Verdünnungspuffer:	PBS (10% FCS)
Waschpuffer:	PBS (0,05% Tween-20)

4.2.3.1 Herstellung von Kern- und Zytoplasmalysaten

Zur Aufbereitung von Proteinlysaten für die Verwendung in Immunoblot-Analysen wurde zur Herstellung von Kern- und Zytoplasmalysaten das Kit N-PER (ThermoScientific) nach Herstellerangaben verwendet. Die so gewonnenen Kernlysate wurden bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert. Für Totalzelllysate wurde die Zellen zunächst geerntet und zweimal mit kaltem PBS gewaschen. Anschließend wurde das Zellpellet je nach Größe in 150-200 µl, selbst hergestellten, Zelllyse-Puffer resuspendiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach dieser Inkubationszeit wurden die Proben gevortext und für 15 min bei 12000 rpm bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in neue Reaktionsgefäße überführt und bei -20°C bis zur weiteren Verwendung eingefroren.

Zellyse-Puffer:	Tris pH 7,4	50mM
	NaCl	150mM
	EDTA	1mM
	Triton-X	1% (v/v)
	Protease-Inhibitor-Cocktail (1x)	

4.2.3.3 Bestimmung der Proteinkonzentration

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration von Kern- und Zytoplasmalysaten sowie von Totalzelllysaten wurde die Bestimmungsmethode nach Bradford verwendet. Hierbei wird eine Absorptionsverschiebung des Farbstoffes Coomassie-Blau von 465 nm auf 595 nm aufgrund von basischen Aminosäuren genutzt. Diese Verschiebung kann in einem Photometer gemessen werden. Anhand einer Konzentrationsreihe von 0,2 bis 20 µg/ml des Proteins BSA wurde ein Standard hergestellt anhand dessen die Adsorption bei 595 nm in die Proteinmenge einer Probe umgerechnet werden konnte. Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurden 2 µl Zellysat in 1 ml einer 1:5 Verdünnung des Bradfordreagenz mit dH₂O gegeben und diese Probe im Photometer (GeneQuant, Amersham Bioscience) gemessen. Als Nullwert zur Kalibrierung wurde eine Probe mit 2 µl dH₂O verwendet.

4.2.3.4 Immunoblotting von Proteinen (Westernblot)

Zur Detektion spezifischer Proteine aus Kern-, Zytoplasma- und Totalzelllysaten wurden die Methode der elektrophoretischen Auftrennung der Proteine mittel eines SDS-Gels und anschließender Übertragung der Proteine auf eine Nitrocellulosemembran (Westernblot) verwendet. Hierzu wurde eine gewünschte Konzentration an Proteinlysate mit 4x Lämmli-Puffer bei 95°C für 10 min im Heizblock aufgeköcht und vor Auftrag auf ein SDS-Gel für 5 min bei 14000 rpm herunterzentrifugiert. Hierbei denaturiert das im 4x Lämmli-Puffer vorhanden SDS die Proteine, und das β-Mercaptoethanol im Puffer reduziert die Disulfidbrücken, wodurch die dreidimensionale Struktur der Proteine aufgelöst wird. Zusätzlich erhalten die denaturierten Proteine dadurch eine gleichmäßige negative Ladung. Die Proteine wandern im SDS-Gel durch die Anlegung einer Spannung zum Pluspol und werden so anhand der Ladung, die proportional zur Größe ist, aufgetrennt. Nach dieser elektrophoretischen Auftrennung der Proteine wurden diese durch Anlegung eines

elektrischen Feldes (35 V Sammelgel und 55 V Trenngel) auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Für diese als Westernblot bezeichnete Methode wurde das SDS-Gel sowie die Membran und Filterpapiere (beides Whatman) in Transfer-Puffer getränkt und in folgender Reihenfolge von Pluspol zu Negativpol aufeinander geschichtet: drei Lagen Filterpapier, Membran, SDS-Gel, drei Lagen Filterpapier. Dieser „Blot“ wurde in eine mit Transferpuffer gefüllte Transferkammer gegeben und durch Anlegung einer Spannung werden die negativ geladenen Proteine dabei auf die Membran, die zum Pluspol gerichtet war, transferiert. Nach dem Transfer können Proteine über spezifische Antikörper detektiert werden. Hierzu wurde die Membran zunächst, zum Blocken unspezifischer Bindungsstellen, in TBST mit 5% Milchpulver für 1 h bei RT inkubiert. Nach dreimaligem Waschen der Membran mit TBST für 5 min wurde der primäre – für das gesuchte Protein spezifische – Antikörper in TBST 5% Milchpulver verdünnt und auf die Membran gegeben. Die Primäantikörper-Inkubation erfolgte unter Schütteln bei 4°C über Nacht. Dann erfolgten wiederum drei Waschschrte für jeweils 5 min mit TBST. Anschließend wurde die Membran in einer sekundären Antikörperlösung, bestehend aus einem Peroxidase (HRP) gekoppelten Sekundär-Antikörper, für 1 h bei RT inkubiert und wiederum nach Inkubation dreimal mit TBST für 10 min gewaschen. Durch Zugabe einer Entwicklungslösung (Thermofischer) wird durch die enzymatische Aktivität der Peroxidase eine Lichtemission hervorgerufen, welche entweder mit eines Röntgenfilms oder mit einer digitalen Entwicklermaschine detektiert wurde.

Trenngel (10%):	Acrylamid	3,7 ml
	Trenngelpuffer	2,75 ml
	dH ₂ O	4,6 ml
	10% APS	187 µl
	TEMED	15,4 µl
Sammelgel (6%):	Acrylamid	1,4 ml
	Sammelgelpuffer	1,75 ml
	dH ₂ O	3,8 ml
	10% APS	84 µl
	TEMED	7 µl
Sammelgelpuffer (4x):	Tris-HCl, pH 6,8	0,5 M
	SDS	15 mM

Trenngelpuffer (4x):	Tris-HCl, pH 8,8	1,5 M
	SDS	15 mM
4x Lämmli-Puffer:	20% SDS	5 ml
	Glycerin	5 ml
	Tris (1M, pH 6,8)	3 ml
	1 Spatelspitze Bromphenolblau	
	add 50 ml dH ₂ O	
WB-Puffer (10x):	Glycin	144 g
	Tris	30,3 g
	add	1 l dH ₂ O
Laufpuffer:	10x WB-Puffer	100 ml
	dH ₂ O	900 ml
	20% SDS	5 ml
Transferpuffer:	10x WB-Puffer	100 ml
	dH ₂ O	700 ml
	Methanol	200 ml
	20% SDS	1,5 ml

4.2.3.5 Ko-Immunopräzipitation (Co-IP)

Mit einer Ko-Immunopräzipitation kann man die Interaktion zweier Proteine in einem Zelllysate analysieren. Hierzu wird mit einem spezifischen Antikörper, der gegen das gesuchte Protein gerichtet ist, dieses präzipitiert und anschließend das Präzipitat je nach Antikörpertyp mit Protein A oder G Sepharose-Kügelchen aufgereinigt. Hierbei bindet der Fc-Teil des präzipitierenden Antikörpers an die Sepharose. Für eine Ko-Immunopräzipitation wurden HEK-293T Zellen mit den Plasmiden, die für die beiden zu untersuchenden Proteine kodieren, ko-transfiziert und je nach Ansatz für 5 h mit TPA/Iono restimuliert oder nicht. Die Ernte der Zellen zur Gewinnung des Zelllysates erfolgte mit dem IP-Lysepuffer der Firma ThermoScientific. Hierzu wurde pro 10 cm Kulturschale 1 ml IP-Lysepuffer, welcher mit 1 x Protease-Inhibitoren versetzt war, auf die Zellen gegeben und für 10 min auf dem

Schüttler bei hoher Schüttelrate inkubiert. Die lysierten Zellen wurden daraufhin in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. 50 µl dieses Zelllysates wurde in ein anderes 1,5 ml Reaktionsgefäß pipettiert und mit 20 µl 4x Lämmli-Puffer bei 95°C für 5 min aufgeköcht. Dies diente als Inputkontrolle. Zum Rest des Zelllysates wurde ein präzipitierender Antikörper (3-5µg) gegeben und alles über Nacht auf einem Drehrad bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte die Zugabe von 50 µl Protein A oder G Sepharose-Kügelchen und eine Inkubation für weitere 4 h auf einem Drehrad. Anschließend wurde der Ansatz fünfmal mit IP-Waschpuffer durch Zugabe und Zentrifugation (IP-Lysepuffer ohne Protease-Inhibitoren) gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurde der Überstand möglichst komplett entfernt und das Pellet mit 50 µl 4x Lämmli-Puffer bei 95°C für 5 min aufgeköcht. Die Analyse der Protein-Ko-Immunopräzipitation erfolgte dann mittels Westernblot-Analysen.

4.2.4 Arbeiten mit Nukleinsäure

4.2.4.1 Isolation von genomischer DNA

Zur Bestimmung des Genotyps von genetisch veränderten Mäusen wurden Mausschwanzbiopsien für die Isolation der genomischen DNA und anschließender PCR-Analyse verwendet. Hierzu wurden die Schwanzbiopsien in 20 µl Lyse-Puffer, welcher mit Proteinase K versetzt war, für 4-5 h bei 55°C aufgeköcht. Zum Abstoppen der enzymatischen Wirkung der Proteinase K wurden die Proben nach Zugabe von 280 µl dH₂O für 10 min bei 95°C aufgeköcht. Die so, durch Gewebeverdau, gewonnene genomische DNA wurden zur Analyse des Genotyps in PCR-Reaktionen (siehe 4.2.4.5) eingesetzt.

Lysepuffer:	Tris, pH 8,5	100 mM
	EDTA, pH 8,0	5 mM
	NaCl	200 mM
	SDS	0,2%
	Proteinase K	1000 U/ml

4.2.4.2 Präparation von RNA mit Trizol

Zur Isolation von RNA aus Zellen und Geweben wurde Trizol (Invitrogen) verwendet. Die Methode, auf der die Isolation mit Trizol beruht, ist die Phenol-Chloroform-Aufreinigung von Nukleinsäuren, da Trizol Phenol enthält. Für die Isolation von RNA wurden mindestens $1,0 \times 10^6$ Zellen in 1 ml Trizol aufgenommen und durch mehrmaliges Pipettieren vermischt und für 5 min bei RT inkubiert. Daraufhin erfolgte eine Zugabe von 200 μ l Chloroform. Die Proben wurden kräftig durchmischt (Vortexer) und für 10 min bei RT inkubiert. Durch anschließende Zentrifugation der Proben bei 7500 rpm für 5 min erfolgte eine Auftrennung in drei Phasen. Die obere wässrige Phase enthielt die isolierte RNA und wurde vorsichtig mit einer Pipette abgenommen und in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Durch Zugabe von 600 μ l Isopropanol wurde die RNA präzipitiert und durch Zentrifugation bei 14000 rpm für 10 min bei 4°C pelletiert. Nach vorsichtiger Abnahme des Überstandes wurde die RNA mit eiskaltem 80%igen Ethanol gewaschen und das RNA Pellet an Luft getrocknet, bis es in 50 μ l DEPC H₂O gelöst wurde. Die isolierte gelöste RNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

4.2.4.3 Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA

Zur Konzentrationsbestimmung von RNA wurde ein NanoDrop-Spektrometer (PeqLab) verwendet. Hierbei wurde die Absorption bei 260 nm von 1,5 μ l einer RNA-Probe gemessen. Für die Bestimmung der Konzentration von DNA wurde eine 1:70 Verdünnung mit dH₂O hergestellt und in einer Quarzküvette in einem Spektrometer photometrisch die DNA Konzentration bestimmt (Absorption bei 280 nm). Neben der Konzentration kann photometrisch auch die Reinheit der RNA oder DNA anhand des Quotienten der Adsorption von 260/280 nm bestimmt werden. Dieser Wert sollte für RNA, sowie bei DNA bei 1,8 bis 2,0 liegen.

4.2.4.4 Reverse Transkription von RNA in cDNA

RNA kann durch die Verwendung der Reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben werden. Dieses Enzym ist eine RNA-abhängige DNA-Polymerase die eine RNA-Matrize in DNA umschreiben kann. Hierzu wurden entweder Oligo-d(T)-Primer für die spezifische

Umschreibung von mRNA oder randomisierte Oligo-Hexamere für allgemein RNA-Matrizen verwendet. Für die cDNA-Synthese von isolierter RNA aus Zellen und Geweben wurde das iScript cDNA-Synthese Kit der Firma BioRad nach Herstellerangaben verwendet. Die so gewonnene cDNA wurde nachfolgend in qRT-PCR Analysen eingesetzt.

4.2.4.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Mit der Methode der Polymerase-Kettenreaktion kann ein gewünschtes DNA-Fragment vervielfältigt werden. Hierzu werden spezifische Primer für das DNA-Stück und eine DNA-Polymerase benötigt. Die DNA-Polymerase ist ein Enzym, das einzelsträngige DNA in doppelsträngige DNA umschreibt. In einer zyklischen Abfolge von Denaturierung der DNA bei 95°C (Trennung der Doppelstränge in Einzelstränge), Hybridisierung der Primer (*Annealing*) bei 55-65°C und darauffolgender enzymatischen Elongation der Primer anhand der DNA-Matrize durch die DNA-Polymerase bei 72°C, kann so ein DNA-Fragment exponentiell vermehrt werden. Diese drei aufeinanderfolgenden Schritte wurden standardmäßig in einer PCR-Reaktion für 35 Zyklen wiederholt. Für eine PCR-Reaktion wurde der 2x PCR-MasterMix (ThermoScientific) verwendet, der alle wichtigen Komponenten, wie die Taq-Polymerase, dNTPs und MgCl₂ enthält. Im Folgenden ist ein Standardansatz einer 20 µl PCR-Reaktion aufgeführt. Die so vervielfältigten DNA-Fragmente wurden anhand einer Agarosegel-Elektrophorese aufgetrennt und analysiert.

PCR-Reaktionsansatz:	10 µl	2x PCR-Mastermix
	0,25 µl	<i>forward</i> -Primer (100 µM)
	0,25 µl	<i>reverse</i> -Primer (100 µM)
	1 µl	DNA (1µg/ml)
	9,5 µl	dH ₂ O

4.2.4.6 Quantitative Real-time PCR (qRT-PCR) Analyse von mRNA mit SYBRgreen®

Die Methode der qRT-PCR, auch Real-time PCR genannt, ermöglicht die Quantifizierung von mRNA eines bestimmten Gens innerhalb einer Zellprobe. Hierzu wird die aus mRNA gewonnen cDNA als Matrize für eine PCR-Reaktion eingesetzt. Mit Hilfe von SYBRgreen®, einem in die DNA interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff, kann somit in „Echtzeit“ die

Amplifikation einer cDNA-Probe gemessen werden. Je mehr an „Template“, also cDNA eines Gens, in einer Probe vorhanden ist, um so eher erreicht die emittierte Fluoreszenz einen sogenannten Schwellenwert (Ct-Wert). Anhand dieser Ct-Werte kann nach Normalisierung auf ein ubiquitär exprimiertes Gen wie z. B. β -Aktin oder GAPDH, die relative Herauf- oder Herunterregulation der Genexpression einer Probe im Vergleich zu einer anderen berechnet werden ($\Delta\Delta$ Ct-Methode). Für qRT-PCR Analysen wurde der Power SYBRgreen[®] 2x PCR-Mastermix der Firma Applied Biosystems nach Herstellerangaben verwendet.

20 μl qRT-PCR-Ansatz:	10 μ l	2x SYBRgreen PCR Mix
	0,5 μ l	<i>forward</i> -Primer (2,5 μ M)
	0,5 μ l	<i>reverse</i> -Primer (2,5 μ M)
	1 μ l	cDNA
	8 μ l	dH ₂ O

4.2.4.7 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte durch Agarosegel-Elektrophorese. Die aufgrund der Phosphatreste negativ geladene DNA wandert hierbei in einem elektrischen Feld zum Pluspol. Kleinere Fragmente wandern schneller durch die Maschen des Agarosegels als große DNA-Fragmente, wodurch die DNA-Fragmente der Größe nach aufgetrennt werden. Die Größenanalyse erfolgte mit Hilfe eines DNA-Markers mit Fragmenten bekannter Größe (1 kb DNA-Leiter, ThermoScientific).

4.2.4.4 Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP)

Die Methode der Chromatin-Immunpräzipitation ermöglicht die Identifizierung der Bindung von Transkriptionsfaktoren an bestimmte DNA-Sequenzen. Zur ChIP-Analyse wurde auf das Kit ChIP-IT Express der Firma Active Motif zurückgegriffen. Die Durchführung erfolgte anhand der Herstellerangaben. Zum Zerkleinern des Chromatins wurden die Proben mit Ultraschall sonifiziert. Die Sonifizierung erfolgte auf Eis bei einer Amplitude von 35% für insgesamt 20 min, bei einem Pulse *on* für 30 sec und *off* für 30 sec. Das Verkleinern des Chromatins in 1500 bp - 200 bp große Stücke, was für eine ChIP-Analyse optimal ist, wurde mit Hilfe eines 1%igen Agarosegels analysiert. War das Chromatin in gewünschter Weise

zerkleinert, erfolgte die Immunpräzipitation mit einem anti-NFATc1 spezifischen Antikörper (5 µg) sowie einer entsprechenden Isotypkontrolle (5 µg) über Nacht bei 4°C auf einem rotierenden Drehrad. Für jede IP-Reaktion wurden 20 µg Chromatin verwendet. Am nächsten Tag erfolgten die Elution und der *Reverse Crosslink* anhand Herstellerangaben. Als Input Kontrolle dienten 10 µl reines Chromatin, welches vor der Zugabe des präzipitierenden Antikörpers abgenommen wurde. Die durch den Antikörper präzipitierten Chromatin-Fragmente wurden anschließend mit Hilfe eines PCR-Aufreinigungs-Kit (Quiagen) isoliert und für eine qRT-PCR Analyse verwendet. Die Auswertung der relativen Bindung im Vergleich zur Isotypkontrolle wurde mit der $\Delta\Delta C_t$ -Methode berechnet.

4.2.5 Histologische Methoden

4.2.5.1 Präparation von ZNS-Gewebe

Zur Präparation von Gehirn und Rückenmark wurden die Mäuse mit CO₂ euthanisiert und mit 10 ml PBS perfundiert. Anschließend wurde das Gehirn und das Rückenmark vorsichtig – möglichst ohne Beschädigung der Organe – heraus präpariert und in TissueTek (Finetek) eingebettet und mit flüssigem Stickstoff schockgefroren. Das so kryokonservierte ZNS-Gewebe wurde bis zur Herstellung von Kryoschnitten bei -20°C gelagert.

4.2.5.2 Herstellung von Kryoschnitten

Für Kryoschnitte von Gehirn und Rückenmark wurde ein Kryotom CM1950 der Firma Leica verwendet. Es wurden je nach Ansatz 8-10 µm dicke Schnitte angefertigt und auf Objekträger gezogen. Diese Kryoschnittpräparate wurden bis zur weiteren Verwendung d. h. für H&E-Färbungen und Immunfluoreszenzfärbungen (siehe 4.2.5.4) bei -20°C gelagert.

4.2.5.3 H&E-Färbung

Zur histologischen Analyse von Immunzellinfiltraten von Rückenmark und Gehirn wurden Kryoschnitte mit der Hämatoxylin und Eosin-Färbung gefärbt. Mit Hilfe dieser histologischen Färbemethode kann man entzündliche Infiltrate in Geweben nachweisen. Hämatoxylin ist ein Farbstoff, der saure Strukturen wie Zellkerne, DNA, Ribosomen und das raue

endoplasmatische Retikulum (ER) anfärbt. Eosin dagegen färbt basische Verbindungen und somit Zytoplasmaproteine, Mitochondrien und das glatte ER an. Hierzu wurden Kryoschnitte zunächst mit Hämatoxylin gefärbt (3 min) und nach Spülen mit Leitungswasser (3-5 min) zur Differenzierung der Färbung mit Eosin gefärbt (3 min). Anschließend wurde die Schnitte in einer ansteigenden Xylol Reihe fixiert und mit Eindeckmedium und Deckglas fixiert. Die Analyse der H&E-Färbung erfolgte an einem normalen Lichtmikroskop.

4.2.5.4 Immunfluoreszenzfärbung

Für die Immunfluoreszenzfärbung von Rückenmarkspräparaten (Kryoschnitte) wurden diese zunächst für 5 min bei RT aufgetaut und anschließend in Xylol fixiert. Nach Blocken für 30 min in Blockierungspuffer, einer 1:20 Verdünnung von Eselserum in PBS, erfolgte die Inkubation mit dem ersten Antikörper für 1 h bei RT. Der erste Antikörper wurde in Blockierungspuffer angesetzt. Nach dreimaligem Waschen für 5 min mit PBS wurde der sekundäre fluorophor-gekoppelte Antikörper (verdünnt in PBS) auf die Kryoschnitte gegeben und ebenfalls für 1 h bei RT im Dunkeln inkubiert. Nach wiederum dreimaligem Waschen mit PBS für 5 min wurden die Schnitte in Eindeckmedium, was zur Anfärbung der Zellkerne mit DAPI versetzt war, mit Deckgläsern fixiert und bis zur Verwendung bei 4°C gelagert. Die Analyse der Immunfluoreszenzfärbungen erfolgte mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops Zeiss Imager.Z1m und der Software AxioVision (Zeiss).

Für die Färbung von Zytospinpräparaten wurden die, auf die Objektträger gespinnten Zellen, über Nacht getrocknet und anschließend mit PBS (0,2% Triton-X) für 10 min permeabilisiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS für 5 min wurden die Zytospins 5 min mit einer 4% Formaldehydlösung fixiert und wiederum dreimal gewaschen. Zum Blockieren unspezifischer Bindungsstellen wurden die Zellen mit Blockierungspuffer 30 min inkubiert. Anschließend wurde der erste Antikörper ebenfalls in Blockierungspuffer angesetzt und auf die Zellen gegeben und über Nacht bei 4°C in einer feuchten Färbekammer inkubiert. Dann erfolgten wiederum drei Waschschrte mit PBS für 5 min. Der zweite fluorophor-gekoppelte Antikörper wurde in PBS verdünnt und 1 h bei RT im Dunkeln inkubiert. Nach drei letzten Waschschrten mit PBS für 5 min wurden die Zytospins in Eindeckmedium, Fluorchrom G versetzt mit DAPI, mit Deckgläschen fixiert und bis zur Analyse am konfokalen Fluoreszenzmikroskop TCS SP5 II (Leica Microsystems) bei 4°C gelagert.

4.2.6 Bildgebende Verfahren

4.2.6.1 Konfokale Mikroskopie

Zur konfokalen Mikroskopie von Zellen wurde ein TCS SP5 II Mikroskop der Firma Leica verwendet. Die dazugehörige Software war Leica ImagePro Plus. Die Bilder wurden in Adobe Illustrator bearbeitet und zusammengestellt.

4.2.6.2 Fluoreszenzmikroskopie

Zur Fluoreszenzmikroskopie wurde das Fluoreszenzmikroskop Zeiss Imager.Z1m (Zeiss) mit der Software AxioVision (Zeiss) verwendet. Die graphische Aufarbeitung und Darstellung erfolgte mit Adobe Illustrator.

4.2.6.3 Graphische Aufarbeitung von Daten und Statistik

Zur graphischen Darstellung und Auswertung von Daten wurde das Programm Prism5 (GraphPad) verwendet. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Student's t-Test, two-way ANOVA und dem Mann-Whitney-U-Test. Ein p-Wert von $p < 0.05$ wurde als statistisch signifikant bewertet. Die Zusammenstellung der Daten und Abbildungen erfolgte mit dem Programm Adobe Illustrator. Die FACS-Daten wurden mit dem Programm FlowJo der Firma TreeStar ausgewertet. Zusätzlich wurde zur Auswertung von Daten auch Excel 2011 von Microsoft Office verwendet.

5. Ergebnisse

5.1 Die Rolle von NFATc1 und NFATc2 bei der Immunpathogenese von Experimenteller Autoimmuner Enzephalomyelitis (EAE)

5.1.1 Analyse der *Nfatc1^{fl/fl}* x *Cd4cre⁺* Mäuse

Um die Rolle von NFATc1 im Gewebs- bzw. Zell-spezifischen Kontext analysieren zu können, wurden konditionelle *Nfatc1^{fl/fl}* Mäuse, die im Labor von Anja Rao generiert wurden, verwendet. In diesen Mäusen ist das erste gemeinsame Exon aller sechs NFATc1-Isoformen, Exon 3, von LoxP-Sequenzen flankiert. Durch eine Verpaarung dieser *Nfatc1^{fl/fl}* Mäuse mit Mauslinien, die gewebspezifisch Cre-Rekombinase exprimieren, kann ein konditioneller Verlust von NFATc1 und all seinen Isoformen hervorgerufen werden. In dieser Arbeit wurden *Cd4cre⁺* Mäuse mit *Nfatc1^{fl/fl}* Mäusen verpaart. Durch die Verwendung von *Cd4cre⁺* Mäusen erhält man eine Defizienz in CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen^{227, 228}. In vorherigen Untersuchungen zu diesem T-Zell-spezifischen Verlust von NFATc1¹⁹⁴ konnte gezeigt werden, dass Nachkommen dieser Kreuzung gesund geboren werden und keinen immunologischen Phänotyp, wie z. B. spontane Autoimmunerkrankungen, entwickeln. Auch die Immunzellpopulationen von Thymus, Milz und Lymphknoten sowie die Entwicklung und Anzahl von nTregs waren kaum verändert¹⁹⁴. Zuerst sollte anhand von *in vitro* Studien die Funktion von NFATc1-defizienten CD4⁺ T-Zellen genauer charakterisiert werden. Anschließend sollte die Auswirkung des konditionellen Verlustes von NFATc1 in CD4⁺ T-Zellen auf den Krankheitsverlauf der EAE hin untersucht werden.

5.1.1.1 NFATc1-defiziente CD4⁺ T-Zellen zeigen Aktivierungs- und Differenzierungsdefekte (*in vitro*)

5.1.1.1.1 Verminderte Proliferation und IL-2-Sekretion nach CD4⁺ T-Zellstimulation

CD4⁺ T-Zellen können *in vitro* mit monoklonalen Antikörpern, die gegen CD3 und CD28 gerichtet sind, polyklonal aktiviert werden. Durch das Binden dieser beiden Antikörper an die Oberfläche einer Kulturschale wird ein natürlicher T-Zell-Stimulus von TCR (anti-CD3) und Ko-Stimulationssignal (anti-CD28) experimentell imitiert. Zusätzlich wird so auch die

wichtige Kreuzvernetzung für eine vollständige und starke Aktivierung erreicht. Eine andere Möglichkeit der *in vitro* Stimulation von *ex vivo* isolierten CD4⁺ T-Zellen ist die Ko-Kultivierung mit APCs unter löslicher Zugabe von anti-CD3 Antikörper. In diesem Fall liefern die APCs der Kultur – über CD80/86 Interaktion mit CD28 – das notwendige ko-stimulatorische Signal. Da NFAT-Faktoren – NFATc1 sogar transkriptionell – durch TCR-Stimulation und dem damit induzierten Calciumsignalweg aktiviert werden und unter anderem die *Il2*-Expression und Proliferation induzieren^{159, 171, 189}, sollte untersucht werden, inwieweit der Verlust des Transkriptionsfaktors NFATc1 in CD4⁺ T-Zellen sich auf eine *in vitro*-Stimulation funktionell auswirkt. Daher wurden primäre CD4⁺ T-Zellen aus *Nfatc1^{fl/fl} x Cd4cre⁺* Mäusen mit wildtypischen (*wild type*) Geschwistertieren hinsichtlich ihrer Proliferation und IL-2-Sekretion in verschiedenen *in vitro* Stimulationsansätzen verglichen.

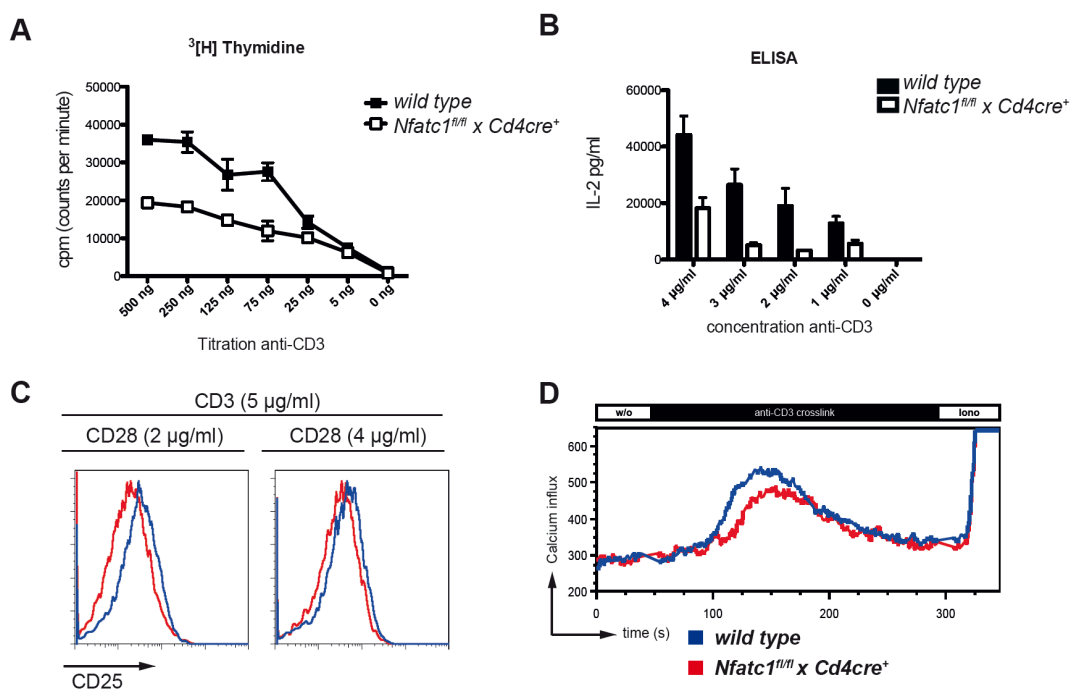


Abbildung 5.1.1: NFATc1-defiziente CD4⁺ T-Zellen weisen Aktivierungsdefekte auf.

(A) Messung der stimulationsabhängigen Proliferation von *in vitro* stimulierten *Nfatc1^{fl/fl} x Cd4cre⁺* und wildtypischen (*wild type*) CD4⁺ T-Zellen durch Inkorporation von ³[H]-Thymidin. Naive CD4⁺ T-Zellen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen an löslichem anti-CD3 Antikörper mit antigenpräsentierenden Zellen (APCs) ko-kultiviert. (B) Die stimulationsinduzierte IL-2-Sekretion wurden anhand eines IL-2 ELISA aus Überständen einer Ko-Kultur von naiven CD4⁺ T-Zellen mit APCs und einer Titration von löslichem anti-CD3 bestimmt. (C) FACS-Analyse der Oberflächenexpression von CD25 nach Stimulation mit 2 und 4 µg/ml anti-CD28 in Anwesenheit von 5 µg/ml anti-CD3. (D) Messung des Calciumeinstroms von *wild type* und *Nfatc1^{fl/fl} x Cd4cre⁺* CD4⁺ T-Zellen unter dem Einfluss von anti-CD3 Kreuzvernetzung (*crosslink*) mittels Durchflusszytometrie. Zur Vermessung von intrazellulärem Ca²⁺ wurde der Farbstoff Indo-1-AM verwendet.

In Abbildung 5.1.1 **A** ist die Proliferation anhand der Inkorporation von $^3\text{[H]}$ -Thymidin in Abhängigkeit von unterschiedlichen Konzentrationen an anti-CD3 dargestellt. *Nfatc1^{fl/fl} x Cd4cre⁺* CD4⁺ T-Zellen waren in ihrer Proliferation im Vergleich zu wildtypischen CD4⁺ T-Zellen deutlich vermindert. Auch die IL-2-Sekretion, die ebenfalls ein Maß für die CD4⁺ T-Zell-Aktivierung darstellt, war in NFATc1-defizienten T-Zellen im Vergleich zu wildtypischen T-Zellen stark reduziert (Abbildung 5.1.1 **B**). Die FACS-Analyse der Oberflächenexpression des Aktivierungsmarkers CD25 zeigte nach anti-CD28 Stimulation mit 2 bzw. 4 µg/ml in Anwesenheit von jeweils 5 µg/ml anti-CD3 eine Reduktion an CD25 auf der Oberfläche von NFATc1-defiziente CD4⁺ T-Zellen (Abbildung 5.1.1. **C**). Dies spricht, neben der verminderten Proliferation und IL-2-Synthese, ebenfalls für einen Aktivierungsdefekt von *Nfatc1^{fl/fl}* CD4⁺ T-Zellen.

Die Stimulation von CD4⁺ T-Zellen über den TCR führt zur Freisetzung von Calcium aus dem endoplasmatischen Retikulum (ER) sowie zu einem verstärkten Calciumeinstrom in das Zytoplasma über Calcium-aktivierte CRAC-Kanäle in der Plasmamembran^{229, 230}. Die Stärke des Calciumeinstrom wurde in primären CD4⁺ T-Zellen aus *wild type* und *Nfatc1^{fl/fl} x Cd4cre⁺* Mäusen mittels des fluoreszierenden Calcium-Farbstoffes Indo-1-AM am FACS nach CD3-Kreuzvernetzung (*crosslink*) gemessen. Als Positivkontrolle für den Calciumeinstrom wurde am Ende der Messung Ionomycin, ein Ionophor das den Transport von Calciumionen in die Zelle vermittelt²³¹, hinzugegeben. Wie in Abbildung 5.1.1 **D** zu sehen ist zeigten CD4⁺ T-Zellen aus *Nfatc1^{fl/fl} x Cd4cre⁺* Mäusen einen verminderten Calciumeinstrom nach anti-CD3 Stimulation. Anhand dieser *in vitro* Versuche zur Aktivierbarkeit von CD4⁺ T-Zellen, denen der Transkriptionsfaktor NFATc1 fehlt, kann man zusammenfassend die Aussage treffen, dass diese einen starken Defekt in der stimulations-induzierten Produktion von IL-2, in der Proliferation, in der Stärke des Calciumeinstroms und bei der Heraufregulation von Aktivierungsmarkern (CD25) im Vergleich zu wildtypischen CD4⁺ T-Zellen zeigten. Eine NFATc1-Defizienz resultiert daher in einem ausgeprägten Aktivierungsdefekt.

5.1.1.1.2 Gestörte *in vitro* T-Helfer-Zell Differenzierung von primären CD4⁺ T-Zellen aus *Nfatc1^{fl/fl} x Cd4cre⁺* Mäusen

NFAT-Transkriptionsfaktoren sind nicht nur maßgeblich bei der Aktivierung von T-Zellen sondern auch bei Differenzierungsvorgängen in die verschiedenen T-Helfer(Th)-Zelltypen beteiligt^{169, 208}. Um herauszufinden, ob die Differenzierung von primären CD4⁺ T-Zellen aus *Nfatc1^{fl/fl} x Cd4cre⁺* Mäusen in Th-Zellen aufgrund des Fehlens von NFATc1 beeinflusst ist,

wurden *Nfatc1^{fl/fl}* und wildtypische CD4⁺ T-Zellen *in vitro* mit anti-CD3/CD28 stimuliert und drei Tage zu Th1- und Th17-Zellen differenziert. Anschließend wurde die Zytokinproduktion mit einer intrazellulären FACS-Färbung analysiert (Abbildung 5.1.2 A). Die Zahl an IFN γ -Produzenten unter Th1-Bedingungen und an IL-17A-Produzenten unter Th17-Bedingungen war jeweils deutlich reduziert. Im Fall der Th17-Zellen zeigte sich sogar eine zweifache Reduktion an IL-17A positiven CD4⁺ T-Zellen von *Nfatc1^{fl/fl} x Cd4cre⁺* im Vergleich zum Wildtyp (Abbildung 5.1.2 A).

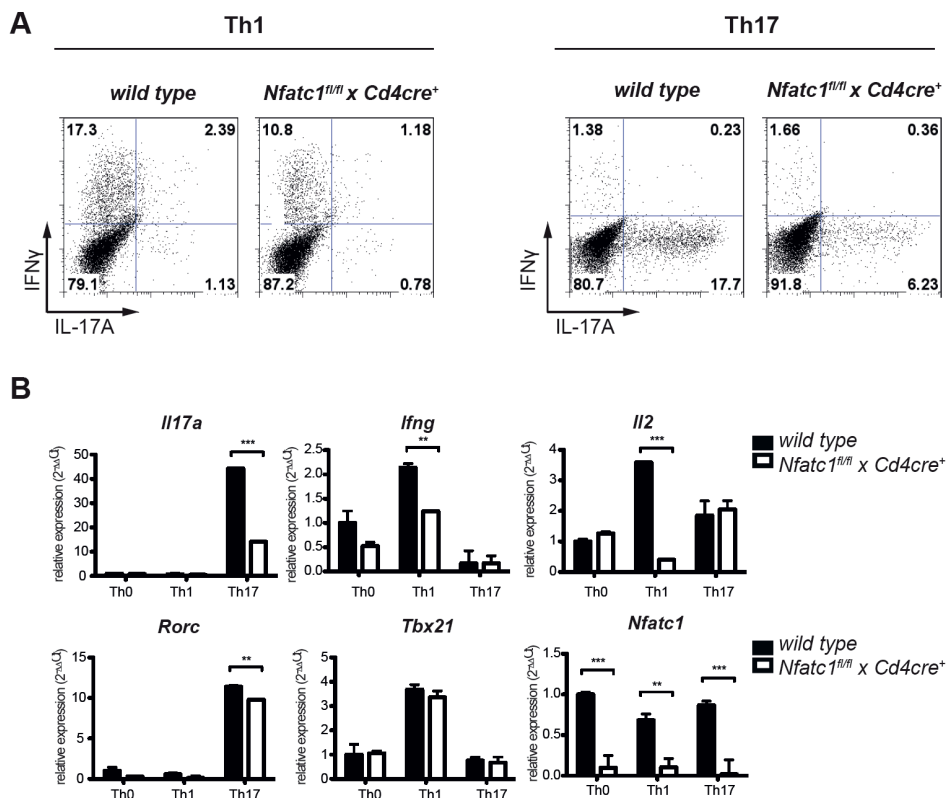


Abbildung 5.1.2: *In vitro* Differenzierungsdefekt von CD4⁺ T-Zellen aufgrund des Fehlens von NFATc1.

Naive CD4⁺ T-Zellen von *wild type* und *Nfatc1^{fl/fl} x Cd4cre⁺* Mäusen wurden drei Tage *in vitro* zu Th1- und Th17-Zellen differenziert. (A) Intrazelluläre FACS-Analyse der IFN γ und IL-17A Produktion nach 5h Restimulation mit TPA/Iono. (B) qRT-PCR Analyse der Expression von *Il17a*, *Ifng*, *Il2*, *Rorc*, *Tbx21* und *Nfatc1* von Th0-, Th1- und Th17-Zellen.

Um zu analysieren, ob sich dieser Defekt in der Th-Entwicklung auch auf Ebene der Genexpression nachweisen lässt, wurden an Tag drei Th0-, Th1- und Th17-Zellen von *Nfatc1^{fl/fl} x Cd4cre⁺* und *wild type* Kulturen geerntet und eine qRT-PCR Analyse der mRNA-Expression der Zytokine *Il17a*, *Ifng* und *Il2*, sowie der mRNA der linienspezifischen Transkriptionsfaktoren *Rorc* und *Tbx21* durchgeführt (Abbildung 5.1.2 B). Anhand der qRT-

Daten zeigte sich, dass der Defekt bei der Th-Differenzierung für *Nfatc1^{fl/fl}* CD4⁺ T-Zellen auch auf der Ebene der Genexpression vorhanden war. Dies wurde durch die signifikant reduzierten relativen Expressionswerte von *Il17a* in der Th17-Kultur und *Ifng* unter Th1-Bedingungen deutlich (Abbildung 5.1.2 **B**). Auch die Expression von *Rorc*, welches für den Transkriptionsfaktor ROR γ t, dem „Master“-Transkriptionsfaktor der Th17 CD4⁺ T-Helfer-Zelllinie kodiert²³², war in Abwesenheit von NFATc1 reduziert. Die Expression des Th1-linienspezifische und durch *Tbx21* kodierte Transkriptionsfaktor T-bet²³³ blieb dagegen aufgrund der Defizienz von NFATc1 unverändert (Abbildung 5.1.2 **B**).

Der Verlust von NFATc1 in CD4⁺ T-Zellen führte somit sowohl auf Protein als auch auf mRNA Ebene unter Th1- und Th17-Bedingungen zu einer stark verminderten Produktion der linienspezifischen Zytokine IFN γ und IL-17A. Ebenso zeigte sich, dass im Falle der Th17 CD4⁺ T-Zellen auch die Expression des linienspezifischen Transkriptionsfaktors ROR γ t durch den Verlust von NFATc1 beeinträchtigt war. NFATc1-defizienten CD4⁺ T-Zellen zeigten also eine verminderte Th-Differenzierung.

5.1.1.2 Der Verlust von NFATc1 wirkt sich positiv auf den Krankheitsverlauf der EAE aus

5.1.1.2.1 *Nfatc1^{fl/fl}* x *Cd4cre⁺* Mäuse zeigen einen verminderten EAE-score mit reduzierter Anzahl von CD4⁺ T-Zellen im ZNS

Das Tiermodell der MS, die EAE, kann in Mäusen durch die aktive Immunisierung mit CFA/MOG₃₅₋₅₅ induziert werden¹⁰⁶. Nach ca. 10 Tagen zeigen die immunisierten Mäuse erste EAE-Symptome, mit einer Krankheitsspitze von Tag 14 bis Tag 16 und einem Abklingen der Lähmungserscheinungen ab ca. Tag 20. Die EAE-Krankheitsanzeichen können anhand eines Zahlen-scores definiert werden, wobei ein score von null für keine EAE-Anzeichen – also für eine gesunde Maus – steht und der höchste Wert vier für eine komplette Lähmung beider Hinterbeine verwendet wird. In den *in vitro* Studien zur Analyse der Auswirkung der Defizienz von NFATc1 auf die Aktivierung von CD4⁺ T-Zellen (Abschnitt 5.1.1.1.1) und die Differenzierung zu Th1- und Th17-Zellen (Abschnitt 5.1.1.1.2) konnte gezeigt werden, dass der Verlust von NFATc1 in beiden Fällen in einer verminderten Aktivierung und Th-Entwicklung resultierte. In der EAE werden naive CD4⁺ T-Zellen in der Peripherie durch die Immunisierung mit Freund's Adjuvanz (CFA) und mit dem Myelinpeptid MOG₃₅₋₅₅ aktiviert. Diese MOG₃₅₋₅₅-spezifischen CD4⁺ T-Zellen, insbesondere Th1- und Th17-Zellen,

wandern in das ZNS ein und gelten daher als Mediatoren für die Auslösung der ZNS-Entzündungsreaktion^{50, 234}. Somit stellte sich die Frage, ob die *in vitro* beobachteten Defekte in Bezug auf die Aktivierung und Differenzierung von NFATc1-defizienten CD4⁺ T-Zellen sich auch *in vivo* im EAE-Modell zeigen und sich möglicherweise protektiv auswirken. In Abbildung 5.1.3 A ist exemplarisch ein EAE-Graph, von insgesamt sechs EAE-Experimenten mit gleicher Aussage, dargestellt. Der Durchschnitts-score (*mean score*) der *Nfatc1^{fl/fl} x Cd4cre⁺* Gruppe war jeweils signifikant niedriger im Vergleich zum Durchschnitts-score der wildtypischen Mäuse. In der dargestellten EAE zeigte sich dies nicht nur über den gesamten Verlauf der EAE, sondern auch anhand der einzelnen *score*-Werte an Tag 15, dem Krankheits-Höhepunkt (Abbildung 5.1.3 A).

Durch histologische H&E-Färbungen von Rückenmarksschnitten kann man anhand der blauen Kernfärbung die Anhäufung von Immunzellinfiltraten in den äußeren kortikalen Bereichen des ZNS nachweisen. Die H&E-Färbung vom wildtypischen Rückenmark zeigte deutlich mehr und größere Infiltratbereiche als die Färbung von *Nfatc1^{fl/fl} x Cd4cre⁺* Rückenmark (Abbildung 5.1.3 B). Somit ließ sich auch histologisch anhand geringerer entzündlicher Infiltrate im ZNS von *Nfatc1^{fl/fl} x Cd4cre⁺* Tieren eine verminderte EAE nachweisen.

Da die Krankheitsstärke der EAE mit der Anzahl an CD4⁺ T-Zellen, die in das ZNS einfiltrieren, zusammenhängt¹⁴⁴, wurde untersucht, ob sich in Frequenz und absoluter Zellzahl ein Unterschied in der CD4⁺ T-Zellpopulation im ZNS der beiden Mausgruppen finden lässt. Hierzu wurden zunächst allgemein die Zusammensetzung der Infiltrate und deren prozentuale Verteilung in Lymphozyten, Makrophagen und Mikrogliazellen anhand einer FACS-Färbung von CD45 und CD11b bestimmt. Die Populationen können hierbei wie folgt differenziert werden. Lymphozyten sind in dieser Färbung CD45⁺CD11b⁻, Makrophagen sind CD45⁺CD11b⁺ und die ZNS-residenten Mikrogliazellen CD45^{low} und CD11b^{low}. Zusätzlich wurde auch mit einem anti-CD4 Antikörper gefärbt, so dass in einer Darstellung von CD45 gegen CD4 im FACS-plot die CD4⁺ T-Zellpopulation eingegrenzt werden konnte (siehe Abbildung 5.1.3 C und D). Im ZNS von *Nfatc1^{fl/fl} x Cd4cre⁺* Mäusen fanden sich weniger Lymphozyten und signifikant weniger CD4⁺ T-Zellen als in wildtypischen Geschwistertieren. Die Populationen an Makrophagen und Mikroglia waren hingegen nicht signifikant verändert (siehe Abbildung 5.1.3 C). Ebenso war die absolute Zellzahl im ZNS von *Nfatc1^{fl/fl} x Cd4cre⁺* Mäusen im Vergleich zur Milz und zu den drainierenden (inguinalen) Lymphknoten deutlich verringert.

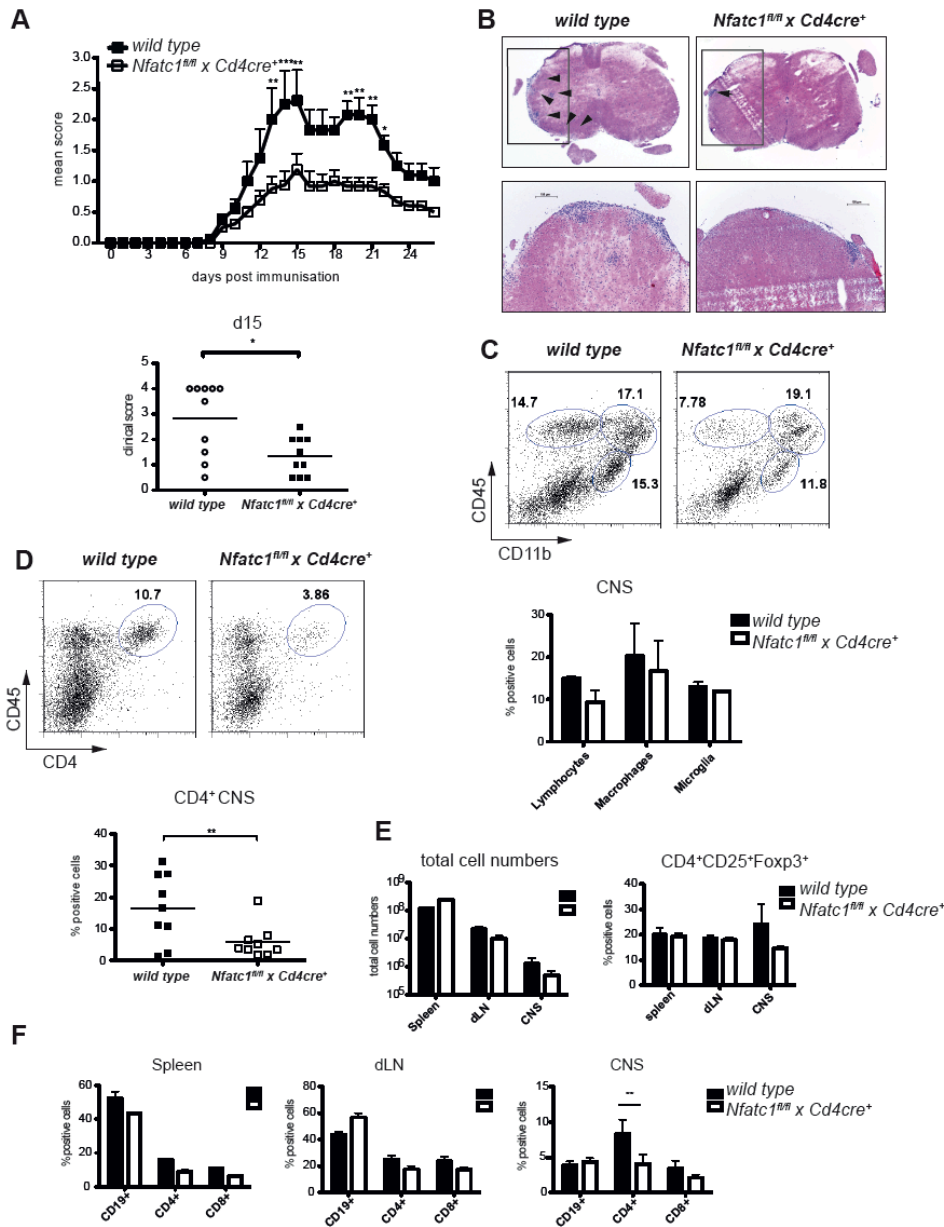


Abbildung 5.1.3 (A-E): $Nfatc1^{fl/fl} \times Cd4cre^{+}$ Mäuse zeigen eine verminderte EAE mit reduzierter Infiltration an CD4⁺ T-Zellen.

(A) Dargestellt ist der mittlere Durchschnittswert (*mean score*) über den gesamten Verlauf einer EAE von $Nfatc1^{fl/fl} \times Cd4cre^{+}$ und *wild type* Mäusen. Mittels des statistischen two-way ANOVA Tests wurde die Signifikanz des *mean score* Unterschieds berechnet (* $p < 0.05$). Zusätzlich ist der Unterschied an d 15 der EAE anhand der Einzel-score-Werte aller 10 Mäuse pro $Nfatc1^{fl/fl} \times Cd4cre^{+}$ und *wild type* Gruppe dargestellt (Student *t*-Test). (B) An d 15 der EAE wurden das Rückenmark präpariert und davon Kryoschnitte für eine histologische H&E-Färbung angefertigt. Infiltratregionen zeichnen sich durch Zellkernanhäufungen aus, diese wurde jeweils mit schwarzen Pfeilen markiert. Darunter befindet sich eine vergrößerte Bildaufnahme. (C) FACS-Färbung von ZNS-Infiltraten von $Nfatc1^{fl/fl} \times Cd4cre^{+}$ und wildtypischen (*wild type*) Mäusen. Lymphozyten (*Lymphocytes*) sind CD45⁺ CD11b⁻, Makrophagen (*Macrophages*) CD45⁺ CD11b⁺, Mikroglia (*Microglia*) CD45^{low} CD11b^{low}. Dargestellt sind jeweils ein repräsentativer FACS-plot sowie die statistische Auswertung mehrerer FACS-Färbungen von EAE-Experimenten. (D) FACS-Färbung der CD4⁺ Population im ZNS von EAE-Mäusen. Gezeigt wird ein repräsentativer FACS-plot sowie die Statistik aller FACS-Färbungen von CD4⁺ T-Zellen im ZNS von $Nfatc1^{fl/fl} \times Cd4cre^{+}$ Mäusen im Vergleich zu *wild type* Mäusen. (E-F) Dargestellt sind die absoluten Zellzahlen von Milz (*Spleen*), drainierenden Lymphknoten (*dLN*) und ZNS (*CNS*) sowie die FACS-Färbung von CD19⁺, CD4⁺ und CD8⁺ Lymphozyten aus Milz, dLN und ZNS von EAE-Mäusen sowie die Verteilung an Foxp3⁺ regulatorischen T-Zellen in den drei Organen.

Bei Auswertung der prozentualen Verteilung im ZNS zeigte sich spezifisch für CD4⁺ T-Zellen, nicht aber für die Population der CD19⁺ B-Zellen und der CD8⁺ T-Zellen, eine Veränderung zwischen *wild type* und *Nfatc1^{fl/fl} x Cd4cre⁺* Mäusen (Abbildung 5.1.3 E-D). Die Population an Tregs war ebenfalls nur im ZNS reduziert.

Der Verlust von NFATc1 in T-Zellen wirkte sich also positiv hinsichtlich der Schwere des Krankheitsverlaufs der EAE aus. Dies konnte anhand des geringeren EAE-score sowie an der verminderten Größe und Zusammensetzung von entzündlichen Infiltraten im ZNS-Gewebe belegt werden. Insbesondere die Anzahl an transmigrierten CD4⁺ T-Zellen war signifikant reduziert.

5.1.1.2.2 CD4⁺ T-Zellen von *Nfatc1^{fl/fl} x Cd4cre⁺* Mäusen zeigen nach MOG₃₅₋₅₅-Restimulation ein reduziertes enzephalitogenes Potential

Mit einer *in vitro* Restimulation von MOG₃₅₋₅₅-spezifischen CD4⁺ T-Zellen durch Titration des MOG₃₅₋₅₅-Peptid in einer Kultur aus Gesamtmilzzellen kann zum einen die Proliferation und zum anderen die Menge an sekretierten Zytokinen in Antwort auf diese spezifische Reaktivierung analysiert werden. Um zu quantifizieren, ob NFATc1-defiziente CD4⁺ T-Zellen bei dieser Restimulation einen Defekt in Proliferation und Zytokinproduktion zeigen, wurden sowohl Milzzellen von wildtypischen als auch von *Nfatc1^{fl/fl} x Cd4cre⁺* Mäusen mit einer aufsteigenden Konzentrationsreihe an MOG₃₅₋₅₅ drei Tage kultiviert. Die Mengen an sezerniertem IL-17A, IFN γ und IL-2 im Überstand der Kultur wurden im ELISA analysiert. Die Proliferation in Antwort auf MOG₃₅₋₅₅-Restimulation wurde durch ³[H]-Thymidin-Einbau gemessen (Abbildung 5.1.4 A). Übereinstimmend mit den *in vitro* Daten (Abschnitt 5.1.1.1.2) und dem reduzierten Krankheits-score (Abschnitt 5.1.1.2.1), sezernierten NFATc1-defiziente CD4⁺ T-Zellen in Antwort auf die MOG₃₅₋₅₅-Restimulation signifikant weniger IFN γ , IL-17A und IL-2. Auch die Proliferation war gegenüber wildtypischen Geschwistertieren deutlich vermindert.

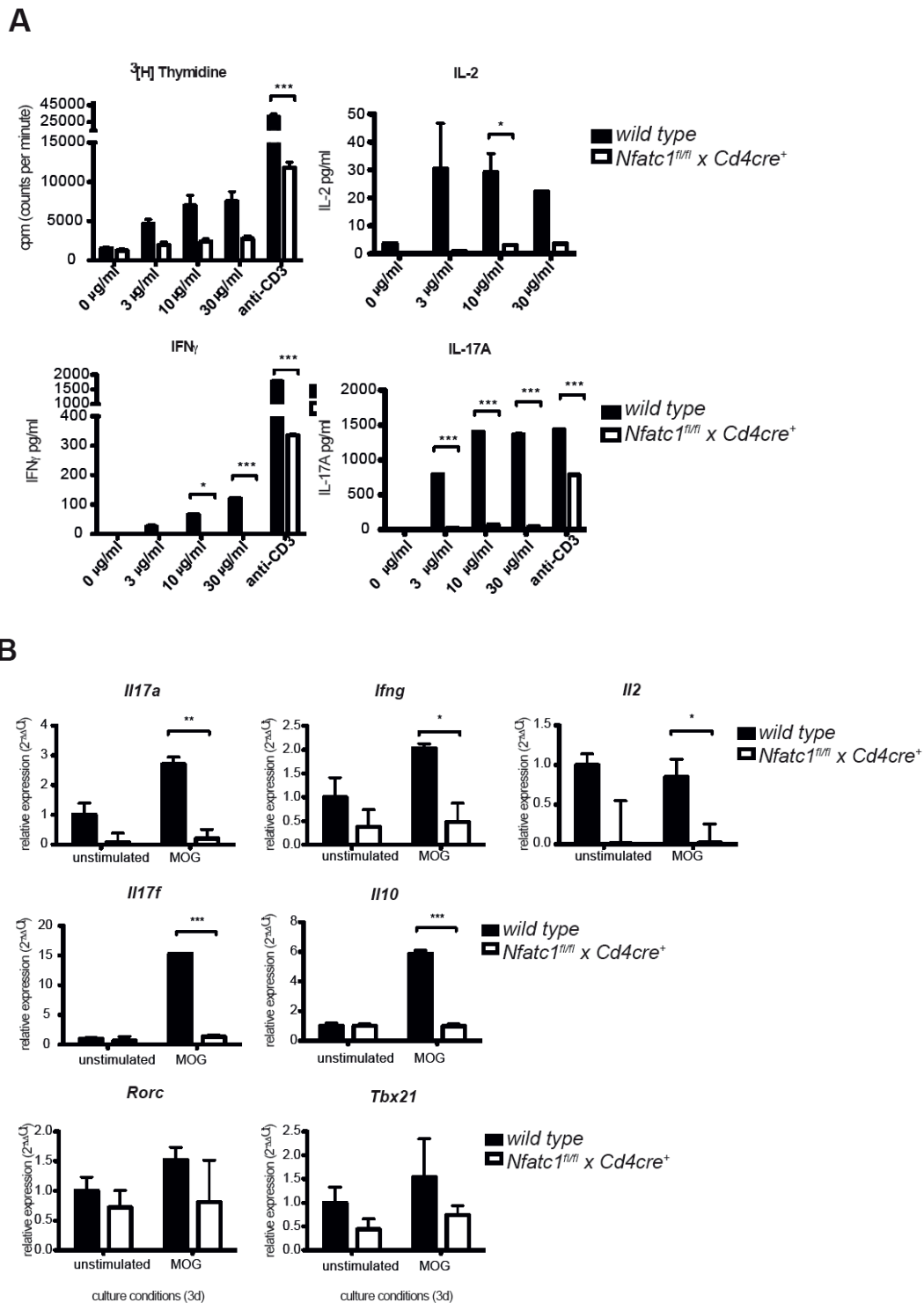


Abbildung 5.1.4: CD4⁺ T-Zellen von *Nfatc1^{fl/fl} x Cd4cre⁺* EAE-Mäusen sind weniger enzephalitogen.

(A) MOG₃₅₋₅₅-Reaktivierungskultur von Gesamtmilzzellen aus *wild type* und *Nfatc1^{fl/fl} x Cd4cre⁺* EAE-Mäusen. Zu sehen ist die Menge an sekretiertem IL-17A, IFN γ und IL-2, die jeweils mit Hilfe von ELISA bestimmt wurde. Ebenso wurde die Proliferation mit ³[H]-Thymidin analysiert. (B) qRT-PCR Analyse der relativen Expression von *Il17a*, *Il17f*, *Ifng*, *Il2*, *Il10*, *Rorc* und *Tbx21* von CD4⁺ T-Zellen unter unstimulierten Bedingungen (*unstimulated*) oder unter MOG₃₅₋₅₅ Stimulation. Hierzu wurden Gesamtmilzzellen drei Tage mit oder ohne 30 μ g/ml MOG₃₅₋₅₅ kultiviert und anschließend die CD4⁺ T-Zellen aufgereinigt und RNA präpariert.

Zusätzlich zur Bestimmung der sekretierten Menge an Zytokinen wurden in einem ähnlichen Ansatz Milzzellen von *Nfatc1^{fl/fl} x Cd4cre⁺* und *wild type* Mäusen jeweils drei Tage ohne oder mit 30 µg/ml MOG₃₅₋₅₅ in Kultur genommen, um auf mRNA-Ebene Unterschiede in der Expression von Zytokinen und Transkriptionsfaktoren zu analysieren. Nach MOG₃₅₋₅₅-Restimulation zeigten wildtypische CD4⁺ T-Zellen einen deutlichen Anstieg in der relativen Expression von *Il17a*, *Il17f*, *Ifng* und *Il2*. Auch eine erhöhte Expression der Transkriptionsfaktoren *Rorc* sowie *Tbx21* war nachzuweisen. Die MOG₃₅₋₅₅-restimulierten CD4⁺ T-Zellen der *Nfatc1^{fl/fl} x Cd4cre⁺* Mäuse dagegen zeigten eine vergleichbare Induktion dieser mRNAs nicht. Zusätzlich war die relative Expression dieser Gene, im Vergleich zu wildtypischen Kontrollen, vor und nach MOG₃₅₋₅₅-Restimulation deutlich reduziert (siehe Abbildung 5.1.4 B). In der Summe äußerte sich der Verlust von NFATc1 im EAE-Modell in einer schlechteren Antwort von MOG₃₅₋₅₅-spezifischen CD4⁺ T-Zellen auf eine erneute Stimulation mit dem MOG₃₅₋₅₅-Peptid, was sowohl auf Proteinebene als auch auf mRNA-Ebene sowie für die MOG₃₅₋₅₅-spezifischen Proliferation in Reaktivierungsversuchen nachgewiesen werden konnte. Dies spricht wiederum für einen generellen Aktivierungsdefekt von NFATc1-defizienten CD4⁺ T-Zellen.

5.1.1.2.3 Ex vivo NFATc1-defiziente CD4⁺ T-Zellen aus dem ZNS zeigen ein stark reduziertes pathogenes Zytokinprofil

In der EAE wird einigen Zytokinen ein sehr pathogenes Potential zugeschrieben²³⁵. So gelten Th1- und Th17-Zytokine als besonders krankheitsfördernd, wobei hier besonders die gleichzeitige Sekretion von IL-17A und IFN γ von sogenannten Doppelproduzenten¹²⁴ und GM-CSF als weiteres Th17-Zell-Zytokin²³⁶ zu nennen sind. Nachdem zum einen gezeigt werden konnte, dass nicht nur weniger CD4⁺ T-Zellen in das ZNS von *Nfatc1^{fl/fl} x Cd4cre⁺* Mäusen infiltrierten (Abschnitt 5.1.1.2.1) und zum anderen in einem MOG₃₅₋₅₅-Reaktivierungsassay periphere CD4⁺ T-Zellen ein vermindertes enzephalitogenes Potential besaßen (Abschnitt 5.1.1.2.2), sollte genauer untersucht werden, ob sich CD4⁺ T-Zellen im ZNS in ihrem pathogenen Zytokinprofil von wildtypischen CD4⁺ T-Zellen unterscheiden. Hierzu wurden am Höhepunkt der EAE Infiltrate aus dem ZNS von *wild type* und *Nfatc1^{fl/fl} x Cd4cre⁺* Mäusen gewonnen und diese mit TPA/Iono 5 h restimuliert. Anschließend wurde für FACS-Analysen eine Oberflächenfärbung von CD4 durchgeführt. Zusätzlich wurde intrazellulär auf verschiedene Zytokine gefärbt.

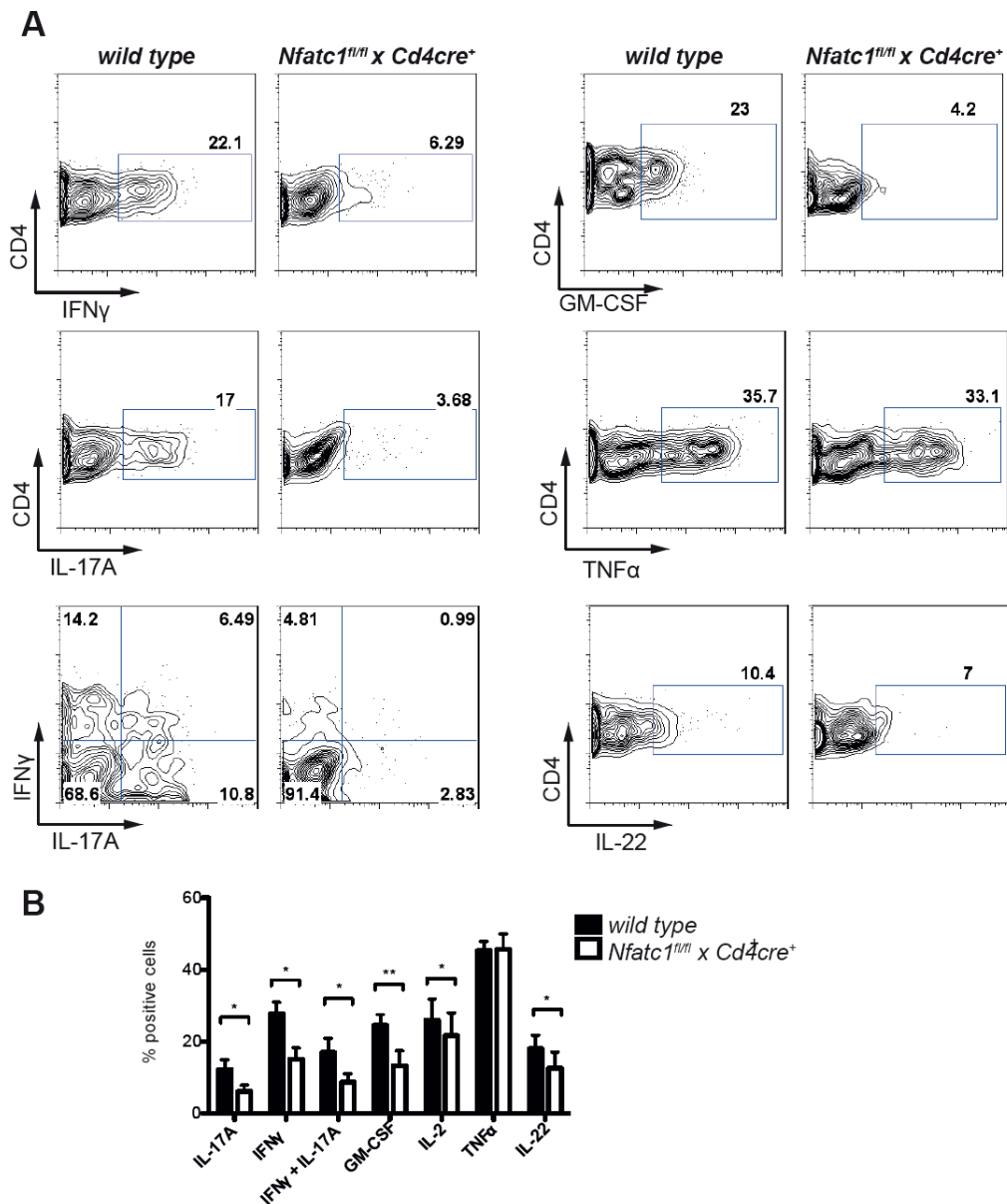


Abbildung 5.1.5: NFATc1-defiziente CD4⁺ T-Zellen im ZNS produzieren während der EAE signifikant weniger pathogene Zytokine.

(A) Repräsentative FACS-plots für verschiedene pathogene Zytokine. Aus dem ZNS von EAE-Mäusen wurden die Infiltrate gewonnen und 5 h mit TPA/Iono restimuliert. Zu den letzten 3 h der Restimulation wurden Brefeldin A und Monensin zugegeben. Die Oberflächenfärbung von CD4 und die intrazelluläre Färbung von Zytokinen wurde durchflusszytometrisch bestimmt. (B) Statistische Auswertung aller FACS-Färbungen von CD4⁺ T-Zellen aus dem ZNS von *wild type* und *Nfatc1^{fl/fl} x Cd4cre⁺* Mäusen. Student *t*-Test (n=6) *p<0.05.

Mittels FACS wurden die prozentuale Menge der verschiedenen Zytokine von CD4⁺ T-Zellen aus den beiden Mausgruppen bestimmt (siehe Abbildung 5.1.5 A-B). In Infiltraten aus *Nfatc1^{fl/fl} x Cd4cre⁺* EAE-Mäusen waren weniger IL-17A- und IFN γ -Produzenten nachzuweisen. Auch die besonders pathogene Population an IL-17A⁺IFN γ ⁺-Doppelproduzenten war reduziert. Ebenso wurden GM-CSF und IL-22 von NFATc1-defizienten CD4⁺ T-Zellen weniger produziert als von Zellen wildtypischer

Geschwistertiere. Einzig TNF α war unverändert (Abbildung 5.1.5 A). Die statistische Auswertung aller intrazellulären Zytokinfärbungen von EAE-Mäusen zeigte – bis auf die Population an TNF α -Produzenten – eine stark signifikante Reduktion an den oben genannten Einzel- und Doppelproduzenten. (siehe Abbildung 5.1.5 B).

Die Defizienz von NFATc1 in transmigrierten CD4⁺ T-Zellen äußerte sich somit in einem stark verminderten pathogenen Potential, was anhand der signifikant reduzierten Sezernierung von EAE-relevanten Zytokinen im ZNS-Gewebe nachzuweisen war. So spiegelt sich der *in vitro* beschriebene Defekt in Differenzierung und Zytokinproduktion von NFATc1-defizienten CD4⁺ T-Zellen auch in dem *in vivo* Modell der EAE wider.

5.1.1.2.4 Das Fehlen von NFATc1 in CD4⁺ T-Zellen hat keinen Einfluss auf die Durchlässigkeit der Blut-Hirn-Schranke

Im Modell der aktiven EAE werden naive CD4⁺ T-Zellen in der Peripherie durch die Immunisierung mit CFA/MOG₃₅₋₅₅ aktiviert. Die dadurch aktivierten MOG₃₅₋₅₅ spezifischen CD4⁺ T-Zellen müssen dann die BHS überwinden, um im ZNS-Zielgewebe ihre pathogene Wirkung nach Reaktivierung entfalten zu können. Im EAE-Modell wird die Disruption der der BHS experimentell durch die Gabe von Pertussis-Toxin hervorgerufen.

Um zu klären, ob die Tatsache, dass weniger CD4⁺ T-Zellen im ZNS von *Nfatc1^{fl/fl} x Cd4cre⁺* EAE-Mäusen zu finden sind, auch an einer veränderten Durchlässigkeit der BHS liegt, wurden Rückenmarksschnitte von wildtypischen und *Nfatc1^{fl/fl} x Cd4cre⁺* Mäusen hergestellt und mittels Immunfluoreszenzfärbungen von Albumin und dem Endothelmarker PECAM auf mögliche Unterschiede in der BHS-Zerstörung untersucht. In Abbildung 5.1.6 sind Mikroskopaufnahmen dieser Färbungen exemplarisch für *wild type* und *Nfatc1^{fl/fl} x Cd4cre⁺* Mäuse gezeigt. Mittels PECAM (CD31) färbt man spezifisch die Endothelzellen in den Blutgefäßen an. Diese Aufnahmen zeigen die Blutgefäße, die das Rückenmark durchziehen, und somit kann die BHS im Rückenmarksschnitten visualisiert werden. Ist die BHS aufgrund der EAE zerstört, so kann man das anhand der Extravasation des Serumproteins Albumin aus den beschädigten Endothelzellen messen. Diese stellt sich dann als diffuse Färbung (Herdbildung) um die Blutgefäße herum dar⁹³.

In den beiden Schnitten von wildtypischem und *Nfatc1^{fl/fl} x Cd4cre⁺* Rückenmark ließ sich kein Unterschied in der Stärke der BHS-Disruption feststellen. Bei beiden Mäusen konnte man eine Extravasation von Albumin (rot) um die Blutgefäße (grün), also eine Zerstörung der

BHS, erkennen (siehe Abbildung 5.1.6). Diese Disruption erwies sich somit als gleich stark in wildtypischen und *Nfatc1^{fl/fl} x Cd4cre⁺* EAE-Mäusen.

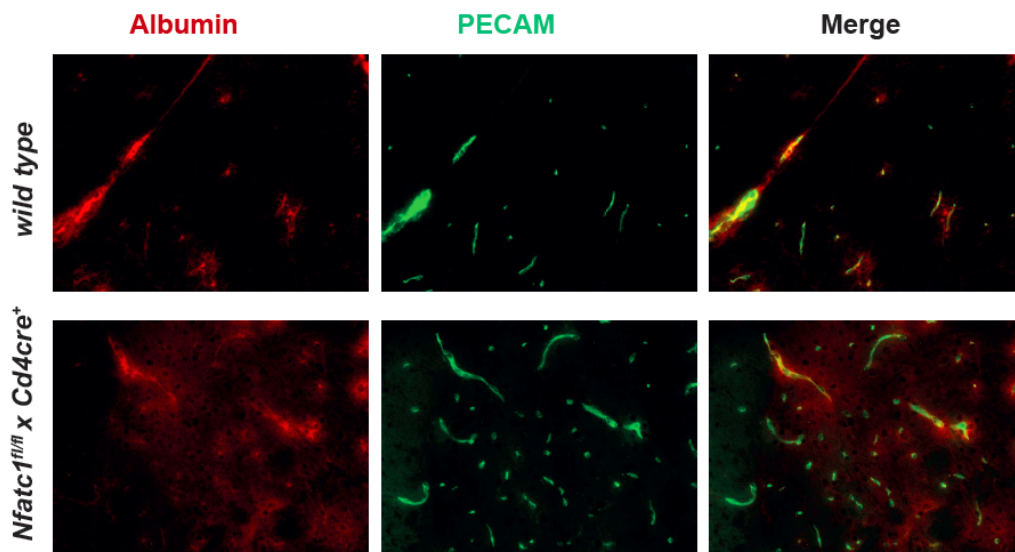


Abbildung 5.1.6: Die Blut-Hirn-Schranken-Durchlässigkeit ist nicht unterschiedlich verändert.

Färbung der Extravasation des Serumproteins Albumin als Marker für die Disruption der Blut-Hirn-Schranke. Rückenmarkschnitte von *Nfatc1^{fl/fl} x Cd4cre⁺* und *wild type* EAE-Mäusen wurden mit anti-PECAM (grün) zur Färbung der Endothelzellen der Blutgefäße und anti-Albumin (rot) gefärbt. Dargestellt sind die Immunfluoreszenzaufnahmen der Einzelfärbungen sowie der Überlagerungen (Merge).

Zusammenfassend konnte somit kein Unterschied in der Stärke der Disruption der BHS in NFATc1 *knock-out* Mäusen und wildtypische Geschwistertieren nachgewiesen werden. Diese war gleichermaßen in ihrer Integrität angegriffen.

5.1.2 Analyse der *Nfatc2*^{-/-} Mäuse

NFATc2 ist neben NFATc1 das Familienmitglied, welches in peripheren CD4⁺ T-Zellen vorrangig exprimiert wird²⁰³. Hierbei wird es wie die lange Isoform von NFATc1 konstitutiv exprimiert^{171, 189}. Der totale *knock-out* von NFATc2 in Mäusen führt zu einer verstärkten Proliferation von peripheren B- und T-Zellen, die mit einer Splenomegalie, einer chronischen Vergrößerung der Milz, einhergeht¹⁹⁷. Im Speziellen zeigen NFATc2-defiziente CD4⁺ T-Zellen eine Tendenz zu einer verstärkten Th2-Immunantwort bei erhöhter Produktion von Th2-assoziierten Zytokinen, wie IL-4 und IL-10, mit einer gleichzeitig stark verminderten Synthese von IFN γ ²⁰⁹.

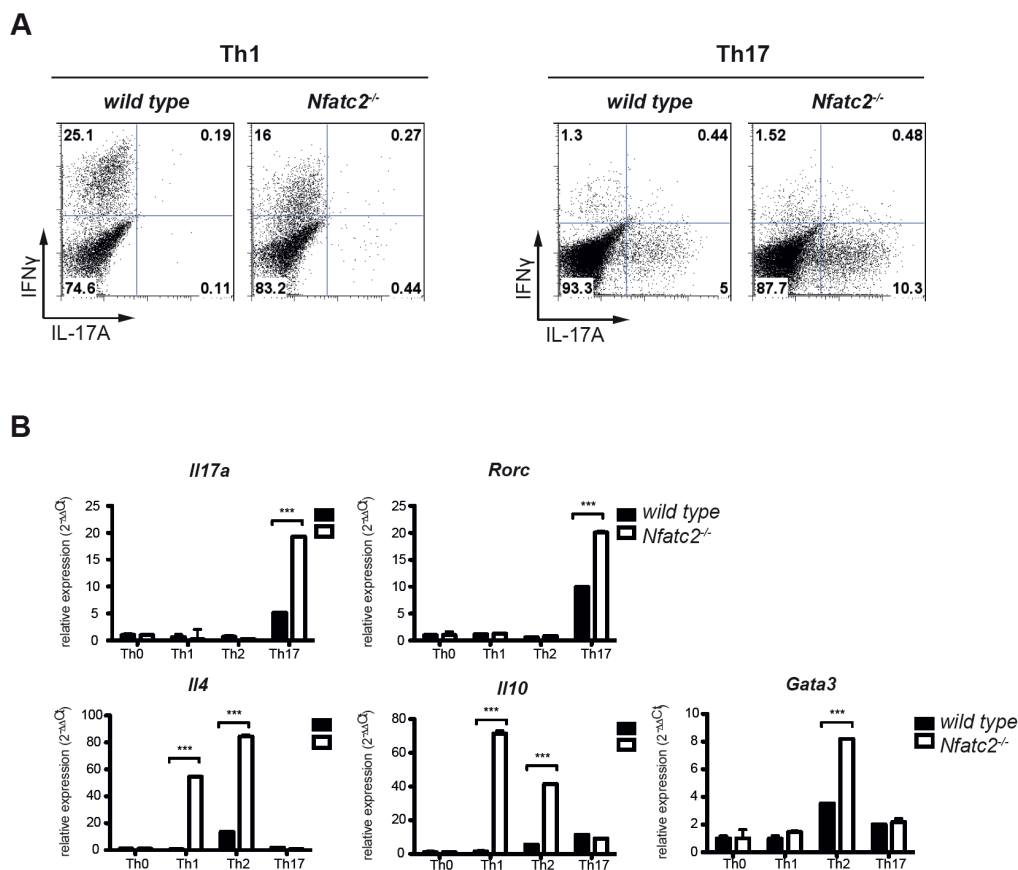


Abbildung 5.1.7 (A-B): Verstärkte Th17- und Th2-Differenzierung von NFATc2-defizienten CD4⁺ T-Zellen im Vergleich zu wildtypischen CD4⁺ T-Zellen.

(A) Naive CD4⁺ T-Zellen aus *Nfatc2*^{-/-} und *wild type* Mäusen wurden drei Tage *in vitro* zu Th1- und Th17-Zellen differenziert und anschließend nach 5 h TPA/Iono Restimulation bei Zugabe von Brefeldin A und Monensin zu den letzten 3 h der Stimulation intrazellulär auf IFN γ und IL-17A gefärbt und im FACS analysiert. (B) qRT-PCR Analysen von *in vitro* differenzierten CD4⁺ T-Zellen aus *Nfatc2*^{-/-} und *wild type* Mäusen. Dargestellt ist jeweils die relative Expression von *Il17a*, *Il4*, *Il10* und *Rorc* sowie von *Gata3* für Th0-, Th1-, Th2- und Th17-Zellen.

Diese Befunde konnte in *in vitro* Differenzierungsversuchen mit *Nfatc2*^{-/-} CD4⁺ T-Zellen bestätigt werden (Abbildung 5.1.7 A-B). Interessanterweise zeigten sich neben weniger IFN γ -Produzenten unter Th1-Bedingungen mehr IL-17A-Produzenten unter Th17-Bedingungen (Abbildung 5.1.7 A). Auch Genexpressionsanalysen von *Nfatc2*^{-/-} Th17- und Th2-Zellen wiesen eine erhöhte Expression von *Il4*, *Il10* und *Il17a* im Vergleich zu wildtypischen Zellen auf (Abbildung 5.1.7 B). Zusätzlich waren auch die mRNAs der beiden „Master“-Transkriptionsfaktoren, *Rorc* für Th17-Zellen und *Gata3* für Th2-Zellen, in ihrer Genexpression erhöht.

5.1.2.1 Der Verlust von NFATc2 resultiert in einer abgeschwächten EAE

5.1.2.1.1 Reduzierter klinischer score in *Nfatc2*^{-/-} Mäusen

Im EAE-Modell werden Th2-Lymphokine mit einem protektiven Einfluss assoziiert^{237, 238, 239, 240}. Daher sollte untersucht werden, ob dieser protektive Einfluss der Th2-Antwort auch in der EAE mit *Nfatc2*^{-/-} Mäusen nachzuweisen ist. Hierzu wurde in wildtypischen und *Nfatc2*^{-/-} Mäusen eine aktive EAE mit CFA/MOG₃₅₋₅₅ induziert. Wie in Abbildung 5.1.8 A zu sehen ist, war der klinische Verlauf über die gesamte Zeit des EAE-Experiments signifikant abgeschwächt. *Nfatc2*^{-/-} Mäuse zeigten im Durchschnitt einen klinischen EAE-score von 1 während bei wildtypischen Geschwistertieren dieser in der Spitze bei 3.5 lag. (siehe Abbildung 5.1.8 A). In einigen Fällen wurde sogar eine Verzögerung des Beginns der EAE beobachtet (Daten nicht gezeigt). In der histologischen Untersuchung der Infiltratgrößen und -mengen mit H&E-Färbungen von Rückenmarksschnitten zeigte sich, dass in *Nfatc2*^{-/-} Mäusen im Gegensatz zu wildtypischen Tieren kaum Infiltrate zu finden waren (Abbildung 5.1.8 B).

Es konnte für den klinischen Verlauf der EAE gezeigt werden, dass das Fehlen von NFATc2 sich positiv auf den EAE-score auswirkte und *Nfatc2*^{-/-} Mäuse nicht nur erniedrigte Krankheitsanzeichen aufwiesen, sondern bei ihnen teilweise die Ausbildung der EAE verzögert war. Zusätzlich konnte histologisch die geringere Manifestation der EAE anhand von deutlich reduzierten Mengen an entzündlichen Infiltraten im ZNS von *Nfatc2*^{-/-} Mäusen im Vergleich zu wildtypischen Geschwistertieren belegt werden (siehe Abbildung 5.1.8 A und B).

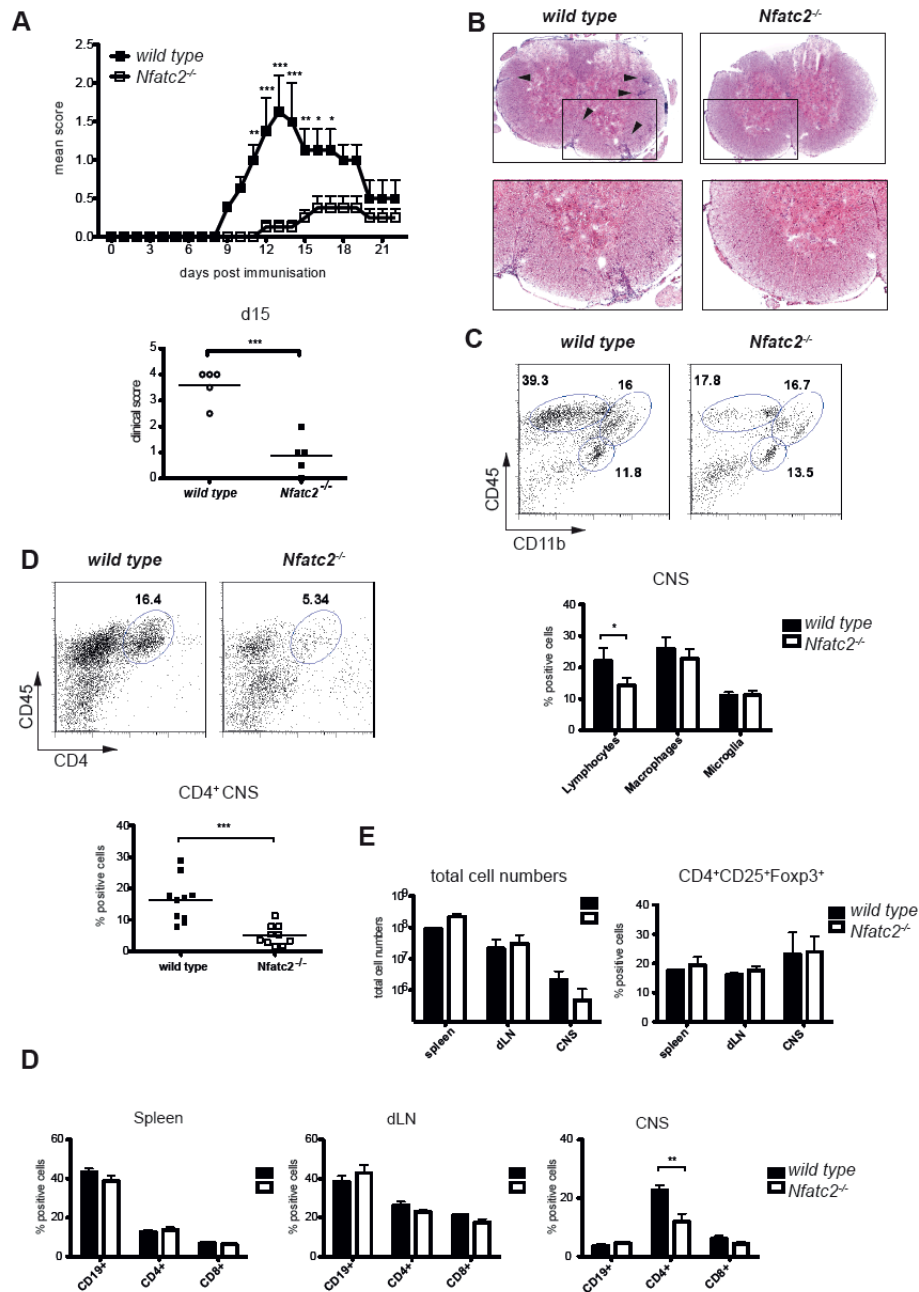


Abbildung 5.1.8 A-B: *Nfatc2^{-/-}* Mäuse zeigen eine abgeschwächte EAE.

(A) *Nfatc2^{-/-}* und *wild type* Mäuse wurden mit CFA/MOG₃₅₋₅₅ aktiv immunisiert. Beide Graphen zeigen den mittleren klinischen Score (*mean score*) aller Mäuse pro Gruppe pro Tag. Der statistische Unterschied wurde mittels einer two-way ANOVA ermittelt (* $p < 0.05$). (B) H&E-Färbung von Rückenmarksschnitten (Kryoschnitte) von *wild type* und *Nfatc2^{-/-}* von d15 der EAE. Infiltrate sind mit schwarzen Pfeilen markiert. In der unteren Reihe ist der markierte Bildausschnitt vergrößert dargestellt. (C) FACS-Färbung der zellulären Zusammensetzung aus isolierten Infiltraten des ZNS. Dargestellt ist ein repräsentativer FACS-plot der CD45 gegen CD11b Färbung, sowie darunter die statistische Auswertung aller FACS-Färbungen. Die *gates* sind folgendermaßen definiert: Lymphozyten (*Lymphocytes*) sind $CD45^{+} CD11b^{-}$, Makrophagen (*Macrophages*) $CD45^{+} CD11b^{+}$, Mikroglia (*Microglia*) $CD45^{low} CD11b^{low}$. (D) FACS-Analyse der $CD4^{+}$ T-Zellpopulation im ZNS (CNS). Gezeigt ist ein repräsentativer FACS-plot sowie die statistische Auswertung mehrerer Färbungen von ZNS-Infiltraten aus *Nfatc2^{-/-}* und *wild type* EAE-Mäusen. (E-F) Messung von absoluten Zellzahlen von Milz (*Spleen*), drainierenden Lymphknoten (*dLN*) und ZNS (CNS) von *Nfatc2^{-/-}* und *wild type* EAE-Mäusen sowie der durchflusszytometrischen Bestimmung von $CD19^{+}$ B-Zellen und $CD4^{+}$ und $CD8^{+}$ T-Zellen im ZNS.

FACS-Analysen von aus dem ZNS isolierten Immunzellinfiltraten zeigten in der statistischen Auswertung aller FACS-Färbungen keinen signifikanten Unterschied in der Population der Makrophagen ($CD45^+CD11b^+$) und Mikrogliazellen ($CD45^{low}CD11b^{low}$), während die Lymphozytenpopulation ($CD45^+CD11b^-$) signifikant reduziert war (Abbildung 5.1.8 C). Analysierte man die Population der $CD4^+$ T-Zellen der ZNS-Infiltrate genauer, war vor allem diese Zellpopulation signifikant reduziert. Es fanden sich 50% weniger $CD4^+$ T-Zellen in den entzündlichen ZNS-Geweben von *Nfatc2*^{-/-} Mäusen im Vergleich zu *wild type* Tieren (Abbildung 5.1.8 D). Die Reduktion der Lymphozyten war nur auf $CD4^+$ T-Zellen beschränkt, da die Verteilung von $CD19^+$ B-Zellen und $CD8^+$ T-Zellen im ZNS nicht signifikant verändert war. Die absoluten Zellzahlen von Milz (*spleen*) und drainierenden inguinalen Lymphknoten (*dLN*) waren ebenfalls im Vergleich zum ZNS (*CNS*) zwischen den beiden Mausgruppen unverändert (Abbildung 5.1.8 E und F). Die Population *Foxp3*⁺ regulatorischer T-Zellen war ebenfalls nicht verändert. Somit ging der reduzierte klinische *score*, der in *Nfatc2*^{-/-} Mäusen beobachtet wurde, mit einer starken Reduktion an transmigrierenden, aktivierten $CD4^+$ T-Zellen einher, während der Verlust von NFATc2 keinen Einfluss auf die Menge infiltrierender B-Zellen und $CD8^+$ T-Zellen ins ZNS hatte.

5.1.2.1.2 Das Fehlen von NFATc2 wirkt sich auf Effektorfunktionen von $CD4^+$ T-Zellen während der Immunreaktion einer EAE aus

In einem MOG₃₅₋₅₅-Reaktivierungsassay, wie in Abbildung 5.1.9 dargestellt, zeigten *Nfatc2*^{-/-} *knock-out* $CD4^+$ T-Zellen ein verändertes Zytokinprofil nach Stimulation mit unterschiedlichen Konzentrationen an MOG₃₅₋₅₅ gegenüber wildtypischen $CD4^+$ T-Zellen. ELISAs für IL-4, IL-10, IFN γ und IL-17A mit Überständen der MOG-Reaktivierungskulturen ergaben, dass $CD4^+$ T-Zellen von *Nfatc2*^{-/-} Mäusen weniger IFN γ , dafür aber nicht nur vermehrt IL-4 und IL-10, sondern auch IL-17A sekretierten. Die stimulationsabhängige Proliferation dagegen zeigte keinen Unterschied zwischen den beiden Mausgruppen, denn $CD4^+$ T-Zellen von *Nfatc2*^{-/-} und wildtypischen Geschwistertieren proliferierten gleichermaßen als Antwort auf unterschiedliche Konzentrationen des MOG₃₅₋₅₅-Peptids.

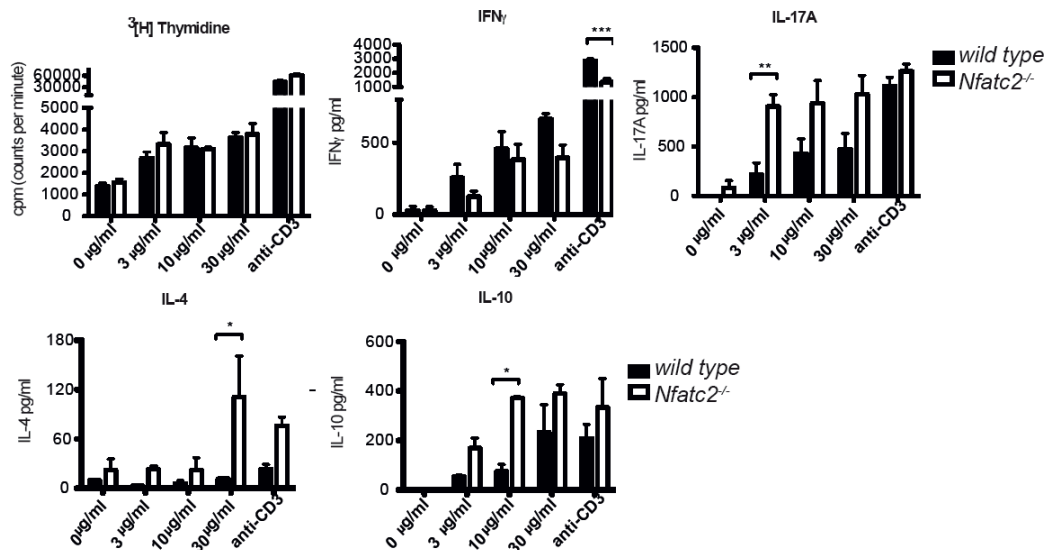


Abbildung 5.1.9: MOG₃₅₋₅₅-spezifische CD4⁺ T-Zellen von *Nfatc2*^{-/-} Mäusen zeigen eine erhöhte Sekretion von Th2- und Th17-Zytokinen.

Überstände einer MOG₃₅₋₅₅-Reaktivierungskultur von totalen Milzzellen wurden nach drei Tagen Inkubation mittels ELISA für IL-17A, IFN γ , IL-4 und IL-10 auf die Sekretion dieser Zytokine von MOG₃₅₋₅₅ spezifischen CD4⁺ T-Zellen analysiert. Ebenso wurde durch einen ³[H]-Thymidin Einbau die spezifische Proliferation nach Restimulation mit unterschiedlichen Konzentrationen von MOG₃₅₋₅₅ gemessen.

Der Befund der erhöhten IL-4-, IL-10- und IL-17A-Produktion konnte zusätzlich zur Proteinsekretion auf mRNA Ebene bestätigt werden. In Abbildung 5.1.10 ist jeweils die relative Expression von *Il17a*, *Il17f* und des „Master“-Transkriptionsfaktors der Th17-Linie *Rorc*, von unstimulierten CD4⁺ T-Zellen und nach MOG₃₅₋₅₅-Stimulation gezeigt. Nicht nur die relative Expression von *Il17a* war in den NFATc2-defizienten CD4⁺ T-Zellen erhöht, sondern auch die Expression von *Il17f* und des Transkriptionsfaktors *Rorc*. Auch die relative Expression von *Il4* und *Il10* war nach MOG₃₅₋₅₅-Restimulation höher als in wildtypischen CD4⁺ T-Zellen. Die Expression von *Ifng* hingegen war, passend zu den ELISA Daten, auch auf mRNA Ebene reduziert.

Somit konnte anhand dieser *ex vivo* Daten gezeigt werden, dass MOG₃₅₋₅₅-spezifische CD4⁺ T-Zellen von *Nfatc2*^{-/-} Mäusen ein verändertes Zytokinprofil im Vergleich zu ihren wildtypischen Geschwistertieren aufwiesen. Der für *Nfatc2*^{-/-} Mäuse beschriebene Phänotyp einer verstärkten Th2-Antwort zeigte sich damit auch im EAE-Modell. Interessanterweise war zusätzlich dazu die IL-17A-Produktion erhöht.

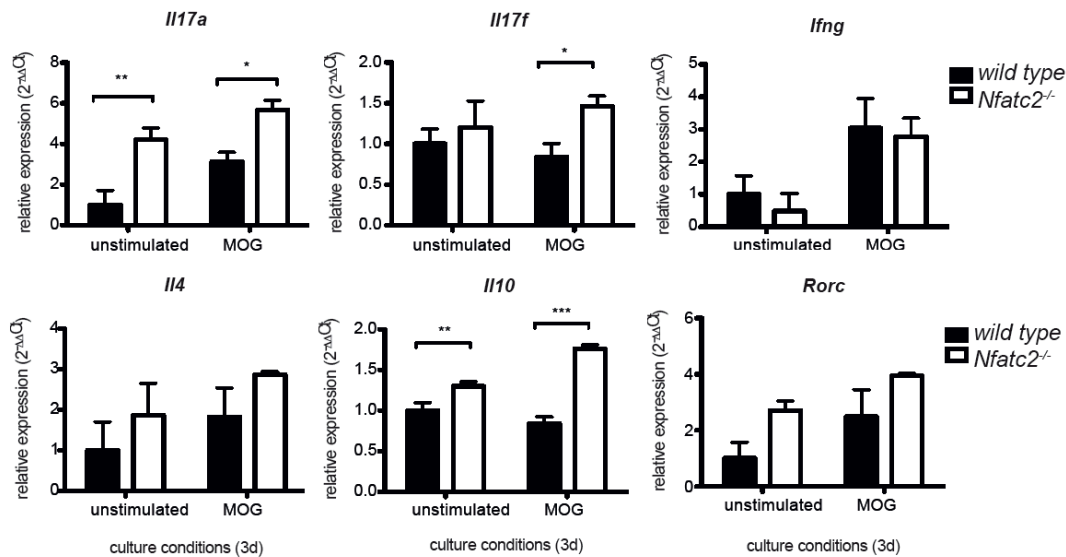


Abbildung 5.1.10: NFATc2-defiziente CD4⁺ T-Zellen zeigen eine veränderte Expression von Th17-, Th2- und Th1-assoziierten Zytokinen sowie RORγt.

Gesamtmilzzellen aus *Nfatc2*^{-/-} und *wild type* EAE-Mäusen wurden drei Tage mit MOG₃₅₋₅₅ oder nur in Medium (*unstimulated*) kultiviert. An d 3 wurden jeweils CD4⁺ T-Zellen aufgereinigt und davon RNA isoliert. Diese wurde für eine qRT-PCR Analyse von *Il17a*, *Il17f*, *Ifng*, *Il4*, *Il10*, *Rorc* und *Tbx21* verwendet.

5.1.2.1.3 *Nfatc2*^{-/-} CD4⁺ T-Zellen zeigen ein verändertes pathogenes Zytokinprofil während der EAE

Um zu klären, ob sich die im MOG₃₅₋₅₅-Reaktivierungsassay beobachtete veränderte Produktion von IL-17A, IFN γ , IL-4 und IL-10 auch in CD4⁺ T-Zellen, die ins ZNS eingewandert sind, zeigt, wurden CD4⁺ T-Zellen nach Isolation aus dem ZNS im FACS auf die Zytokinproduktion hin analysiert. Hierzu wurden die aus ZNS-Gewebe gewonnenen Infiltrate mit TPA/Iono 5 h restimuliert, wobei zu den letzten drei Stunden Brefeldin A und Monensin zugegeben wurde. Es wurde anschließend auf verschiedene Zytokine intrazellulär gefärbt, und die CD4⁺ T-Zellen wurden im FACS dementsprechend analysiert

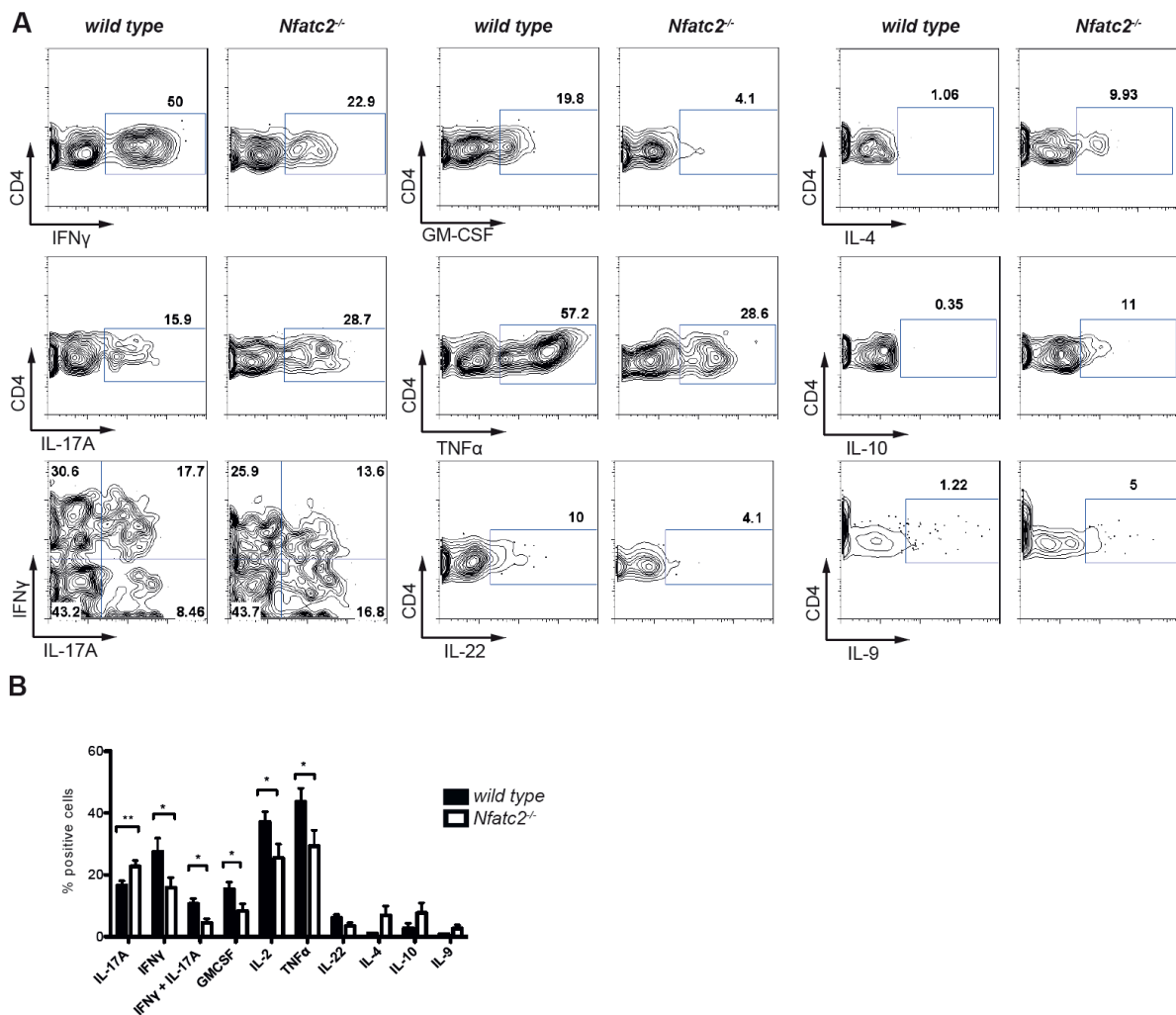


Abbildung 5.1.11: CD4⁺ T-Zellen aus dem ZNS von *Nfatc2*^{-/-} EAE-Mäusen zeigen ein anderes Zytokinprofil im Vergleich zu wildtypische (*wild type*) CD4⁺ T-Zellen.

Nach Isolation der Infiltrate aus dem entzündeten ZNS von EAE-Mäusen und 5 h Restimulation mit TPA/Iono wurde eine Oberflächenfärbung mit anti-CD4 durchgeführt, gefolgt von einer intrazellulären Färbung verschiedener Zytokine. Dargestellt sind jeweils ein repräsentativer FACS-plot und die statistische Zusammenfassung aller FACS-Färbungen der Zytokine in einem Balkendiagramm (student *t*-Test **p*<0.05).

Abbildung 5.1.11 zeigt eine erhöhte Produktion von IL-17A, IL-4 und IL-10 von *ex vivo* *Nfatc2*^{-/-} CD4⁺ T-Zellen aus dem ZNS. Das Th2-assoziierte Zytokin IL-4 und das immunsuppressive IL-10 wurden deutlich stärker von CD4⁺ T-Zellen im ZNS von *Nfatc2*^{-/-} Mäusen als von Zellen wildtypischer Geschwistertiere produziert. Die erhöhte Menge an IL-17A-Produzenten von *Nfatc2*^{-/-} Mäusen wurden ebenfalls im ZNS bestätigt. Dagegen waren viele für das EAE-Modell als pathogen geltenden Zytokine, wie IFN γ , GM-CSF und TNF α ^{235, 241} signifikant reduziert. Obwohl die IL-17A-Expression in Abwesenheit von NFATc2 gesteigert wurde, war die Anzahl der pathogenen IL-17A⁺-IFN γ ⁺-Doppelproduzenten verringert (siehe Abbildung 5.1.11).

Zusammenfassend konnte somit gezeigt werden, dass sich während der EAE $CD4^+$ T-Zellen, denen NFATc2 fehlt anhand ihres Zytokinprofils deutlich von $CD4^+$ T-Zellen aus wildtypischen Geschwistertieren unterschieden. Neben der signifikanten Reduktion an pathogenen Zytokinen, wie GM-CSF und TNF α , sowie der Anzahl an Doppelproduzenten von IL-17A und IFN γ waren die, im EAE-Modell protektiven anti-inflammatorischen Th2-Zytokine IL-4 und IL-10 „heraufreguliert“. Dieses veränderte Zytokinprofil korrelierte mit dem verringerten Krankheitsverlauf der EAE in *Nfatc2*^{-/-} Mäusen.

5.1.2.1.4 Die Durchlässigkeit der Blut-Hirn-Schranke bleibt durch das Fehlen von NFATc2 unbeeinflusst

Da auch *Nfatc2*^{-/-} Mäuse eine verminderte Infiltration von $CD4^+$ T-Zellen im aktiven EAE-Modell aufwiesen, sollte untersucht werden, ob es Unterschiede in der Durchlässigkeit der BHS aufgrund der Defizienz von NFATc2 gibt. Insbesondere, weil es sich bei *Nfatc2*^{-/-} Mäuse um einen totalen *knock-out* von NFATc2 handelt und somit NFATc2 auch in Endothelzellen der BHS fehlt. Um diese Frage zu klären, wurden Rückenmarksschnitte von wildtypischen und *Nfatc2*^{-/-} EAE-Mäusen angefertigt und für eine Immunfluoreszenzanalyse mit Antikörpern für PECAM und Albumin inkubiert.

Wie in Abbildung 5.1.13 zu sehen ist konnte kein Unterschied in der Stärke der Extravasation des Serumsproteins Albumin aus den disruptierten Endothelzellen der BHS zwischen den Rückenmarkspräparaten von wildtypischen und *Nfatc2*^{-/-} nachgewiesen werden. In beiden Fällen konnte man deutlich die diffuse Herdbildung des ausgetretenen Albumins um die mit PECAM angefärbten Blutgefäße erkennen (Abbildung 5.1.12).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass keine Unterschiede in der Stärke der Disruption der BHS zwischen NFATc2 *knock-out* Mäusen und wildtypische Geschwistertieren nachgewiesen werden. Die BHS war gleichermaßen in beiden Mauslinien in ihrer Integrität angegriffen.

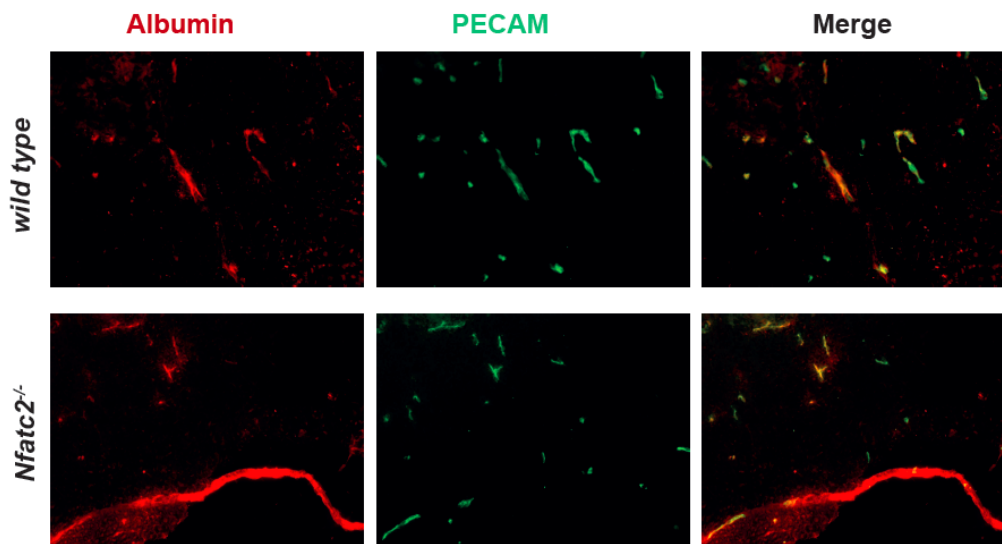


Abbildung 5.1.12: Die Blut-Hirn-Schrankenfunktion ist in *Nfatc2*^{-/-} und *wild type* Mäusen gleichermaßen gestört.

Färbung der Extravasation des Serumproteins Albumin als Marker für die Disruption der Blut-Hirn-Schranke. Rückenmarksschnitte von *Nfatc2*^{-/-} und *wild type* EAE-Mäusen wurden mit anti-PECAM (grün) zur Färbung der Endothelzellen der Blutgefäße und mit anti-Albumin (rot) gefärbt. Gezeigt sind jeweils Einzelaufnahmen der Immunfluoreszenzen sowie deren Überlagerung (*Merge*).

5.1.2.1.5 Der positive Einfluss des Fehlens von NFATc2 auf den EAE-Krankheitsverlauf ist CD4⁺ T-Zell-spezifisch

Da es sich bei der *Nfatc2*^{-/-} Maus um einen totalen *knock-out* von NFATc2 handelt, also jede Körperzelle defizient für NFATc2 ist, sollte analysiert werden, inwieweit die Auswirkungen auf den Krankheitsverlauf der EAE spezifisch auf den Verlust von NFATc2 in CD4⁺ T-Zellen zurückzuführen ist. Neben den CD4⁺ T-Zellen spielen viele andere Immunzellen, wie CD8⁺ T-Zellen, B-Zellen und Makrophagen eine Rolle bei der EAE-Pathogenese^{145, 234, 242}. Um solche *bystander*-Effekte auszuschließen und die Rolle der NFATc2-defizienten CD4⁺ T-Zellen genauer zu analysieren, wurden Knochenmarkschimären (*bone marrow chimeras*, BMCs) hergestellt. In Abbildung 5.1.13 A ist dargestellt, wie die BMCs für die Klärung der Fragestellung der Rolle der NFATc2-defizienten CD4⁺ T-Zellen generiert wurden. Es wurden als Spendertiere für das Knochenmark sowohl *Cd4*^{-/-} – diese Mäuse besitzen keine reifen CD4⁺ T-Zellen²⁴³ – als auch *Nfatc2*^{-/-} oder *wild type* Mäuse verwendet. Hierzu wurden 80% Knochenmarkszellen der *Cd4*^{-/-} Mäuse mit entweder 20% *Nfatc2*^{-/-} oder 20% wildtypischen Knochenmarkszellen gemischt und in sublethal bestrahlte wildtypische Empfängertiere injiziert. Dadurch sollten alle CD4⁺ T-Zellen in den Empfängertieren aus dem *Nfatc2*^{-/-} oder

wild type Knochenmark nachgebildet werden, während alle anderen Immunzellen aus den hämatopoetischen Zellen der *Cd4^{-/-}* Tieren entstehen. Durch Verwendung der kongenen Marker CD90.1 und CD90.2 war in den BMCs eine Unterscheidung von CD90.1⁺ CD4⁺ T-Zellen der *Nfatc2^{-/-}* oder *wild type* Spendertiere und von CD90.2⁺ CD4⁺ T-Zellen der Empfängertiere möglich. Die BMCs wurden nach 10 Wochen Rekonstitution der peripheren Anzahl an Immunzellen mit MOG₃₅₋₅₅/CFA immunisiert.

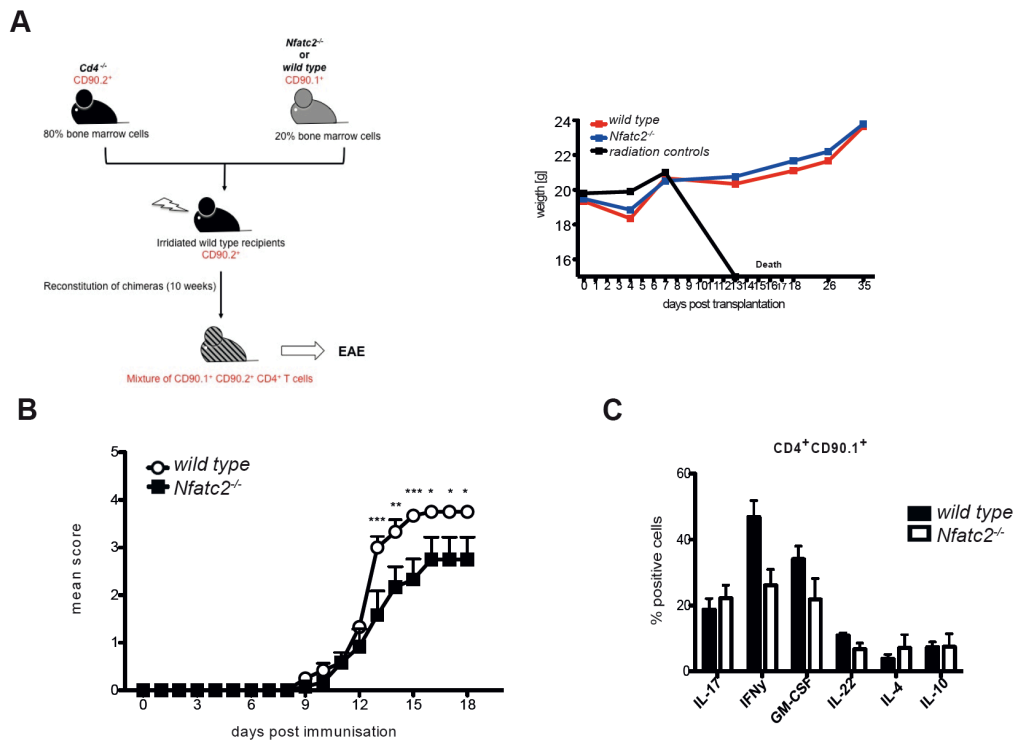


Abbildung 5.1.13 (A-C): EAE in *Nfatc2^{-/-}* BMCs (bone marrow chimeras) ist im Vergleich zu wildtypischen BMCs abgemildert.

(A) Schema der Herstellung der Knochenmarkschimären. Es wurden 80% Knochenmarkszellen von *Cd4^{-/-}* Mäusen mit 20% Knochenmark von wildtypischen (*wild type*) oder *Nfatc2^{-/-}* Mäusen gemischt. Die bestrahlten (9 Gray) wildtypische Empfängertiere erhielten von diesem Knochenmarksmix $6,0 \times 10^6$ Zellen *i.v.*. Der Verlauf der Rekonstitution der Empfängertiere wurde sowohl anhand des Gewichts (siehe Graph) als auch anhand von FACS-Analysen des Bluts kontrolliert. Nach 10 Wochen wurde in den BMCs eine aktive MOG₃₅₋₅₅-EAE induziert. (B) Scoring der *wild type* und *Nfatc2^{-/-}* BMCs (n= 5 pro Gruppe) bis Tag 18 der EAE. Statistische Analyse des Unterschieds im Durchschnitts-score (*mean score*) pro Tag erfolgte mit dem two-way ANOVA Test. *p<0.05 (C) Intrazelluläre FACS-Analyse der Zytokinproduktion von CD4⁺ T-Zellen des ZNS an Tag 18 der EAE. Die CD90.1⁺ *Nfatc2^{-/-}* und *wild type* CD4⁺ T-Zellen der Spendertiere wurden gegeneinander verglichen.

In Abbildung 5.1.13 B-C sind die Analysen der EAE mit den BMCs dargestellt. Der durch BMC erzeugte CD4⁺-spezifische *knock-out* von NFATc2 erwies sich in der EAE ebenfalls wie der totale Verlust als protektiv. Verglichen wurden die BMCs, die den Mix aus *Cd4^{-/-}* und *wild type* Knochenmarkszellen bekamen mit denen, die den Mix aus *Cd4^{-/-}* und *Nfatc2^{-/-}* Knochenmarkszellen erhielten. Die *Nfatc2^{-/-}* BMCs zeigten einen signifikant niedrigeren *score*

als die wildtypischen BMC Kontrolltiere (Abbildung 5.1.13 B). Die FACS-Analyse von aus dem ZNS isolierten CD4⁺ T-Zellen ergab, dass die CD90.1⁺ T-Zellen der *Nfatc2*^{-/-} BMCs dasselbe Zytokinprofil zeigten wie in der klassischen EAE mit *Nfatc2*^{-/-} Tieren (siehe Abschnitt 5.1.2.1.3). So war die Menge an Produzenten von IL-17A, IL-4 und IL-10 leicht erhöht, während die Menge an IFN γ -, GM-CSF- und IL-22-Produzenten deutlich erniedrigt war (siehe Abbildung 5.1.13 C). Somit ist der beobachtete Defekt der in der aktiven EAE für die NFATc2-defizienten CD4⁺ T-Zellen auf das intrinsische Fehlen von NFATc2 in den CD4⁺ T-Zellen zurückzuführen, da in den BMC-Mäusen nur die CD4⁺ T-Zellen defizient für NFATc2 waren, während alle anderen Immunzellen wildtypisch waren. Es können somit dominante Effekte von anderen Immunzellen in der aktiven EAE im Zusammenhang mit dem verminderten EAE-Verlauf in den konventionellen *Nfatc2*^{-/-} Mäusen ausgeschlossen werden.

5.1.2.2 Die molekulare Grundlage für die erhöhte Produktion von IL-17 in *Nfatc2*^{-/-} CD4⁺ T-Zellen

Da *Nfatc2*^{-/-} CD4⁺ T-Zellen im EAE-Modell eine erhöhte Produktion von IL-17A zeigten, sollte genauer analysiert werden, welche Mechanismen dieser erhöhten Produktion zugrunde liegen können. Hierzu gibt es in der Literatur noch keine Beschreibung.

5.1.2.2.1 NFATc2-defiziente CD4⁺ T-Zellen zeigen eine erhöhte Expression des Transkriptionsfaktors IRF4

Da bekannt ist, dass der Transkriptionsfaktor IRF4 eine essentielle Rolle bei der Differenzierung von Th17-Zellen und der Induktion der Genexpression von *Il17a* spielt²²⁰, sollte untersucht werden, ob sich NFATc2-defiziente CD4⁺ T-Zellen hinsichtlich der Expression von IRF4 von wildtypischen CD4⁺ T-Zellen unterscheiden. Um diese Frage zu klären, wurde sowohl die Menge von IRF4 auf Proteinebene als auch auf mRNA Ebene untersucht.

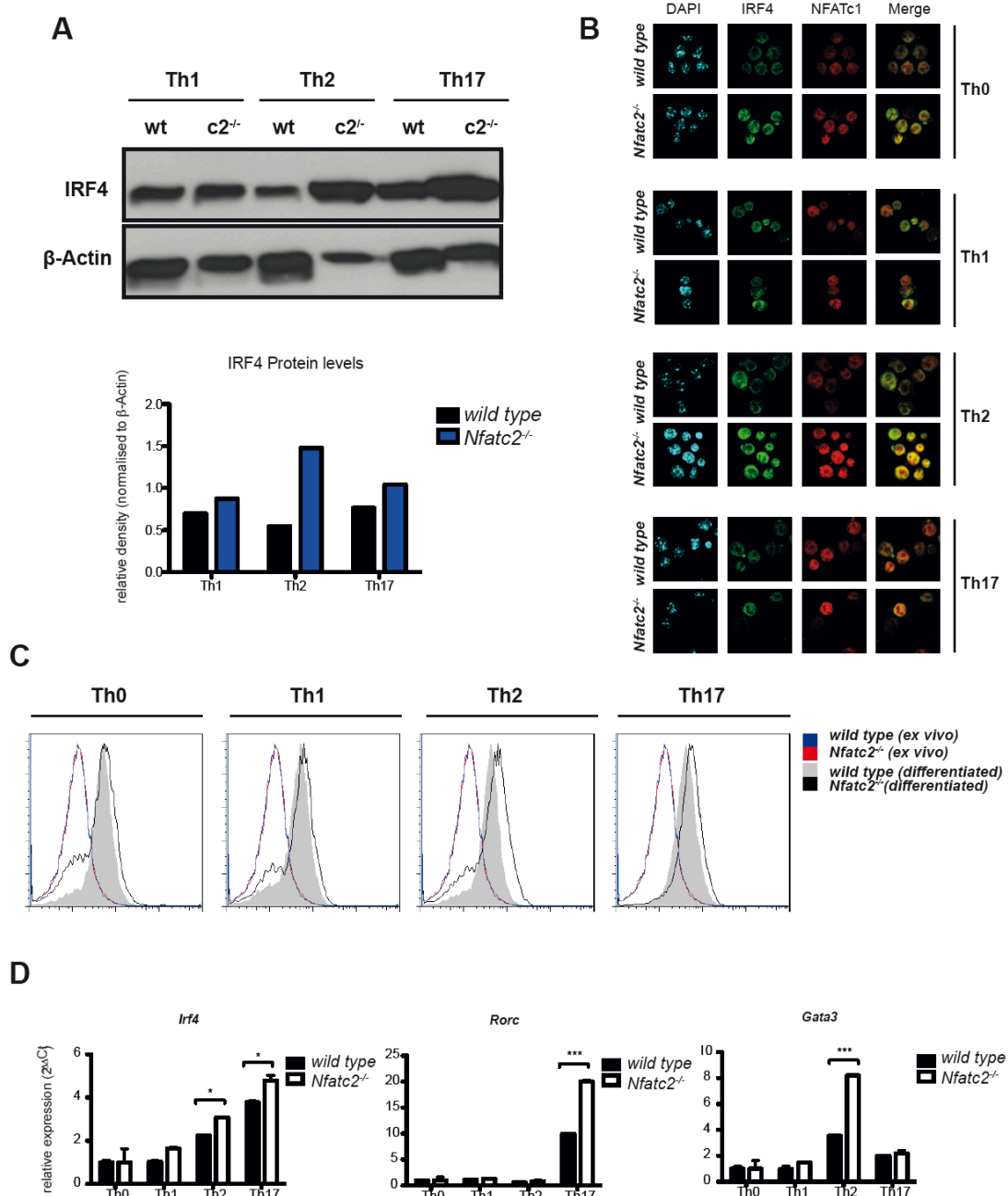


Abbildung 5.1.14: NFATc2-defiziente CD4⁺ T-Helferzellen zeigen eine erhöhte Expression an IRF4.

(A) Kernlysate von *in vitro* differenzierten naiven CD4⁺ T-Zellen aus *Nfatc2*^{-/-} und *wild type* Mäusen wurden mittels Westernblot auf die Expression von IRF4 analysiert. Gezeigt sind die spezifischen Antikörpersignalbanden für anti-IRF4 und der anti-β-Aktin-Ladekontrolle. (B) Konfokale mikroskopische Aufnahmen von *in vitro* differenzierten NFATc2-defizienten oder wildtypischen CD4⁺ T-Zellen. An Tag 3 wurden die Zellen für eine Immunfluoreszenz-Analyse mit anti-NFATc1 (rot) und anti-IRF4 (grün) Antikörpern gefärbt. Zur Visualisierung der Kerne wurde der Farbstoff DAPI verwendet. (C) FACS-Färbungen von *ex vivo* isolierten CD4⁺ T-Zellen (Negativkontrolle) und Zellen einer *in vitro* Differenzierung von *Nfatc2*^{-/-} und *wild type* Mäusen. Die Färbung für IRF4 erfolgte intrazellulär ohne vorherige Restimulation mit TPA/Iono. (D) qRT-PCR Analyse der relativen Expression von *Irf4*, *Gata3* und *Rorc* von *in vitro* differenzierten (Tag 3) NFATc2-defizienten und wildtypischen CD4⁺ T-Zellen.

Es zeigte sich, dass *in vitro* Th1-, Th2- und Th17-differenzierte CD4⁺ T-Zellen von *Nfatc2*^{-/-} Mäusen mehr IRF4-Protein enthielten. Dies konnte anhand einer Westernblot-Analyse von Kernlysaten (siehe Abbildung 5.1.14 A) gezeigt werden. Hier ließ sich eine erhöhte Intensität der IRF4-spezifischen Antikörperbande in Lysaten der *Nfatc2*^{-/-} CD4⁺ T-Zellen im Vergleich zu den wildtypischen CD4⁺ T-Zelllysaten erkennen (Abbildung 5.1.14 A). Dieser Unterschied wird in der graphischen Darstellung der relativen Bandenstärke, welche jeweils auf die β -Aktin Ladekontrolle normalisiert wurde, besonders deutlich. Die Menge an IRF4-Protein war geringfügig in Th1- und deutlich in Th2- und Th17-Zellen von *Nfatc2*^{-/-} Mäusen erhöht. Auch anhand der Immunfluoreszenzfärbung von *in vitro* differenzierten CD4⁺ T-Zellen beider Mausgruppen zeigte sich ein stärkeres Signal der spezifischen IRF4-Färbung für differenzierte CD4⁺ T-Zellen aus *Nfatc2*^{-/-} Mäusen als aus wildtypischen Geschwistertieren. Wie in Abbildung 5.1.14 B dargestellt, wurden Th0-, Th1-, Th2- und Th17-Zellen am dritten Tag der Differenzierung geerntet und nach Zytospin-Zentrifugation spezifisch mit monoklonalen anti-NFATc1 (rot) und anti-IRF4 (grün) gefärbt. Zur Kernfärbung wurde DAPI verwendet. Die Fluoreszenzintensität der IRF4-Färbung war in Th0-, Th1-, Th2- und Th17-Zellen von *Nfatc2*^{-/-} Mäusen stärker im Vergleich zu den Th-Zellen der wildtypischen Mäuse. Besonders deutlich war dieser Intensitätsunterschied für Th2- und Th17-Zellen. Interessanterweise war auch die Intensität der NFATc1-Färbung in den *Nfatc2*^{-/-} CD4⁺ T-Zellen erhöht. In der Überlagerung beider Färbungen für NFATc1 und IRF4 deutete sich zusätzlich eine stärkere Kolo-kalisation von NFATc1 und IRF4 für Th0-, Th1-, Th2- und Th17-Zellen der *Nfatc2*^{-/-} Mäuse, verglichen mit Zellen aus *wild typ* Mäusen an.

Der Unterschied in der IRF4-Proteinmenge zwischen *in vitro* differenzierten CD4⁺ T-Zellen wurde auch im FACS belegt. Hierzu wurden CD4⁺ T-Zellen beider Mausgruppen *in vitro* in verschiedenen T-Helfer-Zelltypen differenziert. Am Tag drei wurden die Zellen geerntet und für eine FACS-Analyse mit einem monoklonalen anti-IRF4 Antikörper intrazellulär gefärbt. Als biologische Negativkontrolle, da IRF4 erst nach TCR-Stimulation induziert wird²⁴⁴, wurden frisch isolierte CD4⁺ T-Zellen auf IRF4 gefärbt. Wie in Abbildung 5.1.14 C in den FACS-Histogrammen der IRF4-Färbung zu erkennen ist, fand sich kein Unterschied in der IRF4-Färbung der direkt *ex vivo* gefärbten CD4⁺ T-Zellen der *Nfatc2*^{-/-} und wildtypischen Mäuse. Nach drei Tagen Differenzierung wurde hingegen in beiden Mausgruppen IRF4 induziert. Hierbei war das Histogramm der IRF4-Färbung der differenzierten Zellen der *Nfatc2*^{-/-} Maus (schwarze Linie) leicht auf der x-Achse nach rechts verschoben, was eine erhöhte Menge an IRF4 positiven Zellen anzeigt. Besonders deutlich war dieser *shift* des MFI (*mean fluorescence intensity*) in Th2-Zellen zu erkennen. Auch auf mRNA-Ebene konnte eine

vermehrte Genexpression des *Irf4*-Gens in *Nfatc2*^{-/-} CD4⁺ T-Zellen nachgewiesen werden. Die Ergebnisse der qRT-PCR Analysen zeigten in *in vitro* zu Th1-, Th2- und Th17-differenzierten NFATc2-defizienten CD4⁺ T-Zellen eine Erhöhung der relativen Expression von *Irf4*. Diese erhöhte Expression von *Irf4* war für Th1- und Th17-Zellen signifikant (siehe Abbildung 5.1.14 D). Zusätzlich waren auch die beiden „Master“-Transkriptionsfaktoren GATA3 (unter Th2-Bedingungen) und RORγt (unter Th17-Bedingungen) in ihrer relativen Expression verstärkt. Zusammenfassend konnte für NFATc2-defiziente und *in vitro* differenzierte CD4⁺ T-Zellen gezeigt werden, dass diese sowohl mehr IRF4-Protein als auch eine gesteigerte *Irf4*-Genexpression aufwiesen.

5.1.2.2.2 Das Fehlen von NFATc2 führt zu mehr NFATc1 im Kern von differenzierten CD4⁺ T-Zellen

Für NFATc2-defiziente T-Zellen wurde schon in früheren Studien diskutiert, ob sie mehr NFATc1 im Kern enthalten und dies zu der erhöhten Induktion des *Il4*-Gens in NFATc2-defizienten CD4⁺ T-Zellen führt und somit zum überschießenden Th2-Phänotyp dieser Mäuse beiträgt²⁰³. Dies wurde aber bisher nicht eindeutig belegt. Da NFATc1 der Transkriptionsfaktor der NFAT-Familie ist, der vorrangig an den Promotor von *Il17a* bindet und somit zur Genexpression von *Il17a* beiträgt²¹⁷, sollte untersucht werden, ob man erhöhte NFATc1-Mengen im Kern von *Nfatc2*^{-/-} Mäusen nachweisen kann. Abbildung 5.1.15 A zeigt, dass *in vitro* zu Th0-, Th1-, Th2- und Th17-differenzierten CD4⁺ T-Zellen aus *Nfatc2*^{-/-} Mäusen deutlich mehr NFATc1 (rot) im Kern (DAPI) enthielten als wildtypische CD4⁺ T-Zellen. In wildtypischen CD4⁺ T-Zellen befand sich NFATc1 hauptsächlich im Zytoplasma. Diese nukleäre Anreicherung von NFATc1 konnte durch TPA/Iono-Stimulation in *Nfatc2*^{-/-} und wildtypischen Th0-, Th2- und Th17-Zellen gleichermaßen induziert werden. Somit zeigte sich, dass während der Differenzierung zu Th0, Th2- und Th17-Zellen das Fehlen von NFATc2 zu einer Anreicherung von NFATc1 im Kern führt. Die Anreicherung an NFATc1 konnte auch anhand von ChIP-Bindungsstudien belegt werden. In *in vitro* differenzierten Th17- und Th2-Zellen zeigte sich eine erhöhte Bindung von NFATc1 an den Promotor von *Il17a* unter Th17-Bedingungen und an die Promotoren von *Il4* und *Il10* unter Th2-Bedingungen in *Nfatc2*^{-/-} CD4⁺ T-Zellen, verglichen zu wildtypischen Th-Zellen (Abbildung 5.1.15 B). Diese erhöhte Bindung wurde für den Promotor des *Ifng*-Gens unter Th1 Bedingungen nicht gefunden.

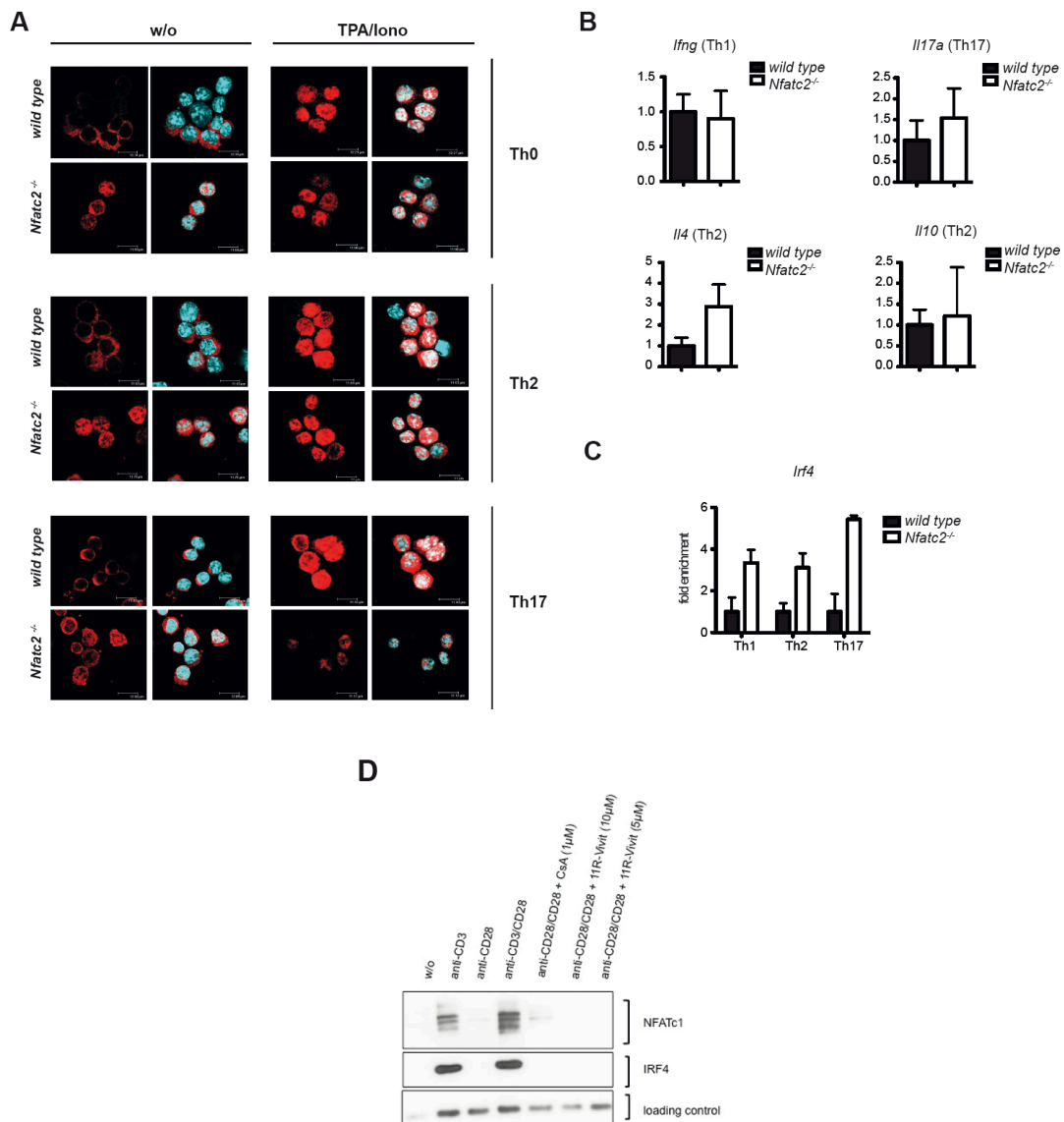


Abbildung 5.1.15: NFATc2-defiziente Th-Zellen besitzen höhere NFATc1-Konzentration im Kern als Wildtyp-Th-Zellen.

(A) Primäre CD4⁺ T-Zellen von *Nfatc2*^{-/-} und wildtypischen (*wild type*) Mäusen wurden *in vitro* drei Tage zu Th0-, Th2- und Th17-Zellen differenziert und dann für Immunfluoreszenzfärbung von NFATc1 ohne weitere Restimulation (w/o) und nach 4 h Restimulation mit TPA/Iono für Immunfluoreszenzfärbung von NFATc1 (rot) verwendet. Zur Kernfärbung wurde DAPI (blau) verwendet. (B-C) Für ChIP-Analysen der Bindung von NFATc1 an Promotoren von *Il17a*, *Ifng*, *Il4* und *Il10* wurden CD4⁺ T-Zellen von *Nfatc2*^{-/-} und wildtypischen (*wild type*) Mäusen *in vitro* zu Th1-, Th17- und Th2-Zellen differenziert und das Chromatin mit 5 μg/ml anti-NFATc1 Antikörper immunpräzipitiert. Zur Bindungsanalyse von NFATc1 wurde auf eine IgG-Kontrolle normalisiert und die Bindung an die jeweiligen angebenen Promotoren in *Nfatc2*^{-/-} Zellen durch qRT-PCR Analysen im Vergleich zu wildtypischen dargestellt. (D) Wildtypische CD4⁺ T-Zellen wurden über Nacht mit anti-CD3, anti-CD28 allein oder jeweils in Anwesenheit von CsA und 11R-Vivit stimuliert. Die Induktion von NFATc1 und IRF4 wurde durch Westernblot der Zellysate mit anti-NFATc1 und anti-IRF4 Antikörpern nachgewiesen.

Interessanterweise konnte für *Irf4* ebenfalls eine verstärkte Bindung von NFATc1 in *Nfatc2*^{-/-} Th1-, Th2- und Th17-CD4⁺ T-Zellen nachgewiesen werden (Abbildung 5.1.15 C). Lysate von wildtypischen CD4⁺ T-Zellen nach unterschiedlicher TCR-Stimulation ergaben zusätzlich eine IRF4-Induktion unter Bedingungen, in denen auch NFATc1 induziert wurde (Abbildung 5.1.15 D). Wurde die Induktion von NFATc1 durch die Inhibitoren CsA und 11R-VIVIT verhindert, konnte auch keine IRF4-Induktion detektiert werden (Abbildung 5.1.15 D). NFATc1 scheint daher an der Induktion von IRF4 beteiligt zu sein und seine vermehrte Bindung am *Irf4*-Gen führte zusätzlich, neben mehr IL-17A, IL-4 und IL-10 auch zu mehr IRF4 in *Nfatc2*^{-/-} Th17- und Th2-Zellen.

5.1.3 Doppel-defiziente Mäuse für NFATc1 und NFATc2 sind vollständig vor EAE geschützt

Nachdem sich sowohl die Defizienz von NFATc1 als auch die Defizienz von NFATc2 positiv auf den Krankheitsverlauf der EAE auswirkte, aber es bekannt ist, dass die verschiedenen Mitglieder der NFAT-Transkriptionsfaktorfamilie funktionelle Redundanzen aufweisen, sollte untersucht werden, wie die EAE durch das gleichzeitige Fehlen von NFATc1 und NFATc2 in CD4⁺ T-Zellen beeinflusst wird. Dafür wurden *Nfatc1*^{fl/fl} x *Cd4cre*⁺ und *Nfatc2*^{-/-} Mäuse miteinander verpaart und in den daraus hervorgegangenen Nachkommen eine aktive EAE durch CFA/MOG₃₅₋₅₅-Immunisierung induziert. Im folgenden werden diese doppel-defizienten Mäusen als Doppel-*knock-out* Mäuse (*DKO*) bezeichnet.

Wie in Abbildung 5.1.16 A zu erkennen ist waren diese Mäuse komplett vor Ausbildung einer EAE geschützt. Die Analyse des klinischen Krankheits-*scores* über die gesamte Zeit des EAE-Experiments zeigte, dass die wildtypischen Kontrolltiere stark unter EAE-Symptomen litten, während die *DKO*-Mäuse völlig gesund blieben. Analysierte man das ZNS von *wild type* und *DKO*-EAE-Mäusen genauer, so fand man stark reduzierte Immunzellinfiltrate, die sich aus Lymphozyten (CD45⁺CD11b⁻), Makrophagen (CD45⁺CD11b⁺) und Mikrogliazellen (CD45^{low}CD11b^{low}) zusammensetzten. Zusätzlich konnten kaum CD4⁺ T-Zellen (Abbildung 5.1.16 B) nachgewiesen werden. Auch die Produktion von pathogenen Zytokinen von CD4⁺ T-Zellen im ZNS der *DKO*-Mäuse war stark reduziert bzw. kaum messbar. Alle relevanten pathogenen Zytokine, wie IL-17A, IFN γ und GM-CSF waren in *DKO*-defizienten CD4⁺ T-Zellen nicht zu detektieren (Abbildung 5.1.16 C). IL-4 und IL-10 waren gleichfalls nicht nachweisbar (Daten nicht gezeigt).

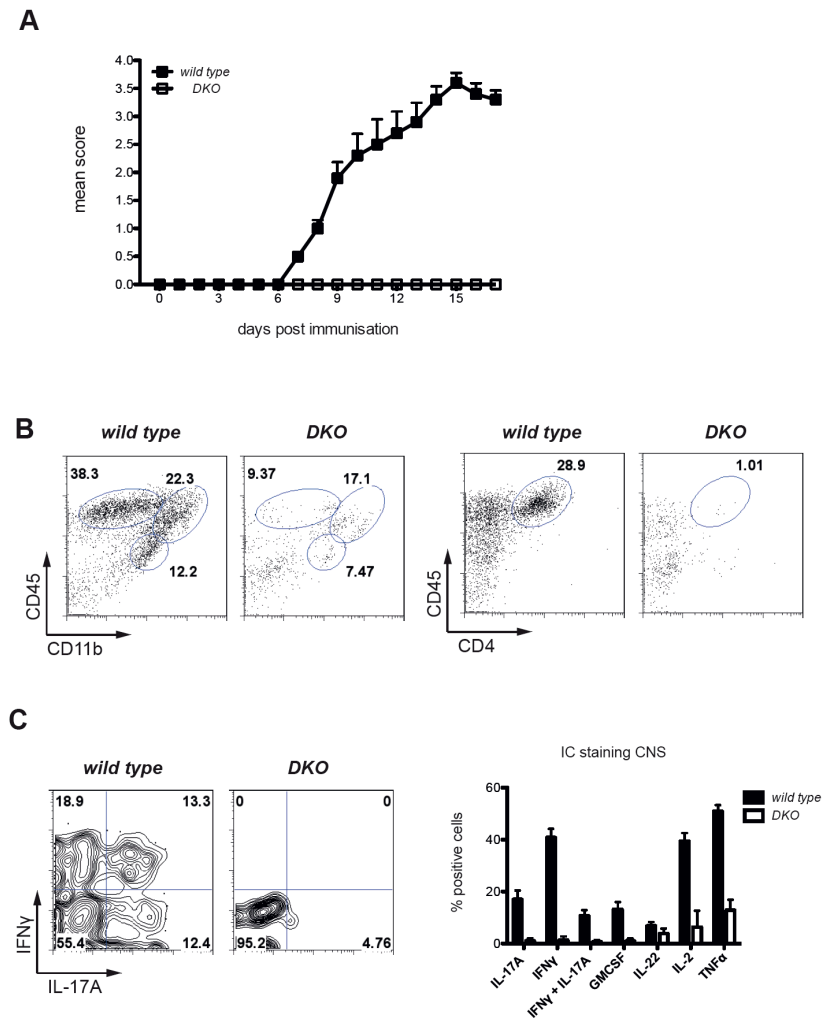


Abbildung 5.1.16: DKO-Mäuse für NFATc1 und NFATc2 entwickeln keine EAE.

(A) Induktion einer aktiven EAE in *wild type* und *DKO*-Mäusen mit CFA/MOG₃₅₋₅₅. Dargestellt ist der mittlere Durchschnitts-score (*mean score*) beider Gruppen für jeden Tag über die Zeit des EAE-Experiments. (B) Durchflusszytometrische Analyse der zellulären Zusammensetzung von ZNS-Infiltraten aus *wild type* und *DKO* EAE-Mäusen. (C) Intrazelluläre FACS-Analyse der Zytokinproduktion von CD4⁺ T-Zellen aus dem ZNS. Hierzu wurden die isolierten Immunzellinfiltrate 5 h mit TPA/Iono restimuliert, und anschließend eine Oberflächenfärbung von CD4 und eine intrazelluläre Färbung der jeweiligen angegebenen Zytokine durchgeführt. Dargestellt sind ein repräsentativer FACS-plot der IL-17A- und IFN γ -Färbungen sowie die graphische Zusammenfassung aller FACS-Analysen der Zytokinproduktion von CD4⁺ T-Zellen aus *DKO* und der wildtypischen EAE-Mäusen.

Das gleichzeitige Fehlen von NFATc1 und NFATc2 in CD4⁺ T-Zellen führte somit zu einer EAE-Resistenz der *DKO*-Mäuse, wie es anhand des Krankheits-score und auch anhand der spezifischen Analyse des ZNS dieser Mäuse nachweisbar war. Im ZNS befanden sich im Gegensatz zu wildtypischen Geschwistertieren keine entzündlichen Infiltrate sowie keine transmigrierten CD4⁺ T-Zellen, die pathogene Zytokine produzierten und somit eine EAE auslösten. In Fall des doppelten Verlustes konnte somit eine Addition der jeweiligen protektiven Effekte, die für den *knock-out* von NFATc1 und von NFATc2 in CD4⁺ T-Zellen auf den Krankheitsverlauf der EAE beobachtet wurde, gezeigt werden.

5.2 Der SUMOylierungsstatus von NFATc1 beeinflusst den Krankheitsverlauf der EAE

SUMOylierung ist eine posttranslationale Proteinmodifikation. Durch das Koppeln von kleinen SUMO(*small ubiquitin-related modifier*)-Proteinen an das Zielprotein wird dessen Funktion reguliert. Insbesondere Transkriptionsfaktoren können – abhängig von ihrem SUMOylierungsstatus – in ihrer Funktion reguliert werden, d. h. sie können z. B. von Aktivatoren zu Repressoren der Genexpression von Zielgenen werden¹⁹². So wurde von unserer Arbeitsgruppe 2009 *in vitro* mit Zelllinien und Transfektionsversuchen für NFATc1 gezeigt, dass die SUMOylierung von NFATc1 unter anderem zur Repression der *Il2*-Genexpression führt¹⁹¹. Hierbei sind die beiden C-terminalen SUMO-Bindungsmotive der langen Isoform NFATc1/C von funktioneller Relevanz. Interessanterweise werden dagegen andere NFATc1 Zielgene, wie z. B. *Ifng* und *Il13*, verstärkt aktiviert, wenn NFATc1 SUMOyliert ist¹⁹¹. Um die physiologische Relevanz der NFATc1-SUMOylierung bzw. dieser Feinregulation der transkriptionellen Aktivität der verschiedenen NFATc1 Isoformen *in vivo* untersuchen zu können, wurde eine Mauslinie, die als *Nfatc1/C^{ΔSUMO}* bezeichnet wurde, generiert. In diesen Mäusen wird NFATc1 aufgrund von Mutationen der SUMO-Bindungsmotive nicht mehr SUMOyliert (Abbildung 5.2.1). Da der Verlust von NFATc1 mit allen seinen Isoformen in der EAE mit *Nfatc1^{fl/fl} x Cd4Cre⁺* Mäusen protektiv war, sollte die Rolle der NFATc1/C-SUMOylierung anhand der *Nfatc1/C^{ΔSUMO}* Maus im EAE-Modell ermittelt werden.

5.2.1 SUMOylierung reguliert die differentielle transkriptionelle Aktivität der NFATc1-Isoformen in primären CD4⁺ T-Zellen

5.2.1.1 Generierung und Phänotypisierung der *Nfatc1/C^{ΔSUMO}* Maus

5.2.1.1.1 Einführung von Punktmutationen führt zur Inaktivierung der SUMOylierungsmotive von NFATc1/C

Zur Generierung der *Nfatc1/C^{ΔSUMO}* Mauslinie wurden zwei Punktmutationen in die SUMOylierungsmotive des Exons 10 eingefügt. Dabei wurden die beiden Basentriplets AAG, die für die Lysine K702 und K914 innerhalb der SUMOylierungssignalsequenzen in

Exon 10 kodieren, zu dem Arginin codierenden Triplet CGG mutiert (siehe Abbildung 5.2.1 A und B). Dadurch wurden die SUMOylierungsmotive des C-Terminus so verändert, dass dort keine SUMOylierung mehr stattfinden konnte. Die *Nfatc1*^{ΔSUMO} Maus exprimiert alle NFATc1-Isoformen und unterscheidet sich nur in der „Nicht-SUMOylierbarkeit“ des langen C-Terminus NFATc1/C zu wildtypischen Geschwistertieren. In einem weiteren Schritt wurde das Exon 10 mit LoxP-Sequenzen flankiert, so dass – nach Verpaarung mit Cre-Mauslinien – nur die kurze Isoform NFATc1/A gebildet werden (siehe Abbildung 5.2.1 A).

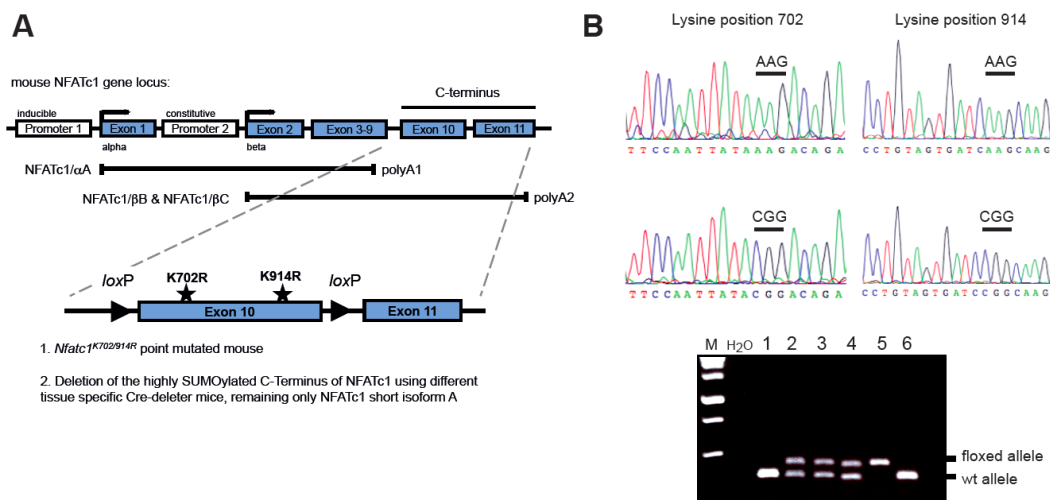


Abbildung 5.2.1: Strategie zur Etablierung und Identifikation der *Nfatc1*^{ΔSUMO} Mäuse.

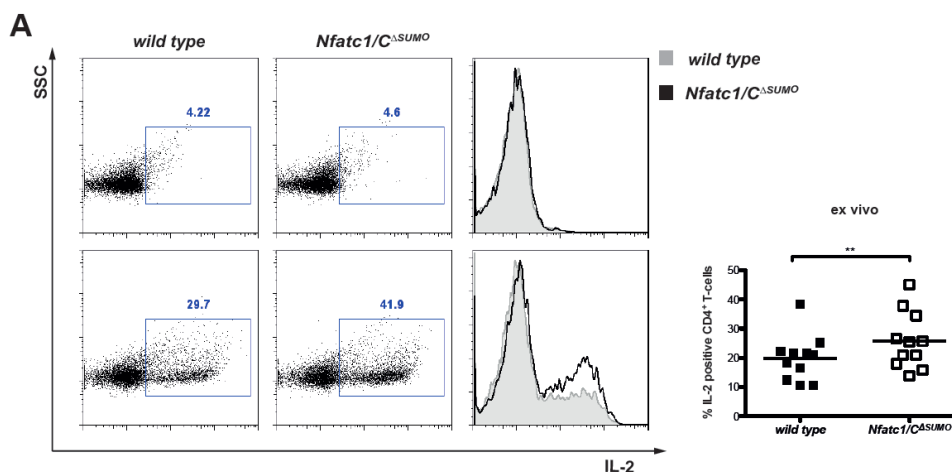
(A) Schema der Einführung der LoxP-Sequenzen und Punktmutationen der Lysine an Position 702 und 914 des Exon 10 von *Nfatc1*. Durch *knock-in* dieser veränderten Sequenz wird eine Inaktivierung der SUMOylierungsstellen herbeigeführt. (B) Sequenzierung der Punktmutationen an Position 702 und 914. Repräsentative Sequenzdaten von *wild type* und *Nfatc1*^{ΔSUMO} DNA zeigen die Mutation der beiden Lysine (AAG) zu Argininen (CGG). Darunter sind PCR-Analysen zur Identifikation der *Nfatc1*^{ΔSUMO} Mäuse abgebildet. Spur 1 und 6 zeigen die Bande für das wildtypischen (*wild type*) Allel. Spur 5 zeigt die Bande für das gefloxtete Allel, und Spuren 2,3 und 4 zeigen die zwei Banden für heterozygote Mäuse.

In Abbildung 5.2.1 A ist die Strategie zur Generierung der *Nfatc1*^{ΔSUMO} Mäuse schematisch dargestellt. Die Einführung der Punktmutation in den *Nfatc1*^{ΔSUMO} Mäusen wurde mittels DNA-Sequenzierung bestätigt. Anhand einer Genotypisierungs-PCR mit *primern* für das gefloxtete Allel konnten *Nfatc1*^{ΔSUMO} Mäuse routinemäßig identifiziert werden (Abbildung 5.2.1 B). Obwohl die Mutation durch den *knock-in* in allen Geweben zum Tragen kommt, wurden *Nfatc1*^{ΔSUMO} Mäuse normal und ohne Ausprägung eines Immundefektes geboren. Auch die Immunzellpopulationen von Thymus, Milz und Lymphknoten waren im Vergleich zu wildtypischen Geschwistertieren unverändert (Väth, Dietz; nicht publizierte Daten).

5.2.1.1.2 *Nfatc1/C^{ΔSUMO}* CD4⁺ T-Zellen produzieren erhöhte Mengen an IL-2 und reduzierte Mengen an Effektorzytokinen

Da anhand der Vorarbeiten aus dem Jahr 2009 bekannt ist, dass die SUMOylierung vor allem die Expression von *Il2* negativ beeinflusst¹⁹¹, sollte zuerst untersucht werden, ob primäre CD4⁺ T-Zellen von *Nfatc1/C^{ΔSUMO}* Mäusen hinsichtlich der IL-2 Produktion Unterschiede zu wildtypischen CD4⁺ T-Zellen zeigen. Hierzu wurden direkt *ex vivo* isolierte naive CD4⁺ T-Zellen 8 h mit TPA/Iono, in Anwesenheit von Brefeldin A für 5 h, stimuliert und anschließend mittels einer intrazellulären Färbung die Menge an IL-2-Produzenten im FACS analysiert. Unstimulierte Zellen dienten als Negativ-Kontrolle der IL-2-Produktion.

Wie in Abbildung 5.2.2 A zu erkennen ist, zeigten naive CD4⁺ T-Zellen nach Stimulation eine zweifach erhöhte Menge an IL-2-Produzenten (FACS-plot untere Reihe). Dieser Unterschied war signifikant, was aus der statistischen Analyse von mehreren *ex vivo* IL-2 Messungen mit wildtypischen und *Nfatc1/C^{ΔSUMO}* CD4⁺ T-Zellen hervorging. In Abbildung 5.2.2 B ist die durchflusszytometrische Analyse einer *in vitro* Differenzierung zu Th1- und Th17-Zellen von wildtypischen und *Nfatc1/C^{ΔSUMO}* CD4⁺ T-Zellen gezeigt. Sowohl unter Th1- als auch unter Th17-Bedingungen produzierten CD4⁺ T-Zellen wiederum deutlich mehr IL-2. Die erhöhte Anzahl an IL-2 Produzenten mehrerer Th1 (n=11) und Th17 (n=8) Differenzierungsversuche war sowohl unter Th1- als auch unter Th17-Bedingungen statistisch signifikant (Abbildung 5.2.2 C). Die Anzahl an Effektorzytokinproduzenten, d. h. IFN γ - oder IL-17A-Produzenten war dagegen jeweils signifikant reduziert. Dies ist sowohl in Abbildung 5.2.2 B mit einem repräsentativen FACS-plot als auch in Abbildung 5.2.2 C durch die statistische Analyse von mehreren *in vitro* Differenzierungen belegt.



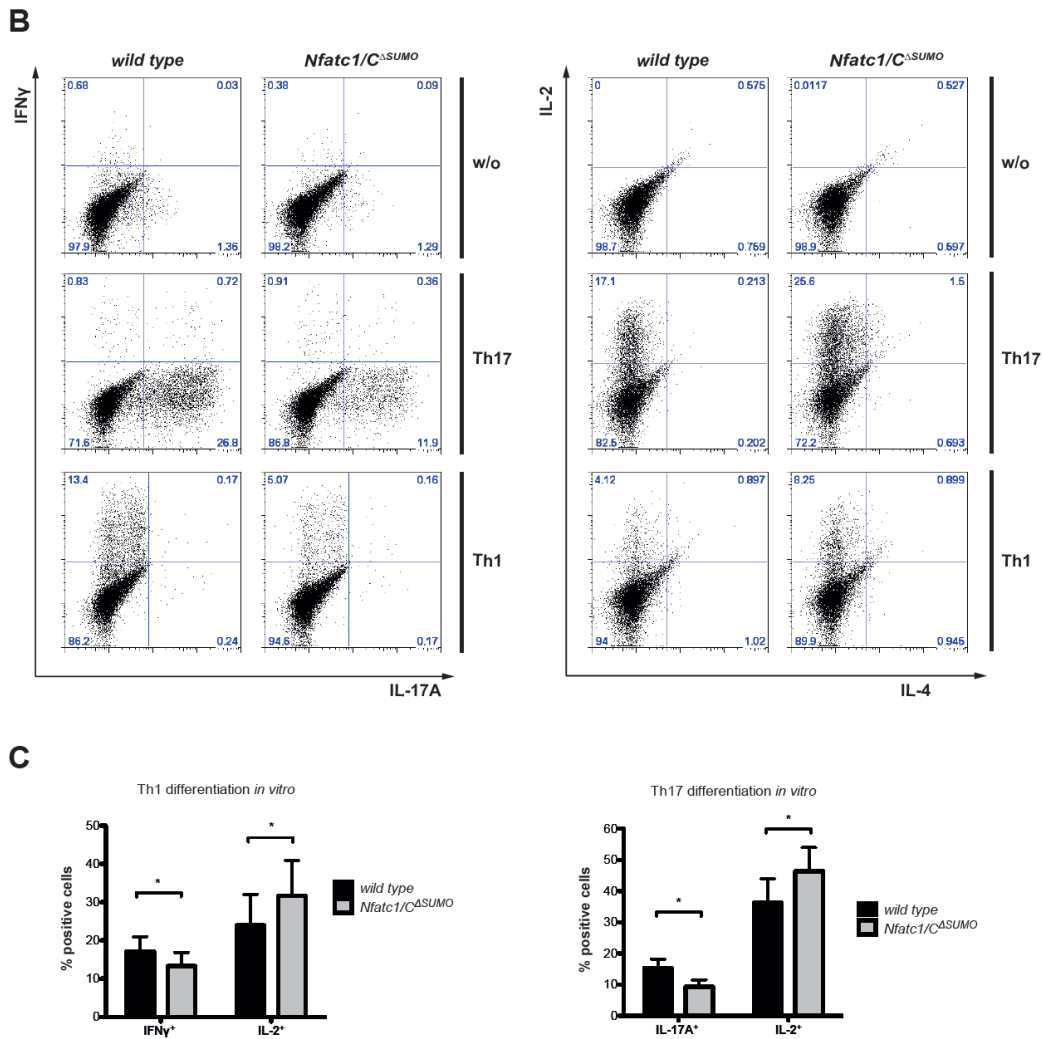


Abbildung 5.2.2 A: Erhöhte *ex vivo* IL-2-Produktion und verminderte Effektorzytokinproduktion von *Nfatc1/C^{ΔSUMO}* CD4⁺ T-Zellen im Vergleich zu wildtypischen CD4⁺ T-Zellen.

(A) Naive CD4⁺ T-Zellen aus wildtypischen (*wild type*) und *Nfatc1/C^{ΔSUMO}* Mäusen wurden 8 h mit TPA/Iono in Anwesenheit von Brefeldin A stimuliert. Anschließend wurde mittels einer intrazellulären FACS-Färbung der prozentuale Anteil an IL-2-Produzenten analysiert. Als Kontrolle (obere Reihe) wurden gereinigte CD4⁺ T-Zellen nur mit Brefeldin A und ohne die Zugabe von TPA/Iono inkubiert und auf IL-2 intrazellulär gefärbt. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Student *t*-Test **p*<0.05. (B) Primäre CD4⁺ T-Zellen aus wildtypischen (*wild type*) und *Nfatc1/C^{ΔSUMO}* Mäusen wurden *in vitro* drei Tage zu Th1- und Th17-Zellen differenziert. An d 3 wurden die Zellen geerntet und jeweils 5 h mit TPA/Iono in Anwesenheit von Brefeldin A und Monensin 3 h restimuliert. Die prozentuale Verteilung an IL-2 produzierenden, sowie an IFN γ und IL-17A produzierenden CD4⁺ T-Zellen wurde anhand von intrazellulären FACS-Färbungen analysiert. Dargestellt sind repräsentativer FACS-plots der IL-17A, IFN γ und der IL-2, IL-4 Färbungen von CD4⁺ T-Zellen der Th1- und Th17-Differenzierung. Als Kontrolle wurden Zellen ohne TPA/Iono mit Brefeldin A und Monensin inkubiert (w/o). (C) Statistische Auswertung der IL-2 und IFN γ -positiven Zellen sowie der IL-2 und IL-17A-positiven Zellen mehrerer Th1- und Th17-Differenzierungen. Student *t*-test **p*<0.05.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass der Verlust der SUMOylierung von NFATc1/C zu einer erhöhten Expression von *Il2* und gleichzeitig zu einer erniedrigten Expression von *Ifng* und *Il17a* in *in vitro* differenzierten CD4⁺ T-Zellen führte. Diese Daten

mit primären CD4⁺ T-Zellen bestätigen die gewonnenen Erkenntnisse der *Il2*-Repression und der positiven Transaktivierung von *Ifng* durch SUMOyliertes NFATc1/C aus früheren Studien¹⁹¹. Zusätzlich konnte für primäre CD4⁺ T-Zellen aus *Nfatc1/C^{ΔSUMO}* Mäusen gezeigt werden, dass auch die Expression von *Il17a* durch den SUMOylierungsstatus von NFATc1/C beeinflusst wird.

5.2.1.1.3 Direkte und indirekte Effekte der fehlenden SUMOylierung auf CD4⁺ T-Zellen

IL-2 ist ein wichtiges Zytokin, welches viele Prozesse innerhalb des Immunsystems beeinflusst. So induziert es die Proliferation von T-Zellen²⁴⁵. Gleichzeitig ist es zum einen sehr wichtig für die Differenzierung und die Aufrechterhaltung der Homöostase von Tregs²⁴⁵, zum anderen hat es einen negativen Einfluss auf die Differenzierung von Th17-Zellen^{246, 247}. Um die Theorie, dass IL-2 sich negativ auf die Differenzierung von Th17-Zellen auswirkt, zu verifizieren, sollte zunächst in einem *in vitro* Versuch untersucht werden, ob IL-2 tatsächlich die Th17-Differenzierung beeinflusst. Hierzu wurden naive CD4⁺ T-Zellen einer wildtypischen Maus *in vitro* zu Th17-Zellen differenziert. Wie in Abbildung 5.2.3 A gezeigt ist, reduzierte sich die Anzahl an IL-17A-Produzenten in der Differenzierungskultur bei Zugabe von 75 u/ml hIL-2 um die Hälfte. Dagegen wirkte sich ein IL-2 neutralisierender Antikörper (anti-mIL-2 10 µg/ml) positiv auf die Th17-Differenzierung aus, da hier die Anzahl an IL-17A Produzenten von ca. 14% auf 36% anstieg. Bei einer gleichzeitigen Gabe von hIL-2 und neutralisierenden Antikörpern wurde der Unterschied zur „normalen“ Th17-Differenzierungskultur aufgehoben. Zusätzlich konnten diese durchflusszytometrischen Analysen auch anhand eines IL-17A ELISAs von Überständen der *in vitro* Kulturen mit 75 u/ml hIL-2 oder 10 µg/ml anti-mIL-2 bestätigt werden. Auch hier wurde weniger IL-17A im Überstand bei Gabe von exogenem IL-2 und mehr IL-17A bei Neutralisation, des endogen produzierten, IL-2 gemessen.

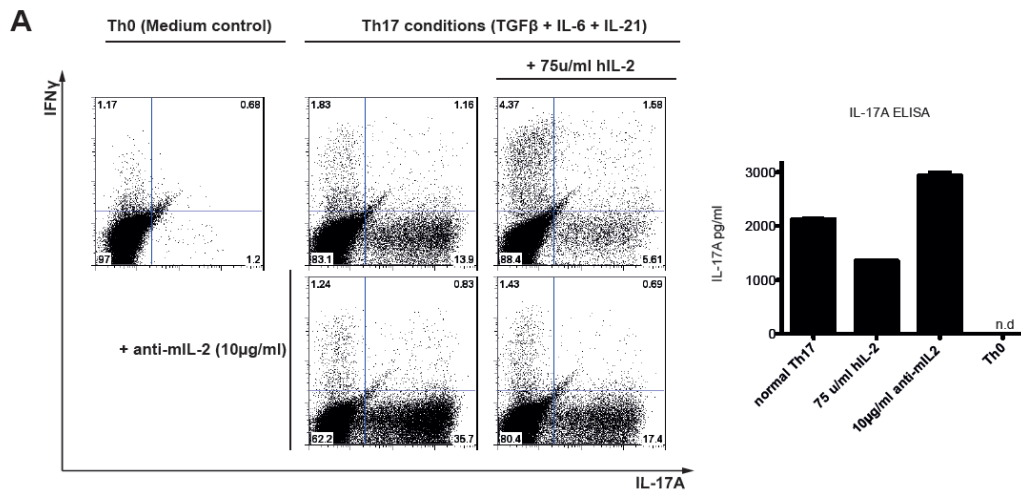


Abbildung 5.2.3 A: Analyse des extrinsischen Einflusses von IL-2 auf die Th17 Differenzierung.

Naive wildtypische CD4⁺ T-Zellen wurden *in vitro* zu Th0- oder zu Th17-Zellen differenziert. Zu dem Standard-Zytokinmix für eine Th17-Differenzierung (TGFβ, IL-6 und IL-21) wurden jeweils entweder 75 u/ml hIL-2 oder 10 µg/ml eines neutralisierenden anti-IL2 Antikörpers in die Kultur gegeben. Am d 3 der Kultur wurden die Zellen jeweils geerntet und zur intrazellulären FACS-Analyse von IL-17A mit TPA/Iono 5 h in Anwesenheit von Brefeldin A und Monensin (3 h) restimuliert. Zusätzlich wurden die Überstände der jeweiligen Kulturbedingungen mit Hilfe eines IL-17A-ELISAs auf die Menge an sekretiertem IL-17A analysiert.

Für die Th17-Differenzierung sollte der Einfluss des endogenen „Mehr“ an IL-2 von *Nfatc1/C^{ASUMO}* im Vergleich zu wildtypischen CD4⁺ T-Zellen untersucht werden, nachdem gezeigt werden konnte, dass IL-2 einen negativen Einfluss auf die Th17-Differenzierung ausübte. Hierzu wurden wiederum naive CD4⁺ T-Zellen beider Mausgruppen *in vitro* zu Th17-Zellen differenziert und dann anhand der Anzahl an IL-2- und IL-17A-Produzenten miteinander in einer FACS-Färbung verglichen. Wie in Abbildung 5.2.3 A dargestellt ist produzierten Zellen der *Nfatc1/C^{ASUMO}* Th17-Kultur mehr IL-2 und entsprechend weniger IL-17A als Zellen der wildtypischen Th17-Differenzierung. Durch Zugabe eines IL-2-neutralisierenden Antikörpers (anti-mIL-2 10 µg/ml) konnte dieser Unterschied in der Anzahl an IL-2-Produzenten aufgehoben werden (Abbildung 5.2.3 A). Dieser Effekt der Neutralisation des endogen produzierten IL-2 von *Nfatc1/C^{ASUMO}* CD4⁺ T-Zellen konnte erst mit einer Dosis von 10 µg/ml anti-mIL-2 erreicht werden, was in Titrationsversuchen sowohl auf mRNA Ebene als auch auf Proteinebene (ELISA) gezeigt werden konnte (siehe Abbildung 5.2.4 B).

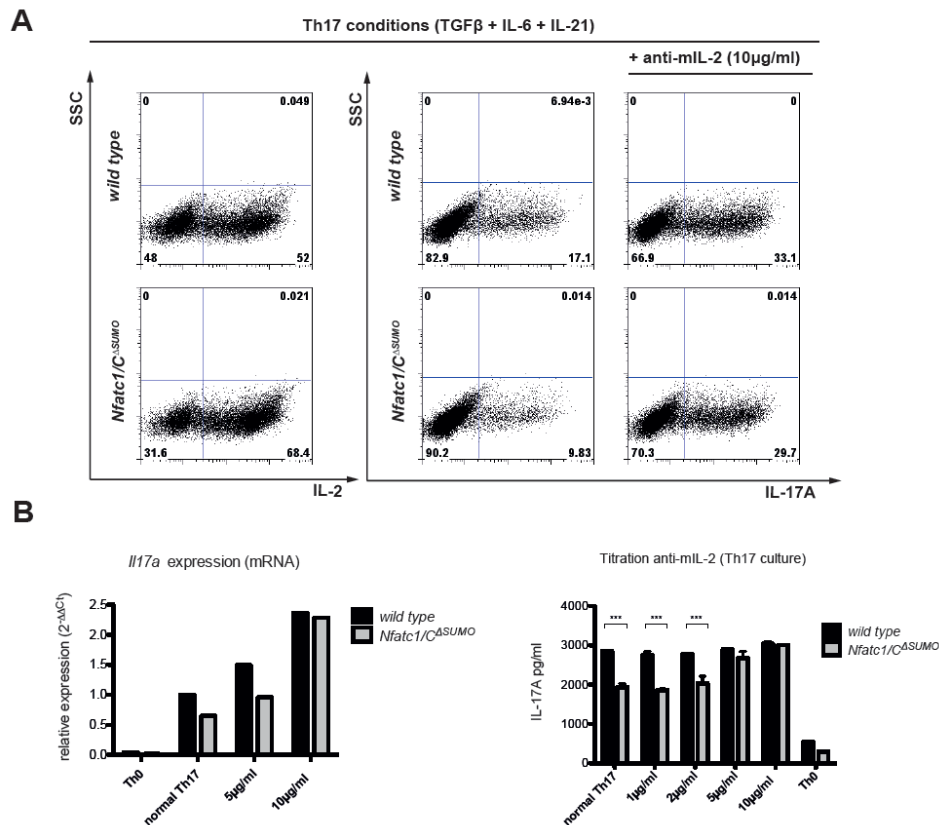


Abbildung 5.2.4 A-B: Extrinsischer Effekt des von *Nfatc1/C^{ASUMO}* CD4⁺ T-Zellen produzierten IL-2 auf die Th17-Differenzierung *in vitro*.

Naive wildtypische und *Nfatc1/C^{ASUMO}* CD4⁺ T-Zellen wurden *in vitro* zu Th17-Zellen differenziert. Zu dem Standard-Zytokinmix für die Th17-Differenzierung (TGF β , IL-6 und IL-21) wurden 10 μ g/ml eines neutralisierenden anti-mIL2 Antikörpers in die Kultur gegeben. (A) Am d 3 der Kultur wurden die Zellen geerntet und für eine intrazelluläre FACS-Analyse von IL-17A mit TPA/Iono 5 h in Anwesenheit von Brefeldin A und Monesin (3 h) restimuliert. (B) qRT-PCR Analyse von *Il17a* der Th17-Zellen unter Zugabe von 5 und 10 μ g/ml anti-mIL2 im Vergleich zu normalen Th17- oder Th0-Zellen (d 3). IL-17A-ELISA von Überständen (d 3) nach Titration von anti-mIL-2.

Es konnte somit der negative Einfluss von IL-2, welches von *Nfatc1/C^{ASUMO}* CD4⁺ T-Zellen vermehrt sezerniert wurde, auf die *in vitro* Th17-Differenzierung und einer somit verminderten Population an IL-17A-Produzenten im Vergleich zur Th17-Kultur von wildtypischen CD4⁺ T-Zellen belegt werden.

Da IL-2 einen positiven Einfluss auf die Entwicklung von induzierten Tregs hat (CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ iTregs)²⁴⁸, sollte der Einfluss der vermehrten IL-2-Menge auf die Generation von iTregs in *in vitro* Differenzierungen von *Nfatc1/C^{ASUMO}* CD4⁺ T-Zellen analysiert werden. Normalerweise kann man iTregs *in vitro* durch anti-CD3/CD28 Stimulation und der Zugabe von TGF β und IL-2 generieren²⁴⁹. In diesem Fall wurde eine Differenzierung ohne die Zugabe von exogenem IL-2 – also nur in Anwesenheit von TGF β – durchgeführt, um den Einfluss des endogen produzierten IL-2 zu untersuchen. In Abbildung 5.2.5 B ist die FACS-

Analyse der Foxp3-positiven Population von wildtypischen und *Nfatc1/C^{ΔSUMO}* CD4⁺ T-Zellen gezeigt. Bei alleiniger Zugabe von TGFβ wurde in der Kultur der *Nfatc1/C^{ΔSUMO}* CD4⁺ T-Zellen eine deutlich größere Anzahl an Foxp3⁺ Zellen induziert. Somit konnte gezeigt werden, dass *Nfatc1/C^{ΔSUMO}* CD4⁺ T-Zellen, die aufgrund des Verlustes der SUMOylierung von NFATc1/C vermehrt IL-2 produzieren, *in vitro* leichter zu iTregs differenzierten (Abbildung 5.2.5 B). Um zu untersuchen, ob man diesen Einfluss von IL-2 auch unter den Th17-Differenzierungsbedingungen in der *in vitro* Kultur von *Nfatc1/C^{ΔSUMO}* CD4⁺ T-Zellen findet, wurde die Menge an CD4⁺ Foxp3⁺ T-Zellen nach Zugabe von 75 u/ml hIL-2 gemessen (Abbildung 5.2.5 A).

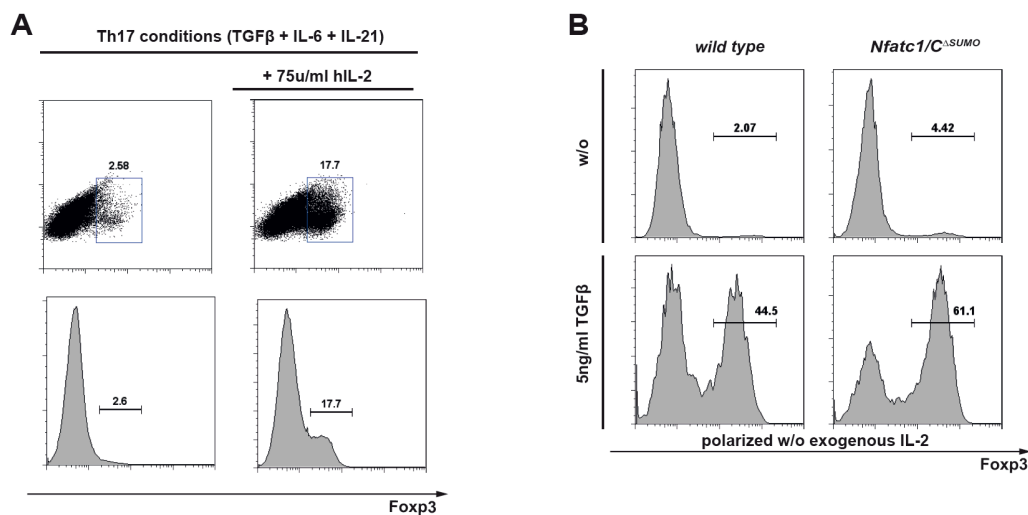


Abbildung 5.2.5 A-B: Durch exogenes als auch endogenes IL-2 können *in vitro* regulatorischen T-Zellen generiert werden.

(A) Naive wildtypische CD4⁺ T-Zellen wurden *in vitro* zu Th17-Zellen differenziert. In einem Ansatz wurde zusätzlich exogen 75 u/ml hIL-2 in die Differenzierungskultur gegeben. An d 3 wurden die Zellen geerntet und intrazellulär auf Foxp3 mit einem anti-Foxp3 Antikörper gefärbt. die Foxp3⁺ Population wurde durchflusszytometrisch bestimmt. (B) *In vitro* iTreg-Differenzierung von naiven wildtypischen (*wild type*) und *Nfatc1/C^{ΔSUMO}* CD4⁺ T-Zellen. Zur Differenzierung wurde nur TGFβ verwendet. An d 3 wurde die Menge an CD4⁺ Foxp3⁺ Zellen im FACS bestimmt.

Die Zugabe von exogenem IL-2 induzierte eine deutliche Population an Foxp3⁺ CD4⁺ T-Zellen im Vergleich zur normalen Th17-Differenzierungskultur. Somit hatte die Zugabe von IL-2 auch unter Th17-Bedingungen einen positiven Einfluss auf die Generierung von Foxp3⁺ Zellen.

Neben dem direkten repressiven Effekt auf die Genexpression von *Il2* wurde für die Expression von Effektorzytokinen, wie z. B. *Ifng* ein positiver Effekt durch SUMOylierung von NFATc1/C beschrieben¹⁹¹. Da in Abschnitt 5.2.1.1.2 gezeigt wurde, dass neben der Produktion von IL-17A auch die Produktion von IFNγ von *Nfatc1/C^{ΔSUMO}* CD4⁺ T-Zellen

erniedrigt war, sollte genauer untersucht werden, welcher Effekt der erniedrigten Genexpression von *Ifng* zugrunde liegt. Hierzu wurde zunächst analysiert, ob es auf die Th1-Differenzierung einen indirekten IL-2-vermittelten Einfluss gibt. Für Th1-Zellen ist im Gegensatz zu Th17-Differenzierung ein positiver Effekt von IL-2 bekannt²⁵⁰. Naive CD4⁺ T-Zellen aus wildtypischen und *Nfatc1/C^{ΔSUMO}* Mäusen wurden *in vitro* zu Th1-Zellen unter normalen Th1-Bedingungen und unter Zugabe von 10 µg/ml anti-mIL2 differenziert. Wie in Abbildung 5.2.6 zu sehen ist, hatte die Neutralisation von IL-2 in der Kultur von *wild type* und *Nfatc1/C^{ΔSUMO}* CD4⁺ T-Zellen nur einen minimalen Einfluss auf die Produktion von IFN γ .

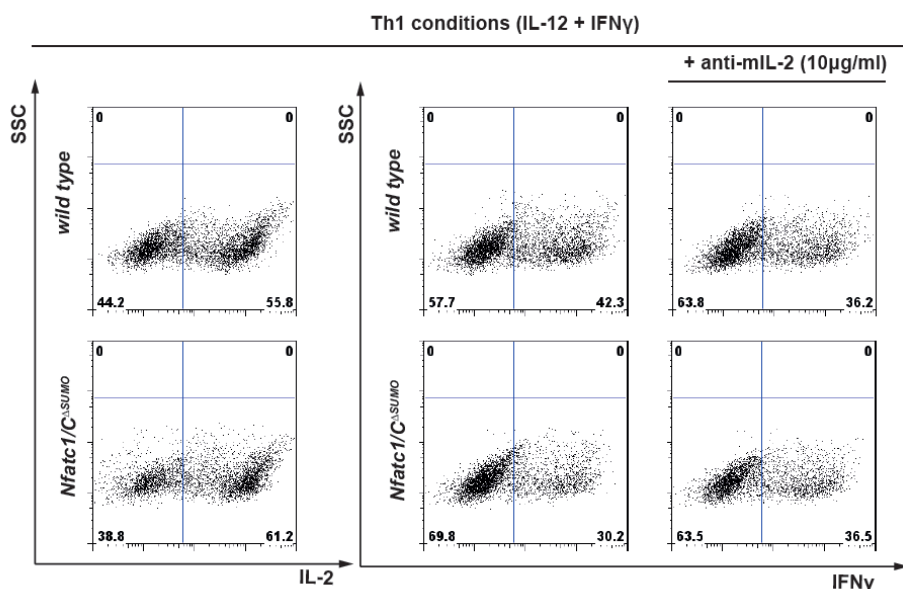


Abbildung 5.2.6: Extrinsic Einfluss von IL-2 auf *in vitro* Th1-Differenzierung von wildtypischen (*wild type*) und *Nfatc1/C^{ΔSUMO}* CD4⁺ T-Zellen.

Naive wildtypische und *Nfatc1/C^{ΔSUMO}* CD4⁺ T-Zellen wurden *in vitro* zu Th1-Zellen differenziert. Zu dem Standard-Zytokinmix für eine Th1-Differenzierung (IL-12, IFN γ) wurden 10 µg/ml eines neutralisierenden anti-mIL2 Antikörpers in die Kultur gegeben. (A) Am d 3 der Kultur wurden die Zellen geerntet und für eine intrazelluläre FACS-Analyse von IL-2 und IFN γ mit TPA/Iono 5 h in Anwesenheit von Brefeldin A und Monensin (3 h) restimuliert.

Nachdem für *Nfatc1/C^{ΔSUMO}* Th17-Zellen ein indirekter IL-2-vermittelter Effekt belegt werden konnte, der sich aber nicht bei Th1-Zellen zeigte, wurden direkte Effekte der fehlenden NFATc1/C SUMOylierung auf die Effektorzytokinproduktion untersucht. Mit einer Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP) sollte die Bindung von NFATc1 in Abhängigkeit des SUMOylierungsstatus an den Promotor von *Ifng* unter Th1-Bedingungen oder an den Promotor von *Il17a* unter Th17-Bedingungen analysiert werden. Hierzu wurden naive CD4⁺ T-Zellen *in vitro* jeweils drei Tage in die Th1- oder Th17-Richtung differenziert und das Chromatin mit einem anti-NFATc1 Antikörper präzipitiert. Der hierzu verwendete Antikörper

erkennt sowohl SUMOyliertes als auch nicht-SUMOyliertes NFATc1. Die Bindungsanalyse von NFATc1 relativ zu einer IgG Isotypkontrolle am *Ifng*- und *Il17a*-Promotor erfolgte mittels qRT-PCR (Abbildung 5.2.7 A).

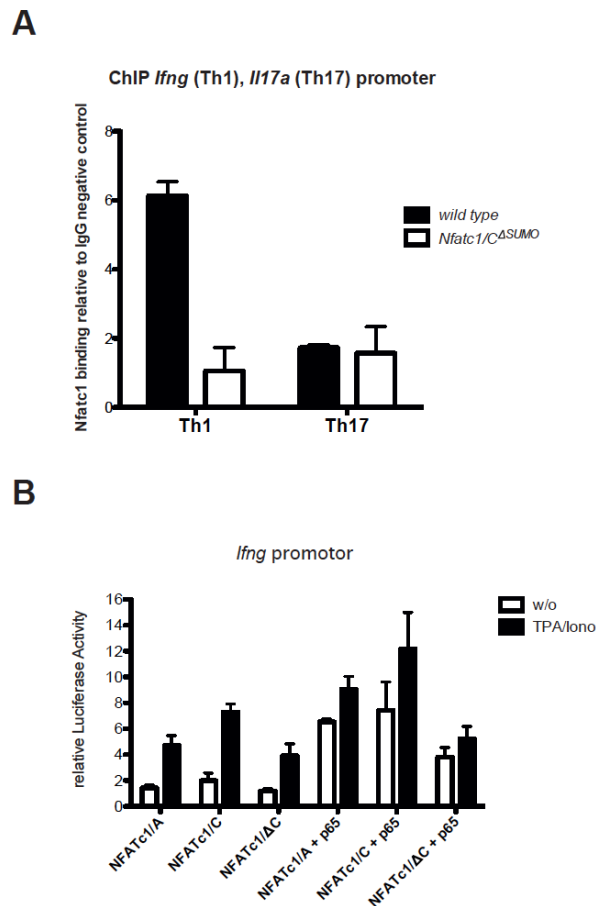


Abbildung 5.2.7 A-B: Verminderte Bindung der nicht-SUMOylierten Form von NFATc1/C am *Ifng*-Promotor sowie eine reduzierte Induktion der Expression von *Ifng* durch die Δ SUMO-Mutante.

(A) Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP) von anti-NFATc1 (5 μ g/ml) im Vergleich zu einer IgG Isotypkontrolle normalisiert zum Input. Hierzu wurden naive wildtypische oder *Nfatc1/C Δ SUMO* CD4⁺ T-Zellen *in vitro* drei Tage zu Th1- und Th17-Zellen differenziert. Dargestellt ist die qRT-PCR Analyse der relativen Bindung von NFATc1 am *Ifng*-Promotor unter Th1- und am *Il17a*-Promotor unter Th17-Bedingungen. (B) Luziferase-Assay von transfizierten HEK293T Zellen. Es erfolgte eine Kotransfektion des *Ifng*-Luziferase-Plasmids mit jeweils den Plasmiden für NFATc1/A, NFATc1/C und der SUMO-Mutante NFATc1/ Δ C jeweils alleine oder in weiterer Kotransfektion mit dem Expressionsplasmid für NF- κ B p65. Dargestellt ist jeweils die relative Luziferaseaktivität ohne (w/o) oder mit TPA/Iono Stimulation.

Wie zu erkennen ist hatte die fehlende SUMOylierung keinen Einfluss auf die Bindung von NFATc1 an den *Il17a*-Promotor unter Th17-Bedingungen. Hier band NFATc1 gleichermaßen an den Promotor von *wild type* und *Nfatc1/C Δ SUMO* Th17-Zellen. Für den Promotor von *Ifng* hingegen konnte man einen Unterschied in der Bindung von NFATc1 in Th1-Zellen von

wildtypischen und *Nfatc1/C^{ΔSUMO}* Mäusen erkennen (Abbildung 5.2.7 A). Hier band die wildtypische – SUMOylierte Form von NFATc1 – sechsfach mehr an die Promotorregion als die nicht-SUMOylierte Form in *Nfatc1/C^{ΔSUMO}* Th1-Zellen. Somit konnte unter Th17-Bedingungen nachgewiesen werden, dass hauptsächlich indirekte IL-2-vermittelte Effekte für die reduzierte Expression von *Il17a* in *Nfatc1/C^{ΔSUMO}* CD4⁺ T-Zellen verantwortlich waren. Im Fall von Th1-Bedingungen dagegen hatte das IL-2 kaum einen extrinsischen Einfluss auf die Menge an IFN γ -Produzenten. Hier war es ein direkter Einfluss, da das nicht-SUMOylierte NFATc1 weniger am *Ifng*-Promotor gebunden wurde als SUMOyliertes, also wildtypisches NFATc1.

Da bekannt ist, dass die SUMOylierung eines Proteins oder eines Transkriptionsfaktors auch zu einer veränderten Interaktion mit anderen Proteinen/Transkriptionsfaktoren führt²⁵¹ und NFAT-Faktoren als Heteromere mit anderen Transkriptionsfaktoren die Genexpression von Zielgenen vermitteln¹⁶⁹, sollte untersucht werden, ob die verminderte Bindung der nicht-SUMOylierten Form von NFATc1 an einer veränderten Interaktion mit anderen Transkriptionsfaktoren liegt. Ein wichtiger Transkriptionsfaktor für die Induktion der *Ifng* Genexpression ist p65/RelA der NF- κ B-Transkriptionsfaktorfamilie. Dieser bindet in der Promotorregion von *Ifng* in räumlicher Nähe zu NFAT-Bindungsstellen^{211, 252}. Um zu untersuchen, ob die Expression von *Ifng* auch in Anwesenheit des Transkriptionsfaktors p65 vermindert bleibt, wenn NFATc1/C nicht-SUMOyliert ist, wurden Luziferase-Assays durchgeführt. In Abbildung 5.2.7 B ist die graphische Auswertung der relativen Luziferaseaktivität des *Ifng*-Promotors mehrerer Luziferase-Assays dargestellt. Unter stimulierten (TPA/Iono) Bedingungen war die Expression des *Ifng*-Reporterplasmids verringert, wenn die Δ SUMO Mutante (NFATc1/ Δ C) ko-transfiziert wurde, wohingegen deutlich eine Induktion der Expression bei Ko-Transfektion von NFATc1/A und NFATc1/C erkennbar war (Abbildung 5.2.7 B). Die Aktivität des *Ifng*-Promotors wurde durch die weitere Transfektion mit Plasmiden, die p65/RelA exprimierten, insgesamt deutlich verstärkt. Bei Ko-Transfektion von p65 mit NFATc1/ Δ C war die relative Luziferaseaktivität des *Ifng*-Konstrukts deutlich erniedrigt (siehe Abbildung 5.2.7 B). Die zusätzliche transkriptionelle Aktivität von p65, die für den Ansatz mit NFATc1/A und der SUMOylierbaren Form von NFATc1/C auftrat, zeigte sich bei fehlender SUMOylierung nicht. Somit wurde die Aktivität von p65 auf die Expression von *Ifng* bei fehlender NFATc1/C SUMOylierung abgeschwächt.

5.2.2 *Nfatc1/C^{ΔSUMO}* Mäuse zeigen eine abgeschwächte EAE

5.2.1.2.1 Reduzierter klinischer *score* von *Nfatc1/C^{ΔSUMO}* Mäusen

Die *in vitro* Studien (Abschnitt 5.2.1) belegten, dass sich das Fehlen der SUMOylierung der langen Isoform von NFATc1 auf die Effektorfunktionen von Th1- und Th17-Zellen auswirkte. Da Th1- und Th17-Zellen und ihre Leitzytokine als die pathogenen CD4⁺ T-Zelltypen im EAE-Modell beschrieben wurden, sollte analysiert werden, ob sich die *in vitro* beobachteten Effekte der verminderten Th1- und Th17-Differenzierung von *Nfatc1/C^{ΔSUMO}* CD4⁺ T-Zellen auch *in vivo* im EAE-Modell auswirken. Und ob das „Mehr“ an IL-2 positiv auf die Population an Tregs in der EAE wirkt. Hierzu wurden in *Nfatc1/C^{ΔSUMO}* Mäusen und in wildtypischen Kontrollgeschwistertieren eine aktive MOG₃₅₋₅₅-EAE induziert. In Abbildung 5.2.8 A sind zwei exemplarische (von insgesamt neun EAE-Experimenten mit gleicher Aussage) Graphen des klinischen *score* über die Zeit dargestellt. In beiden Experimenten wurde deutlich, dass die Gruppe der *Nfatc1/C^{ΔSUMO}* Mäuse einen reduzierten klinischen *score* gegenüber der Gruppe der *wild type* Mäuse aufwies. In dem rechten abgebildeten Graph einer insgesamt schwächer verlaufenden EAE wurde sogar ein verzögerter Beginn der EAE bei den *Nfatc1/C^{ΔSUMO}* Mäusen festgestellt (Abbildung 5.2.8 A). Weiterhin wurde untersucht, ob sich der abgeschwächte *score* auch in der Menge und Zusammensetzung der entzündlichen Infiltrate im ZNS-Gewebe niederschlägt. Hierzu wurden an der Krankheitsspitze Infiltrate aus dem ZNS von wildtypischen und *Nfatc1/C^{ΔSUMO}* Mäuse gewonnen und anhand einer Oberflächenfärbung von CD45, CD11b und CD4 die Populationen von Lymphozyten, Makrophagen und Mikrogliazellen im FACS analysiert (Abbildung 5.2.8 B).

Die Analyse der ZNS-Infiltrate zeigte keinen großen Unterschied in Anzahl an Lymphozyten (CD45⁺CD11b⁻), Makrophagen (CD25⁺CD11b⁺) und Mikrogliazellen (CD45^{low}CD11b^{low}). Es befanden sich sogar leicht signifikant mehr Lymphozyten im ZNS der *Nfatc1/C^{ΔSUMO}* Mäuse. Diese erhöhte Anzahl an Lymphozyten ging mit einer erhöhten Anzahl an CD4⁺ T-Zellen einher, welche in erhöhter Frequenz im ZNS von *Nfatc1/C^{ΔSUMO}* EAE-Mäusen zu detektieren waren (Abbildung 5.2.8 B).

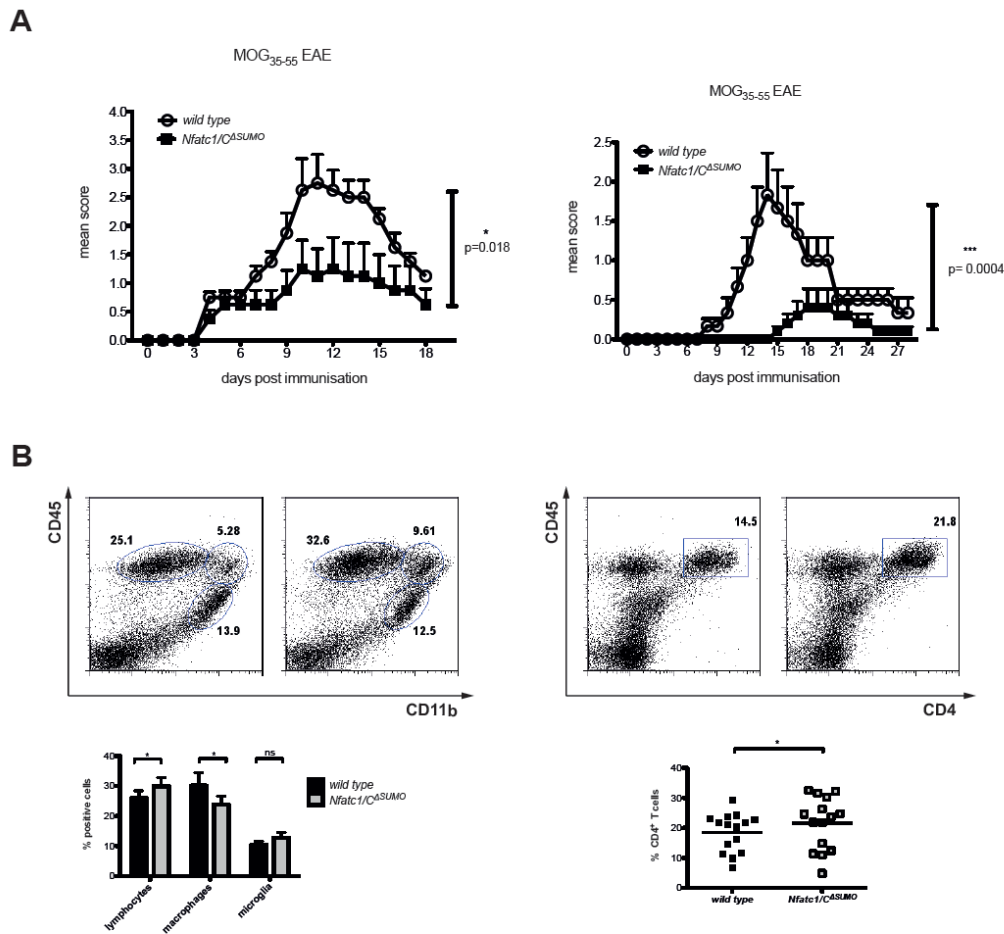


Abbildung 5.2.8 A-B: *Nfatc1/C^{ΔSUMO}* Mäuse zeigen eine abgeschwächte MOG₃₅₋₅₅-EAE im Vergleich zu wildtypische (*wild type*) Geschwistertieren.

(A) In wildtypischen und *Nfatc1/C^{ΔSUMO}* Mäusen wurde eine aktive EAE durch Immunisierung mit CFA/MOG₃₅₋₅₅ induziert. Dargestellt sind zwei repräsentative EAE-Score Graphen von mehreren EAE-Experimenten. Der mittlere Durchschnittsscore (*mean score*) der *Nfatc1/C^{ΔSUMO}* Mausgruppe ist signifikant niedriger im Vergleich zum *mean score* der *wild type* Geschwistertiere. Mann-Whitney-U-Test * $p<0.05$. (B) FACS Analyse von ZNS-Infiltraten aus wildtypischen und *Nfatc1/C^{ΔSUMO}* EAE-Mäusen mittels einer Oberflächenfärbung von CD11b und CD45.

Es konnte für die EAE in *Nfatc1/C^{ΔSUMO}* Mäusen ein erniedrigter klinischer *score* und auch ein verzögertes Auftreten von EAE-Symptomen nachgewiesen werden. Diese verminderte EAE korrelierte aber – im Gegensatz zu *Nfatc1^{fl/fl} x Cd4cre⁺* Tieren – nicht mit einer verminderten Anzahl an CD4⁺ T-Zellen im ZNS der Mäuse. In den *Nfatc1/C^{ΔSUMO}* EAE-Mäusen konnte vielmehr eine leicht erhöhte Anzahl an transmigrierten CD4⁺ T-Zellen im ZNS verglichen mit wildtypischen Wurfgeschwistern nachgewiesen werden.

5.2.1.2.2 Im ZNS von *Nfatc1/C^{ΔSUMO}* Mäusen befinden sich mehr protektive Tregs

In den *in vitro* Studien zur Abwesenheit der SUMOylierung von NFATc1/C konnte gezeigt werden (Abschnitt 5.2.1.1.3), dass IL-2, das vermehrt von *Nfatc1/C^{ΔSUMO}* CD4⁺ T-Zellen produziert wird, einen positiven Einfluss auf die Population von Tregs hatte. Interessanterweise war auch die Population an CD4⁺ T-Zellen im ZNS von *Nfatc1/C^{ΔSUMO}* Mäusen erhöht (Abschnitt 5.2.1.2.1). Daher sollte untersucht werden, ob sich auch *in vivo* im EAE-Modell mehr Tregs im ZNS der *Nfatc1/C^{ΔSUMO}* Mäuse detektieren lassen. Es ist im EAE-Modell bekannt, dass Tregs und das von ihnen produzierte IL-10 wichtig für die Beseitigung der ZNS-Entzündungsreaktion und damit für die Erholung der Mäuse von EAE-Symptomen ist^{129, 253}.

Dies führte zu einer genaueren Analyse der Population an CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T-Zellen im ZNS der EAE-Mäuse beider Gruppen. Hierzu wurden ZNS Infiltrate aus *wild type* und *Nfatc1/C^{ΔSUMO}* EAE-Mäusen zu verschiedenen Zeitpunkten der EAE gewonnen und mit Antikörpern gegen CD4, CD25 und Foxp3 für eine durchflusszytometrische Analyse gefärbt. In Abbildung 5.2.9 ist sowohl ein repräsentativer FACS-plot dieser FACS-Analyse der CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Population als auch die statistische Auswertung zu verschiedenen Zeitpunkten der EAE dargestellt. Wie zu erkennen ist konnte man im ZNS der *Nfatc1/C^{ΔSUMO}* Mäuse signifikant mehr Tregs nachweisen. Von Beginn an (d10 - d11) und über den gesamten Verlauf der EAE, d. h. bis Tag 26, konnte ein deutlich höherer prozentualer Anteil an Tregs im ZNS von *Nfatc1/C^{ΔSUMO}* Mäusen festgestellt werden (siehe Abbildung 5.2.9 A).

Zusätzlich zur FACS-Analyse sollte die erhöhte Anzahl an Tregs auch direkt im entzündlichen Gewebe evaluiert werden. Hierzu wurden jeweils aus wildtypischen und *Nfatc1/C^{ΔSUMO}* Mäusen das Rückenmark präpariert und Kryoschnitte angefertigt. Diese wurden dann für eine Immunfluoreszenzfärbung mit Antikörpern gegen CD4 und Foxp3 gefärbt. Für die Visualisierung der Infiltratregionen wurde DAPI zur Zellkernfärbung verwendet. In Abbildung 5.2.9 B sind die fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen gezeigt.

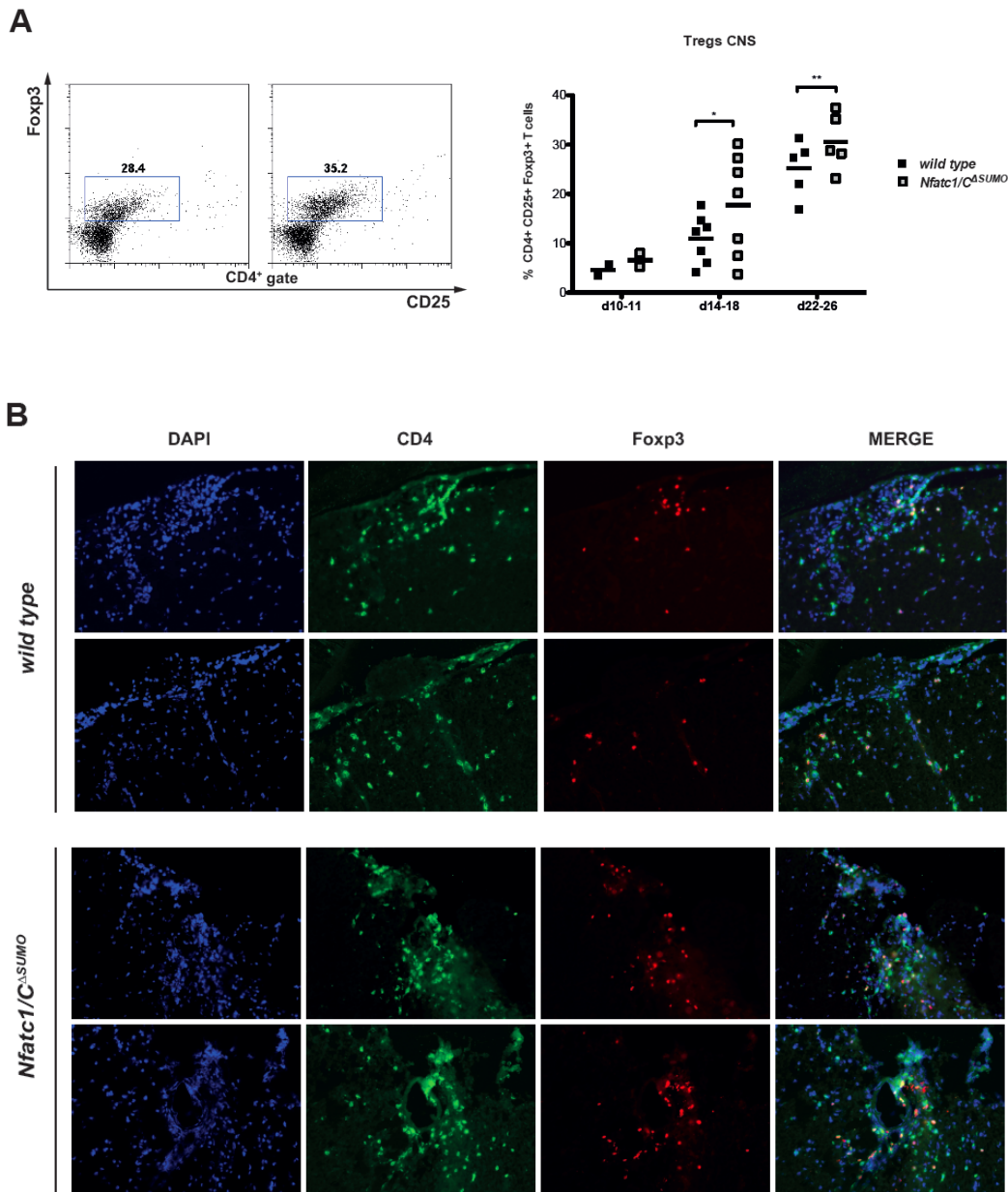


Abbildung 5.2.9 A-B: Während einer EAE befinden sich deutlich mehr Tregs im ZNS (CNS) von *Nfatc1/C^{ΔSUMO}* Mäusen als im ZNS von wildtypischen Geschwistertieren. (A) FACS Analyse von CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T-Zellen in Infiltraten aus EAE-Mäusen. Dargestellt sind ein repräsentativer FACS-plot (d 18 der EAE) sowie die statistische Auswertung der prozentualen Verteilung an CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T-Zellen im ZNS über den gesamten Verlauf der EAE. Student *t*-test **p*<0.05. (B) Immunfluoreszenzfärbung von CD4 und Foxp3 in Kryoschnitten von Rückenmark aus *wild type* und *Nfatc1/C^{ΔSUMO}* EAE-Mäusen.

Die durch DAPI erkennbaren Infiltratgrößen unterschieden sich zwischen *Nfatc1/C^{ΔSUMO}* und wildtypischen Präparaten nicht. Innerhalb dieser Bereiche befanden sich auch gleiche Mengen an CD4⁺ Zellen. Allerdings zeigten die Aufnahmen der Foxp3-Färbung eine deutliche Anhäufung an Foxp3⁺-Zellen in den Infiltraten der *Nfatc1/C^{ΔSUMO}* Mäuse verglichen mit wildtypischen Rückenmarksschnitten. Besonders klar wurde dies anhand der Überlagerung

der CD4 und Foxp3 Färbung (MERGE). Es waren wesentlich mehr CD4⁺ Foxp3⁺ Zellen im Rückenmarksgewebe von *Nfatc1/C^{ΔSUMO}* Mäusen nachzuweisen.

5.2.1.2.3 CD4⁺ T-Zellen, die nicht NFATc1/C nicht SUMOylieren können, sind weniger enzephalitogen

Da die FACS Analysen der Infiltrate ergaben, dass trotz verminderter EAE nicht weniger, sondern sogar leicht erhöhte Mengen an CD4⁺ T-Zellen im ZNS von *Nfatc1/C^{ΔSUMO}* Mäusen im Vergleich zu *wild type* Mäusen zu finden waren, sollte untersucht werden, ob das enzephalitogene Potenzial der CD4⁺ T-Zellen verändert war. Hierzu wurden Gesamtmilzzellen aus den erkrankten Tieren mit unterschiedlichen Konzentrationen an MOG₃₅₋₅₅ *in vitro* restimuliert. Dadurch proliferieren die MOG₃₅₋₅₅-spezifischen CD4⁺ T-Zellen und sekretieren Effektorzytokine als Antwort auf diese zweite Stimulation mit ihrem spezifischen Antigen. Die Proliferation wurde mit Hilfe des ³[H]-Thymidin-Einbaus gemessen, während die Sekretion von IL-2, IL-17A und IFN γ im Überstand dieser Reaktivierungskulturen mit ELISA bestimmt wurden. In Abbildung 5.2.10 sieht man, dass von MOG₃₅₋₅₅-spezifischen CD4⁺ T-Zellen aus *Nfatc1/C^{ΔSUMO}* Mäusen stark signifikant weniger IL-17A und IFN γ , während die IL-2-Sekretion leicht erhöht war, sezerniert wurden. Die MOG₃₅₋₅₅-spezifische Proliferation der CD4⁺ T-Zellen beider Mausgruppen zeigte dagegen keinen Unterschied, da sowohl wildtypische als auch *Nfatc1/C^{ΔSUMO}* CD4⁺ T-Zellen aufgrund der Restimulation mit MOG₃₅₋₅₅ gleichermaßen proliferierten.

A

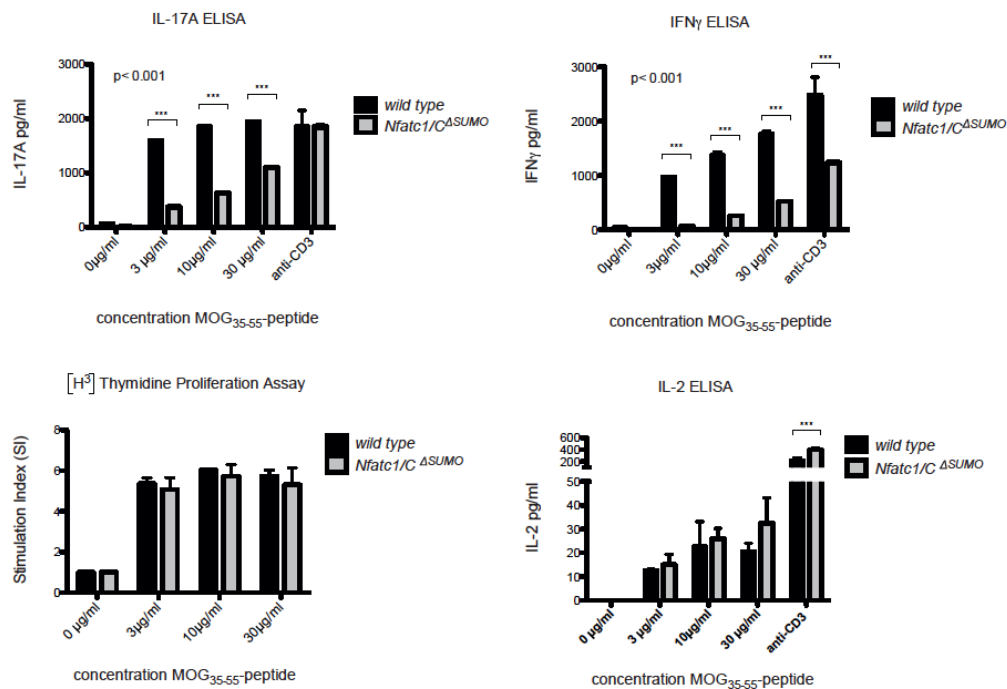


Abbildung 5.2.10: MOG₃₅₋₅₅-spezifische CD4⁺ T-Zellen von *Nfatc1/C^{ASUMO}* Mäusen sind weniger enzephalitogen.

Überstände einer MOG₃₅₋₅₅ Reaktivierungskultur von totalen Milzzellen wurden nach drei Tagen Inkubation mittels ELISA auf die Sekretion von IL-17A, IFN γ , und IL-2 von MOG₃₅₋₅₅ spezifischen CD4⁺ T-Zellen getestet. Ebenso wurde durch einen ³[H]-Thymidin-Einbau, die spezifische Proliferation auf die Restimulation mit unterschiedlichen Konzentrationen an MOG₃₅₋₅₅ gemessen. Student *t*-Test **p*<0.05.

Um zu klären, ob dieses verminderte pathogene Potential auch bei transmigrierten CD4⁺ T-Zellen im ZNS der *Nfatc1/C^{ASUMO}* Mäuse zu finden ist, wurden am Krankheitshöhepunkt der EAE von jeweils wildtypischen und *Nfatc1/C^{ASUMO}* Mäusen ZNS-Infiltrate gewonnen. CD4⁺ T-Zellen aus dem ZNS von *Nfatc1/C^{ASUMO}* Mäusen zeigten eine geringere Produktion von IFN γ und IL-17A sowie signifikant weniger GM-CSF. Auch die pathogene Population an IL-17A⁺IFN γ ⁺ Doppelproduzenten war signifikant reduziert (Abbildung 5.2.11 A und B).

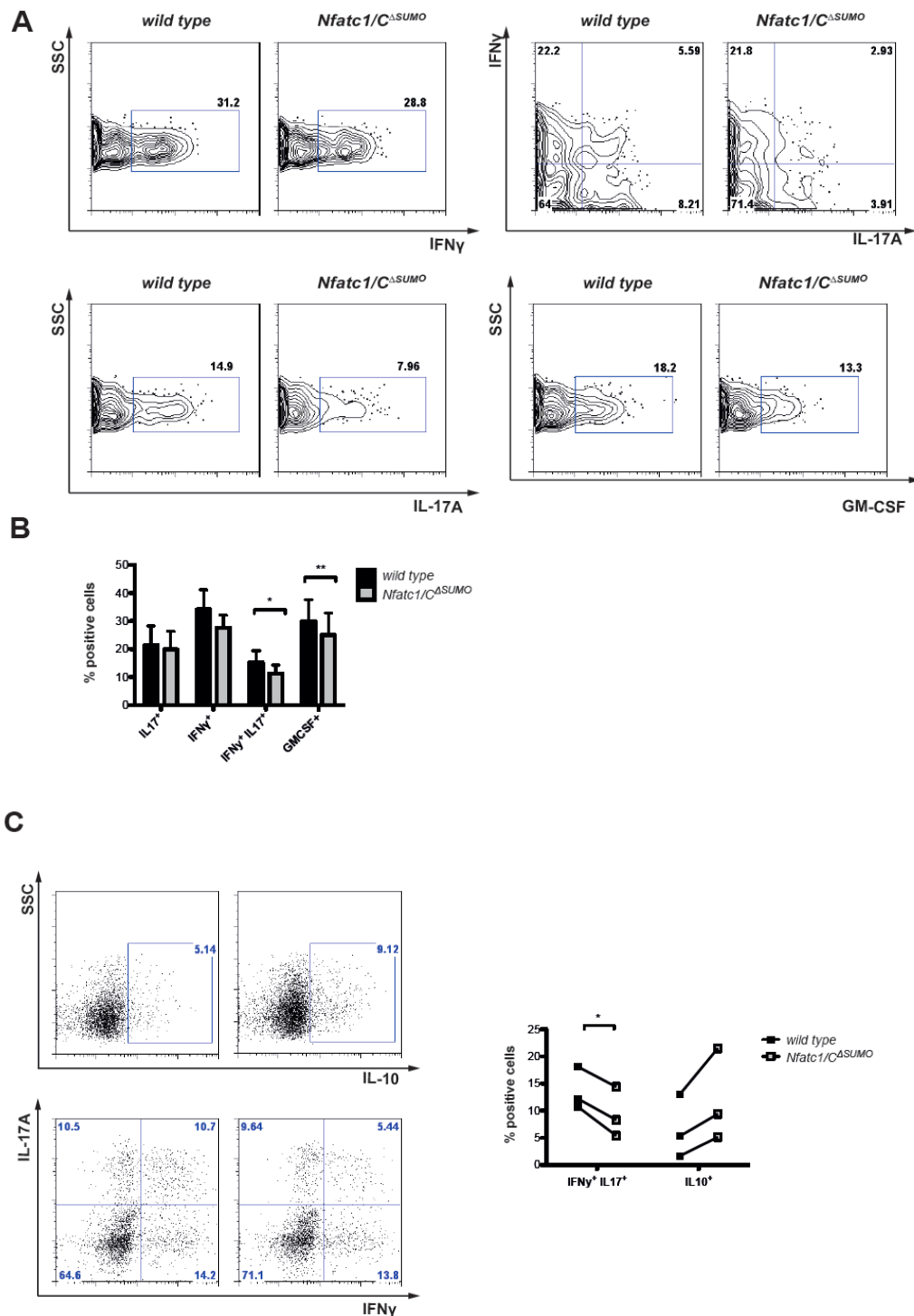


Abbildung 5.2.11 A-C: *Nfatc1/C^{ΔSUMO}* CD4⁺ T-Zellen im ZNS produzieren weniger pathogene Zytokine, dafür mehr protektives IL-10 als wildtypische (*wild type*) CD4⁺ T-Zellen.

Nach Isolation von ZNS-Infiltraten an der Krankheitsspitze der EAE von *Nfatc1/C^{ΔSUMO}* und *wild type* Mäusen wurde für eine intrazelluläre FACS-Analyse von IFN γ , IL-17A und GM-CSF zuerst eine Oberflächenfärbung von CD4 und anschließend eine intrazelluläre Färbung der Zytokine durchgeführt. Hierzu wurden die Infiltrate 5 h mit TPA/Iono in Anwesenheit von Brefeldin A und Monensin restimuliert. (A) Repräsentative FACS-plots der IFN γ -, IL-17A- und GM-CSF-Färbungen. (B) Statistische Auswertung aller intrazellulären Zytokinfärbungen. Student *t*-test **p*<0.05. (C) Dargestellt sind repräsentative FACS-plots, sowie die statistische Auswertung von intrazellulären IL-10-Färbungen von jeweils drei Mäusen der *Nfatc1/C^{ΔSUMO}* und *wild type* EAE. Student *t*-test **p*<0.05.

CD4⁺ T-Zellen aus *Nfatc1/C^{ΔSUMO}* Mäusen zeigten somit auch im *in vivo* Modell der EAE einen Defekt in der Produktion von Th1- und Th17-Effektorzytokinen. Zusätzlich zeigten bei der Restimulation mit dem MOG₃₅₋₅₅-Peptid die MOG-spezifischen CD4⁺ T-Zellen eine leicht erhöhte Sekretion von IL-2, was wiederum zu den *in vitro* Beobachtungen einer erhöhten IL-2 Produktion aufgrund der fehlenden SUMOylierung von NFATc1/C passt.

Nachdem sowohl anhand der FACS-Analyse als auch mittels Immunfluoreszenzfärbung nachgewiesen wurde, dass man im ZNS von *Nfatc1/C^{ΔSUMO}* EAE-Mäusen mehr Tregs findet, sollte genauer untersucht werden, ob diese auch einen protektiven Einfluss ausüben und somit zum verminderten klinischen Verlauf der EAE in den *Nfatc1/C^{ΔSUMO}* Mäusen beitragen. Ein Mechanismus, der im Kontext der suppressiven Eigenschaft von Tregs im EAE-Modell bekannt ist, ist die Sekretion des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10¹²⁹. Daher wurden CD4⁺ T-Zellen, die aus dem ZNS isoliert wurden, auf die Produktion des Treg-assoziierten anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 untersucht. Es ist bekannt, dass IL-10 besonders auf die Population der pathogenen IL-17A⁺IFNγ⁺-Doppelproduzenten wirkt bzw. für die Suppression von pathogenen Th17-Zellen benötigt wird^{29, 254, 255}. In Abbildung 5.2.11 C ist die FACS-Analyse der Population an CD4⁺ IL-10-Produzenten sowie der Doppelproduzenten von IL-17A und IFNγ gezeigt. In den Infiltraten der *Nfatc1/C^{ΔSUMO}* Mäuse ließen sich doppelt so viele IL-10-Produzenten als in *wild type* Mäusen und passend dazu eine Reduktion um die Hälfte an IL-17A⁺IFNγ⁺-Doppelproduzenten nachweisen.

Somit wurden in *Nfatc1/C^{ΔSUMO}* Mäusen über den gesamten Verlauf der EAE erhöhte Mengen an protektiven Tregs nachgewiesen, die aufgrund der Sekretion von IL-10 suppressiv auf die pathogene Population der Th17-Zellen und IL-17A IFNγ Doppelproduzenten wirkten.

5.2.1.2.4 Auch im passiven EAE-Modell sind *Nfatc1/C^{ΔSUMO}* CD4⁺ T-Zellen protektiv

Da es sich bei der *Nfatc1/C^{ΔSUMO}* Mauslinie um einen totalen *knock-in* handelt, betrifft der Verlust der SUMOylierung von NFATc1/C alle Körperzellen. Daher sollte die Rolle der CD4⁺ T-Zellen durch einen adoptiven Transfer geklärt werden, um *bystander*-Effekte von anderen Immunzellen, wie insbesondere von CD8⁺ und B-Zellen, in der EAE mit *Nfatc1/C^{ΔSUMO}* Mäusen auszuschließen. In dem verwendeten passiven EAE-Ansatz wurden CD4⁺ T-Zellen in *Rag1^{-/-}* Mäuse transferiert. *Rag1^{-/-}* Mäuse können aufgrund der fehlenden V(D)J-Rekombination keine reifen Lymphozyten entwickeln²⁵⁶. Um die passive EAE zu erleichtern, wurde auf eine weitere transgene Maus, die 2D2 Maus zurückgegriffen. Diese

Maus besitzt einen TCR, der spezifisch für das MOG₃₅₋₅₅-Peptid ist. Somit sind fast alle CD4⁺ T-Zellen dieser Maus MOG₃₅₋₅₅ spezifisch²²⁶. Diese Mäuse wurden mit *Nfatc1/C^{ΔSUMO}* Mäusen verpaart, um *2D2 x Nfatc1/C^{ΔSUMO}* Nachkommen zu generieren, die sowohl die fehlende SUMOylierung von NFATc1/C als auch den MOG₃₅₋₅₅ -spezifischen T-Zell-Rezeptor besitzen.

In Abbildung 5.2.12 A ist das Schema des durchgeführten adoptiven Transfers dargestellt. Aus *2D2* Geschwistertieren und aus *2D2 x Nfatc1/C^{ΔSUMO}* Mäusen wurden jeweils CD4⁺ T-Zellen isoliert und *in vitro* zu Th1- und Th17-Zellen drei Tage differenziert. An Tag drei wurden die Zellen geerntet und dann ein 1:1 Mix aus Th1- und Th17-Zellen der reinen *2D2* oder *2D2 x Nfatc1/C^{ΔSUMO}* Kultur in *Rag1^{-/-}* Empfängertiere *i.v.* injiziert.

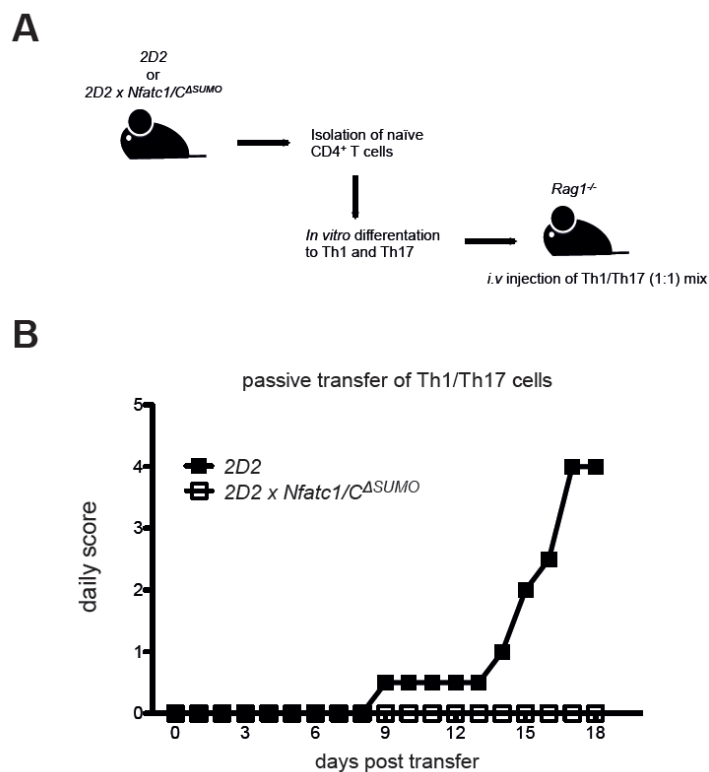


Abbildung 5.2.12: Ein passiver Transfer von *2D2 x Nfatc1/C^{ΔSUMO}* CD4⁺ T-Zellen führt zu keiner Ausprägung von EAE-Symptomen in *Rag1^{-/-}* Empfängertieren.

(A) Aus *2D2* und *2D2 x Nfatc1/C^{ΔSUMO}* Mäusen wurden CD4⁺ T-Zellen isoliert und für drei Tage *in vitro* zu Th1- und Th17-Zellen differenziert. An Tag drei wurden die Zellen jeweils geerntet 1:1 vermischt und dieser Mix aus Th1- und Th17-Zellen ($5,0 \times 10^6$ Zellen) in *Rag1^{-/-}* Empfängertiere *i.v.* gespritzt. (B) EAE-Scoring der *Rag1^{-/-}* Empfängertiere von *2D2* oder *2D2 x Nfatc1/C^{ΔSUMO}* CD4⁺ T-Zellen bis Tag 18 der passiven EAE.

Wie in Abbildung 5.2.12 B zu sehen ist entwickelte nur die *Rag1^{-/-}* Maus, die die *2D2* CD4⁺ T-Zellen bekommen hatte, eine EAE bis zu einem *score* von 4 (Hinterbein-Lähmung), während die *Rag1^{-/-}* Maus der empfangenen *2D2 x Nfatc1/C^{ΔSUMO}* CD4⁺ T-Zellen keinerlei

EAE-Symptome entwickelte. Somit ist der protektive Effekt, der in der normalen aktiven EAE mit *Nfatc1/C^{ΔSUMO}* Mäusen beobachtet wurde, auf die Population der CD4⁺ T-Zellen zurückzuführen, weil der adoptive Transfer von Th1 und Th17 CD4⁺ T-Zellen, denen die SUMOylierung von NFATc1/C fehlt, zu keinerlei Ausprägung von EAE-Symptomen, der Transfer von wildtypischen (2D2) Th1- und Th17-Zellen allerdings zu einer starken EAE führte.

6. Diskussion

6.1 Die Rolle von NFATc1 und NFATc2 bei der Immunpathogenese von EAE

Bei der EAE-Pathogenese spielt neben der primären Aktivierung von autoreaktiven CD4⁺ T-Zellen auch die Differenzierung zu pathogenen T-Helfer-Zellen eine zentrale Rolle. Insbesondere Th1- und Th17-Zellen mit ihren Leitzytokinen IL-17 und IFN γ gelten als die pathogenen Mediatoren der Entzündungsreaktion im ZNS, während den Th2-Zellen eine protektive Funktion zugesprochen wird^{234, 241, 257, 258}. Das Th2-Zytokin IL-4 sowie das immunsuppressive Zytokin IL-10 wirken in der EAE stark anti-inflammatorisch²⁵⁹. NFAT-Faktoren sind wichtige Faktoren, die nach TCR-Antigenkontakt und Ko-Stimulation zusammen mit Zytokinrezeptorsignalen, also aktivierten STAT-Proteinen, die Basis für die Differenzierung in verschiedene T-Helfer-Zelltypen darstellen. Eine ganze Reihe an T-Zell-Lymphokinen sind NFAT-Zielgene, d. h. die Expression von IL-2, IL-4, IL-3, IL-5, GM-CSF, IFN γ und TNF α wird durch NFAT reguliert^{260, 261}. Aber auch bei der primären Aktivierung und der Proliferation von aktivierten CD4⁺ T-Zellen sind NFAT-Faktoren entscheidend. So enthalten auch aktivierte autoantigen-spezifische CD4⁺ T-Zellen NFAT im Kern²⁶². Diese Kerntranslokation findet bei Übertritt ins ZNS statt, sobald die CD4⁺ T-Zellen von ZNS-residenten APCs reaktiviert werden²⁶². Für die beiden NFAT-Familienmitglieder NFATc1 und NFATc2 ist bekannt, dass diese sowohl nicht-redundante als auch redundante Funktionen besitzen. Grundsätzlich wird NFATc1 eine immunzellaktivierende und proliferationsfördernde Rolle zugeteilt, während NFATc2 eher eine repressive Rolle zugesprochen wird²⁰¹. Der Verlust von NFATc1 äußert sich in einer reduzierten Proliferation und Aktivierung von T-Zellen^{198, 200}. Dagegen ist für eine NFATc2-Defizienz eine Hyperproliferation und eine verstärkte Th2-Differenzierung von T-Zellen beschrieben worden^{197, 199, 263, 264}. Zusammen mit NFATc1 wirkt NFATc2 dagegen eher fördernd auf die Effektorfunktionen von Lymphozyten²⁰¹. Die vorliegende EAE-Studie mit *Nfatc1^{fl/fl} x Cd4cre⁺* und *Nfatc2^{-/-}* Mäusen zeigte in beiden Fällen eine signifikante Abmilderung der EAE-Symptome, allerdings konnte – interessanterweise – hierfür ein unterschiedlicher Mechanismus nachgewiesen werden. In Übereinstimmung zur differenziellen Funktion von NFATc1 und NFATc2 ergaben die Analysen der Zytokinproduktion von NFATc1- und NFATc2-defizienten CD4⁺ T-Zellen im ZNS, dass die

jeweilige Defizienz sich in einem unterschiedlichen Profil an Lymphokinen auswirkte. So konnten für den Verlust von NFATc2 erhöhte Mengen von IL-4-, IL-10- und IL-17A-Produzenten im ZNS nachgewiesen werden. Der Verlust von NFATc1 äußerte sich dagegen in einer allgemein erniedrigten Produktion an EAE-pathogenen Zytokinen. Der doppelte Verlust von NFATc1 und NFATc2 führte sogar zu einer vollständigen Protektion vor EAE. Aus dem ZNS isolierte *DKO* CD4⁺ T-Zellen zeigten einen massiven Defekt in der Zytokinproduktion. Dies bestätigt einen älteren Befund, dass *DKO* T-Zellen kaum noch IL-2, IFN γ , IL-4, IL-10, GM-CSF und TNF α nach primärer oder sekundärer Stimulation sezernieren²⁰¹.

Von NFATc1, insbesondere von seiner kurzen Isoform NFATc1/ α A, werden Gene reguliert, die für die Proliferation und das Überleben von aktivierten CD4⁺ T-Zellen wichtig sind^{188, 265}. So konnte für eine NFATc1-Defizienz in Lymphozyten, d. h. in T- und B-Zellen, gezeigt werden, dass diese einen starken Defekt in der Proliferation nach Aktivierung aufweisen¹⁹⁸. Übereinstimmend mit der Erwartung, dass in *Nfatc1^{fl/fl} x Cd4cre⁺* Mäusen CD4⁺ T-Zellen aufgrund des Verlustes von NFATc1 in ihrer Aktivierbarkeit reduziert sind, wurden weniger CD4⁺ T-Zellen im ZNS der Mäuse gefunden. Dies spricht für eine beeinträchtigte primäre Aktivierung von CD4⁺ T-Zellen nach Immunisierung mit dem MOG₃₅₋₅₅-Peptid. Auch eine zweite *in vitro* Stimulation mit dem MOG₃₅₋₅₅-Peptid NFATc1-defizienter CD4⁺ T-Zellen äußerte sich in einer stark verminderten Proliferation. Der Verlust von NFATc1 äußerte sich auch nach *in vitro* Stimulation naiver CD4⁺ T-Zellen mit anti-CD3/CD28 in einem starken Defekt der stimulationsabhängigen Proliferation. Dies wurde begleitet von einer verminderten Sekretion des proliferationsfördernden IL-2.

In B-Zellen der Milz resultiert die konditionelle Defizienz von NFATc1 ebenfalls in einem Proliferationsdefekt nach BCR-Stimulation¹⁵¹. In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass B-Zellen, denen NFATc1 fehlt, einen verminderten Calciumeinstrom nach Stimulation – begleitet von einer reduzierten Aktivierung der Phosphatase Calcineurin – aufweisen. NFATc1 scheint somit Einfluss auf seinen eigenen aktivierenden Signalweg zu nehmen, indem es in diesem Fall die Expression der Calcineurinuntereinheit A (CnA) durch direkte Bindung an das Gen der CnA β -Untereinheit *Ppp3cb* reguliert¹⁵¹. Für den konditionellen Verlust von NFATc1 in CD4⁺ T-Zellen konnte in der vorliegenden Arbeit ebenfalls ein verminderter Calciumeinstrom nach CD3-Kreuzvernetzung beobachtet werden. Somit wirkt in CD4⁺ T-Zellen NFATc1 wahrscheinlich ähnlich positiv verstärkend auf den Calciumsignalweg. Ebenso resultierte der generelle Aktivierungsdefekt aufgrund des Verlustes von NFATc1 neben der reduzierten Proliferation, IL-2-Sekretion und einem

verminderten Calciumeinstrom auch in einer verminderten Oberflächenexpression des Aktivierungsmarkers CD25, der α -Kette des IL-2 Rezeptors.

CD25 wird auf aktivierten CD4⁺ T-Zellen heraufreguliert, um autokrin durch IL-2/IL-2-Rezeptor-Interaktion ein Wachstumssignal zu vermitteln, das für die Expansion und Differenzierung von Effektorzellen sowie von regulatorischen Zellen benötigt wird²⁶⁶. Das *Cd25*-Gen besitzt *upstream* seines Promotors zwei Bindungsstellen für NFATc2 und NFATc1 und wird nach TCR-Aktivierung, wie z. B. durch anti-CD3 Stimulus in seiner Expression induziert^{199, 267, 268}. So wurde gezeigt, dass T-Zellen aus NFATc1-defizienten Mäusen eine starke Verzögerung in der Expression von CD25 nach TCR-Stimulation aufweisen²⁰⁰, was wiederum übereinstimmend mit dem generellen hypoproliferativen Phänotyp einhergeht. Auch eine Studie, in der gezeigt wurde, dass eine konstitutive aktive Form von NFATc1 zu einer erhöhten Expression von CD25 führt²¹², stützt die These, dass NFATc1 maßgeblich an der Regulation des *Cd25*-Gens beteiligt ist. Somit trägt nach *in vitro* Stimulation von NFATc1-defizienten CD4⁺ T-Zellen, die reduzierte Expression der hochaffinen Kette des IL-2 Rezeptors zusätzlich zum generellen Proliferationsdefekt durch eine Einschränkung des IL-2-vermittelten autokrinen Wachstumssignal bei.

Dieser generelle Defekt der Aktivierung von autoreaktiven CD4⁺ T-Zellen zeigte sich in *Nfatc2*^{-/-} Zellen nicht. Die MOG₃₅₋₅₅-induzierte Proliferation von wildtypischen und *Nfatc2*^{-/-} CD4⁺ T-Zellen erwies sich als gleich. In *Nfatc2*^{-/-} Mäusen konnte vielmehr in einigen Fällen eine Vergrößerung der Milz (Splenomegaly) (Daten nicht gezeigt), was ein Zeichen des eher hyperproliferativen Phänotyps von *Nfatc2*^{-/-} Mäusen ist²⁶⁴, beobachtet werden. Diese für *Nfatc2*^{-/-} Zellen beschriebene Hyperproliferation zeigte in der EAE aber keine Auswirkungen auf den Krankheitsverlauf. Man hätte anhand einer verstärkten Proliferation von autoreaktiven Zellen eine Verstärkung der EAE-Symptome vermuten können. Dies bestätigte sich anhand der MOG₃₅₋₅₅-Restimulation jedoch nicht. Vielmehr wird in *Nfatc2*^{-/-} Mäusen die Art der EAE-Immunantwort, aufgrund veränderter T-Helfer-Zellfunktionen, beeinflusst. Die EAE wurde in ihrem Verlauf positiv beeinflusst, weil die Produktion anti-inflammatorischer Lymphokine erhöht war. Das Zytokinmilieu autoreaktiver CD4⁺ T-Zellen ist ein entscheidender Faktor, der die Qualität der ZNS-Entzündungsreaktionen in eine krankheitsfördernde oder in eine protektive Richtung lenken kann.

Th1-Zellen und ihr Leitzytokin IFN γ gelten als pathogene Effektorzellen bei der EAE und MS. So korreliert die Menge an IFN γ mit der Stärke der EAE²³⁵, und Th1-Zellen können in adoptiven Transferexperimenten EAE auslösen¹¹⁶. Reduzierte Mengen von IFN γ aufgrund der NFATc1- und NFATc2-Defizienz wirkten sich dementsprechend positiv auf den

Krankheitsverlauf der EAE aus. Neben den Th1-Zellen sind in der EAE Th17-Zellen als eine weitere wichtige Krankheits-auslösende Population beschrieben. Allerdings gibt es in Bezug auf die Funktion der Th17-Zellen und insbesondere auf die Sekretion von IL-17A kontroverse Meinungen zur inflammatorischen Rolle. Zum einen sind Th17-Zellen als äußerst pathogene Population sowohl in der EAE als auch in der MS beschrieben^{72, 269}. Zum anderen gibt es aber auch genügend Studien die aussagen, dass IL-17A nicht essentiell für die Auslösung und Manifestierung der EAE ist²⁷⁰. Eine Überproduktion führt nicht zu einer stärkeren EAE²⁷¹. Zusätzlich erweist sich eine therapeutische Blockade von IL-17A als nicht sehr effizient, was für eine eher untergeordnete Rolle von IL-17A spricht¹²². Vielmehr ist das enzephalitogene Potenzial von Th17-Zellen durch andere Th17-Zytokine definiert. So gilt GM-CSF im EAE-Modell als besonders pathogen. Dieses Zytokin wird sowohl durch den „Master“-Transkriptionsfaktor ROR γ t der Th17-Zellen²³⁶ als auch durch IL-23 induziert²⁷², dem Zytokin, was Th17-Zellen verstärkt in die pathogene Richtung differenziert⁷². GM-CSF-defiziente Mäuse sind daher – im Gegensatz zu *Il17a*^{-/-} Tieren – komplett vor EAE geschützt^{271, 273}. Somit wirkten sich erhöhte Mengen an IL-17A und IL-17F in der *Nfatc2*^{-/-} EAE nicht nachteilig aus. Vielmehr konnte gezeigt werden, dass CD4⁺ T-Zellen im ZNS signifikant weniger GM-CSF und IL-22, ein weiteres Th17-Zytokin, produzierten. Zusätzlich wird insbesondere CD4⁺ T-Zellen, die sowohl IFN γ als auch IL-17A gleichzeitig sekretieren, ein ausgesprochen starkes enzephalitogenes Potential zugeschrieben^{77, 124}. Diese pathogene Population an Doppelproduzenten war sowohl in der EAE mit *Nfatc1*^{fl/fl} *x* *Cd4cre*⁺ als auch in der EAE mit *Nfatc2*^{-/-} Mäusen signifikant reduziert. Neben den pathogenen Th-Populationen gibt es aber auch protektiv wirkende. So wurde das Zytokin IL-4 und generell eine Th2-Immunantwort in der EAE als anti-inflammatorisch und schützend beschrieben^{239, 274}. Auch IL-10 ist ein Zytokin mit immunsuppressiver Wirkung^{275, 276}. Die erhöhten Mengen an IL-4 und IL-10 wirkten somit auch in der EAE mit *Nfatc2*^{-/-} Mäusen protektiv und trugen zur verminderten EAE entscheidend bei.

Neben der Beeinträchtigung der Proliferation von NFATc1-defizienten CD4⁺ T-Zellen, konnte auch ein Defekt der Th-Entwicklung und Zytokinproduktion nachgewiesen werden und dies sowohl nach *in vitro* Differenzierung als auch *in vivo* im EAE-Modell. So fand man im ZNS von *Nfatc1*^{fl/fl} *x* *Cd4cre*⁺ EAE-Mäusen reduzierte Mengen an IFN γ -, IL-17A-, GM-CSF-, IL-22- und IL-2-Produzenten. Das einzige Zytokin, welches durch den Verlust unverändert blieb, war TNF α . Übereinstimmend wird NFATc2 als der essentielle Transkriptionsfaktor zur Synthese von TNF α beschrieben²⁷⁷. Zusätzlich ist dieser Phänotyp in Bezug auf eine unveränderte TNF α -Produktion auch schon in *Nfatc1*^{-/-} *RAG2*^{-/-} T-Zellen

gezeigt worden²⁰⁰. Damit in Einklang steht die verminderte Anzahl an TNF α -Produzenten in *Nfatc2*^{-/-} EAE Mäusen. Für NFATc2 *knock-out* T-Zellen ist auch eine Reduktion von GM-CSF gezeigt worden²⁶⁴. Dieser Befund konnte in der EAE mit *Nfatc2*^{-/-} Mäusen bestätigt werden, da wie bereits erwähnt verminderte Mengen an GM-CSF Produzenten im ZNS vorlagen. NFATc2 spielt auch eine essentielle Rolle bei der Aktivierung der IFN γ -Genexpression und ist der bevorzugt und direkt bindende NFAT-Faktor^{209, 211}. T-Zellen, denen NFATc2 fehlt, zeigen unabhängig von der vermehrten Produktion von IL-4 einen tiefen Defekt in der Synthese von IFN γ ^{209, 210}. Diese Reduktion von IFN γ konnte anhand der *in vitro* Daten in der vorliegenden Arbeit belegt werden. Entscheidend ist aber, dass auch *in vivo* unter EAE-Bedingungen weniger IFN γ produziert wurde und kaum pathogene IL-17A⁺-IFN γ ⁺ Doppelproduzenten zu finden waren. Die Überproduktion von IL-4 in NFATc2^{-/-} Mäusen ist bereits aus früheren Studien bekannt. NFATc2-defiziente T-Zellen zeigen eine überschießende Th2-Antwort mit einer Überproduktion an IL-4 und auch IL-10^{216, 263, 264}. Die EAE-Daten zum Verlust von NFATc2 bestätigen diese älteren Beobachtungen. So konnten erhöhte Menge an CD4⁺ IL-4- und IL-10-Produzenten im ZNS von *Nfatc2*^{-/-} Mäusen nachgewiesen werden. Bisher gibt es aber keine eindeutigen Daten, die diese Überproduktion an Th2-Lymphokinen in NFATc2-defizienten Zellen erklären. Zum massiven Th2-Phänotyp von NFATc2 *knock-out* Mäusen wird diskutiert, ob möglicherweise mehr oder auch eine unkontrollierte NFATc1-Bindung am *Il4* Promotor vorliegt^{203, 206}. NFATc1 nimmt nämlich eine wichtige Rolle bei der Ausprägung einer Th2-Antwort ein, denn NFATc1-defiziente T-Zellen zeigen einen starken Defekt in der IL-4-Produktion^{198, 200}. Die zentrale Rolle von NFATc1 bei der Th2-Differenzierung wird durch den doppelten Verlust von NFATc1 und NFATc2 deutlich, da dies in einer kompletten Aufhebung der IL-4-Produktion resultiert²⁰¹. Bisher konnte aber nicht eindeutig nachgewiesen werden, ob tatsächlich erhöhte Mengen von NFATc1 in NFATc2^{-/-} CD4⁺ T-Zellen die Überproduktion von IL-4 fördern. Interessanterweise wurde in der vorliegenden Arbeit eine erhöhte Menge an NFATc1 im Kern von NFATc2-defizienten *in vitro* differenzierten CD4⁺ T-Zellen gefunden. Nur eine weitere Studie zeigt ebenfalls mehr NFATc1 in CD4⁺ T-Zellen²⁷⁸. Hier wurde aber nicht der nukleäre Gehalt, sondern nur die totale Menge an NFATc1 in CD4⁺ T-Zellen betrachtet²⁷⁸. Durch den Nachweis von mehr NFATc1 im Kern in der vorliegenden Arbeit, kann somit der Effekt der vermehrten IL-4-Synthese in CD4⁺ T-Zellen im ZNS durchaus auf eine erhöhte transkriptionelle Aktivität von NFATc1 zurückgeführt werden. Zusätzlich kann das Fehlen einer repressiven Funktion von NFATc2 auf die Expression des *Il4*-Gens²¹⁶, zur erhöhten IL-4-Synthese beitragen. Diese Annahme kann durch Studien zur unterschiedlichen

Regulation der Kerntranslokation von NFATc1 und NFATc2 aufgrund der Stärke der TCR-Signalaktivierung und die jeweilige Verfügbarkeit auf NFAT-Zielgene gestützt werden²⁰⁶. So bewirken Antigenpeptide mit schwacher Affinität/Avidität eine frühe IL-4-Synthese und somit eine Th2-Entwicklung, während starke und lang andauernde TCR-Signale die Produktion von IFN γ und so eine Th1-Differenzierung fördern^{206, 279}. Eine schwache und transiente TCR-Aktivierung reicht nicht für eine Translokation von NFATc2 in den Kern aus, wodurch unter diesen Bedingungen, hervorgerufen vom auto-regulativen *feedback loop* von NFATc1, eine Dominanz von NFATc1 vorliegt¹⁸⁸. Dies führt dann letztendlich zur frühen IL-4-Synthese durch die Bindung von NFATc1 an das *Il4*-Gen²⁰⁶. Dagegen erlauben starke TCR-Signale eine vermehrte Translokation von NFATc2, welches dann möglicherweise als Repressor^{206, 216} die frühe IL-4 Synthese sowie die Th2-Entwicklung inhibiert und gleichzeitig aber positiv die IFN γ -Synthese induziert²⁰⁶. Durch die nachgewiesene erhöhte Menge an NFATc1 im Kern NFATc2-defizienter CD4⁺ T-Zellen ergibt sich daher zusätzlich zur fehlenden Repression durch NFATc2 eine Heraufregulation, bzw. Verstärkung der IL-4 Synthese.

Allerdings beobachtet man in NFATc2^{-/-} Zellen bei Primärstimulation eine erniedrigte IL-4-Expression, was dafür spricht, dass das *Il4*-Gen neben NFATc1 auch ein Zielgen von NFATc2 ist^{216, 264}. Möglicherweise erfolgt im Falle der *Il4*-Expression die negative Wirkung erst durch hohe NFATc2-Konzentrationen im Kern, was erst bei einer sekundärer Stimulation auftritt, oder NFATc2 wirkt über einen Ko-Repressor²¹⁶, der erst bei sekundärer Stimulation hinzugezogen oder induziert wird.

Im EAE-Modell konnte für NFATc2-defiziente CD4⁺ T-Zellen neben der bereits bekannten erhöhten Produktion von IL-4 auch eine erhöhte Produktion von IL-17A nachgewiesen werden. Interessanterweise ist auch für die Differenzierung von Th17-Zellen, ähnlich wie für Th2-Zellen, beschrieben worden, dass niedrigere TCR-Signalstärken zu einer erhöhten Synthese von IL-17 führen²⁰⁷. Grundlage hierfür ist eine NFATc1-Bindung an die proximale Region des *IL17*-Promotors, die nur unter schwachen Signalstärken beobachtet wurde²⁰⁷. Nach schwacher TCR-Aktivierung könnte auch bei der Th17-Entwicklung NFATc1 als dominanter Faktor die IL-17-Synthese induzieren, da NFATc2 möglicherweise nicht ausreichend im Kern vorhanden ist. Dass schwache TCR-Signale die *Il17a*-Expression inhibieren, wie in einer anderen Studie dagegen gezeigt wurde²¹⁷, scheint dem zu widersprechen. Allerdings wurde dieser Defekt in *Itk*^{-/-} CD4⁺ T-Zellen beobachtet, in denen die TCR-Signalaktivierung so stark eingeschränkt ist, dass kaum NFATc1 in den Kern transloziert wird. NFATc1 ist aber für die Bindung und Induktion des *Il17a*-Gens

notwendig²¹⁷. So wurde eine Inhibition der *Il17a*-Expression, durch den Calcineurin-Inhibitor FK506 sowie aufgrund der ITK-Defizienz mit einer hyperaktiven Form von NFATc1 aufgehoben²¹⁷. Die Unfähigkeit von NFATc1 unter starken TCR-Signalbedingungen an den *IL17*-Promotor zu binden, wurde so diskutiert, dass NFATc1 unter diesen Bedingungen mit anderen transkriptionellen Partnern als unter schwachen TCR-Signalen interagiert²⁰⁷. Allerdings könnte, anhand der Erkenntnisse zur differentiellen Regulation der Th1- und Th2-Zellentwicklung durch NFATc2 und NFATc1 in Abhängigkeit von der Stärke des TCR-Signals, auch für die Th17-Differenzierung ein ähnlicher negativer Mechanismus für NFATc2 vorliegen, der unter sekundärer oder andauernder Stimulation, wie es in der EAE der Fall ist, besonders zum Tragen kommt. Passend dazu zeigt eine Studie mit einer konstitutiv aktiven Form von NFATc2, dass NFATc2 prinzipiell auch an distale Elemente des *Il17*-Gens bindet. Diese hyperaktive Form von NFATc2 bewirkt allerdings nur unter *in vitro* Bedingungen eine Zunahme der IL17-Synthese²¹⁹. Unter EAE-Bedingungen dagegen, zeigt sich eine reduzierte Menge an IL-17²¹⁹. Dieser Effekt ließe sich mit einer repressiven Rolle von NFATc2 nach sekundärer Stimulation, ähnlich wie beim *Il4*-Gen, erklären. In der vorliegenden Arbeit wurde allerdings auch unter *in vitro* Bedingungen eine erhöhte Synthese von IL-17A gezeigt. Dieser Widerspruch zur Studie von Ghosh *et al.* erklärt sich möglicherweise dadurch, dass die künstliche Hyperaktivität von NFATc2 die IL-17A-Synthese induziert, während das normalerweise von NFATc1 bewerkstelligt wird. Wie schon erwähnt wurde, benötigen Th17-Zellen schwache TCR-Signale. Unter diesen Bedingungen liegt kaum NFATc2 sondern vermehrt NFATc1 im Kern vor. Passend dazu konnte in der vorliegenden Arbeit in Th17-Zellen der *Nfatc2*^{-/-} Mäuse mehr NFATc1 im Kern nachgewiesen werden. Für NFATc1 als entscheidender Transkriptionsfaktor spricht, dass NFATc1-defiziente CD4⁺ T-Zellen in der EAE einen drastischen Defekt in der IL-17A-Produktion zeigten. Auch die *in vitro* Differenzierung zu Th17-Zellen von NFATc1-defizienten CD4⁺ T-Zellen war stark eingeschränkt. Dieser *in vitro*-Defekt von Th17-Zellen aufgrund des Fehlens von NFATc1 konnte auch in einer weiteren Arbeit aus unserem Labor gezeigt werden¹⁹⁴. Zusätzlich äußerte sich im EAE-Modell der doppelte Verlust von NFATc1 und NFATc2 in einer massiven Störung der IL-17A-Synthese. Die Überproduktion von IL-17A in *Nfatc2*^{-/-} CD4⁺ T-Zellen kommt somit aufgrund des gleichzeitigen Fehlens von NFATc1 nicht zum Tragen. Dies unterstreicht die zentrale Rolle von NFATc1 bei der Th17-Entwicklung.

Da sowohl IL-4 als auch IL-10 und IL-17A in *Nfatc2*^{-/-} CD4⁺ T-Zellen heraufreguliert war und bei der Regulation aller dieser drei Zytokine der Transkriptionsfaktor IRF4 beteiligt ist^{220, 221}, wurde analysiert, ob dieser als weiterer Faktor für die vermehrte Synthese in Frage

kommt. In *in vitro* differenzierten CD4⁺ NFATc2-defizienten T-Zellen konnten in der vorliegenden Arbeit neben mehr NFATc1 auch erhöhte Mengen IRF4 – und zwar besonders unter Th2- und Th17-Bedingungen – nachgewiesen werden, was zusätzlich verstärkend auf die Expression von IL-4 und IL-10 in Th2-Zellen²²¹ und IL-17A in Th17-Zellen²²⁰ wirken sollte. Da IRF4 in beiden Fällen der T-Helfer-Zellentwicklung wichtig ist und transkriptionell sowohl mit NFATc1 als auch mit NFATc2 zusammenwirken kann^{59, 221} wird vermutet, dass IRF4 über NFAT-vermittelte TCR-Signale zur Th17-Differenzierung beiträgt²⁸⁰. Die vorliegende Arbeit zeigt anhand von ChIP-Bindungsstudien unter Th17-Bedingungen eine erhöhte Bindung sowohl von NFATc1 am *Il17a*-Promotor als auch in der 5' Region des *Irf4*-Gens. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass in CD4⁺ T-Zellen IRF4 nach TCR-Stimulation ebenso wie NFATc1 induziert wird. Da eine Inhibition von NFAT zum einen mit CsA und zum anderen mit dem NFAT-spezifischen Inhibitor 11R-VIVIT ebenso die Produktion von IRF4 blockierte, konnte zum ersten Mal eine direkte NFAT-Regulation der *Irf4*-Expression nachgewiesen werden. IRF4 wirkt demnach nicht nur im Kontext mit NFATc1 bei der Induktion der Th17-Zelllinie verstärkend zusammen, sondern wird auch durch NFATc1 selbst induziert. Somit waren zwei prominente Th17-fördernde Faktoren –NFATc1 und IRF4 – in *Nfatc2*^{-/-} CD4⁺ T-Zellen im Überschuss vorhanden, was die Produktion von IL-17A förderte.

Zusammengefasst konnte gezeigt werden, dass sich sowohl der Verlust von NFATc1 als auch von NFATc2 positiv auf den Krankheitsverlauf der EAE auswirkte. NFATc1 und NFATc2 besitzen dabei unterschiedliche Funktionen in Bezug auf die Effektordifferenzierung und Zytokinproduktion von CD4⁺ T-Zellen, die sich aber in der Summe ergänzen. Dies wurde anhand der totalen Resistenz von *DKO* Mäusen auf die EAE-Entwicklung offensichtlich. Sowohl beim konditionelle Verlust von NFATc1 in T-Zellen als auch beim totalen Verlust von NFATc2 lagen diese Effekte auf Seite der CD4⁺ T-Zellen. In beiden Fällen war die Menge an CD8⁺ T-Zellen und B-Zellen im ZNS unverändert, d. h. die Reduktion der Immunpopulation lag nur auf Seite der CD4⁺ T-Zellen. Die Beobachtungen in der EAE für den totalen *knock-out* von NFATc2 konnte mit einer EAE von Knochenmarkschimären, die ausschließlich *Nfatc2*^{-/-} CD4⁺ T-Zellen besaßen, bestätigt werden. Somit sind *bystander*-Effekte aufgrund des Fehlens von NFATc2 in anderen Immunzellen unwahrscheinlich. Des weiteren wurde sichergestellt, dass die BHS, wenn sie aus *Nfatc2*^{-/-} zervikalen Endothelzellen gebildet wird, in ihrer Funktion der von wildtypischen Mäusen entspricht. Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass beide NFAT-Faktoren, NFATc1 und NFATc2, in CD4⁺ T-Zellen entscheidend zur Autoimmunantwort in einer EAE beitragen.

6.1.1 Der Verlust von NFATc1 und NFATc2 mildert die Stärke von EAE – NFAT-Inhibition als möglichen therapeutischen Ansatz in Multipler Sklerose?

Da die Defizienz von NFATc1 und NFATc2 eine protektive Wirkung auf die Ausbildung und Krankheitsstärke der EAE zeigte und die Funktion von Tregs durch den Verlust nicht beeinträchtigt wird¹⁹⁴, bietet die Inhibition von NFAT-Faktoren, insbesondere von NFATc1 und NFATc2 einen interessanten therapeutischen Ansatz zur Behandlung der MS. Eine Möglichkeit wäre die Blockade der Interaktion von Calcineurin mit NFAT, um so die wichtige aktivierende Dephosphorylierung der NFAT-Proteine zu verhindern. Hierzu gibt es bereits Studien zu einem synthetischen Peptid, das kompetitiv die Bindung von NFAT an Calcineurin blockiert. Das sogenannte VIVIT-Peptid wurde anhand von Strukturanalysen zur P_xI_xIT-Interaktionsequenz der NFAT-Proteine mit Calcineurin synthetisiert und wird mit höherer Affinität von Calcineurin gebunden als NFAT-Proteine¹⁸⁵. Dies hat gegenüber den beiden gängigen Immunsuppressiva zur Hemmung der NFAT-Aktivität, CsA und FK506, den Vorteil, dass dabei die katalytische Aktivität von Calcineurin nicht inhibiert wird, sondern nur spezifisch die Interaktion mit NFAT-Faktoren²⁸¹. So konnte gezeigt werden, dass VIVIT spezifisch NFAT-Zielgene inhibiert, wie IL-2, IL-13 und GM-CSF, dagegen aber andere CsA-sensitive Gene, wie TNF β und Lymphotoxin- β , unbeeinflusst bleiben¹⁸⁵. CsA und FK506 rufen, da sie eben neben NFAT auch weitere Calcineurin-nachgeschaltete Signalwege inhibieren, starke Nebenwirkungen wie Nierenschäden, Bluthochdruck und maligne Transformationen hervor. Diese Nebenwirkungen sind im Tierversuch für VIVIT bisher nicht beschrieben worden. Auch in hohen Dosen zeigte sich keine Toxizität²⁸². Von VIVIT gibt es zellpermeable Varianten, die in mehreren *in vivo* Anwendungen zur Inhibition der NFAT-Funktion wirksam eingesetzt wurden. Die Zellpermeabilität und damit die Möglichkeit einer systemischen Gabe kann durch das Hinzufügen von elf Argininresten (11R-VIVIT)^{186, 282} oder dem Anhängen von Sequenzen, die von Transkriptionsfaktoren abgeleitet sind (SIM-2-VIVIT)²⁸³ erreicht werden. Für die *in vivo* Gabe von VIVIT wurde gezeigt, dass dies ein verlängertes Überleben von allogenen Inselzell-Transplantaten im Mausmodell hervorruft¹⁸⁶ und erfolgreich die NFAT-Aktivität in einem *in vivo* Modell für Herzhypertrophie inhibiert²⁸². In einer weiteren Studie konnte belegt werden, dass VIVIT die Zytokinproduktion von Makrophagen durch die Blockade von NFAT inhibiert und abmildernd auf eine experimentell hervorgerufene Kolitits wirkt²⁸⁴. Für den therapeutischen Einsatz von NFAT-Inhibitoren ist auch die spezifische Blockade von einzelnen NFAT-Faktoren von Interesse, da diese

innerhalb einer Immunantwort unterschiedliche Rollen einnehmen. Insbesondere die alleinige Blockade von NFATc2 erscheint besonders sinnvoll, da somit kein genereller Defekt der Funktion und Aktivierung von CD4⁺ T-Zellen erzeugt würde. Eine therapeutische Inhibition von NFATc1 würde zusätzlich nur die Entzündungsparameter senken, während das Ausschalten von NFATc2 verpricht, eine protektive Th2-Antwort zu erzeugen. So gibt es auch in der MS therapeutische Ansätze die eine Verschiebung von einer pro-inflammatorischen Th1-Antwort hin zu einer protektiven Th2-Immunantwort bewirken sollen. Zu nennen ist hier die Therapie mit Copaxone (Glatirameracetat), das eine Th2-Antwort mit der Produktion von IL-4 und gleichzeitig der des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 hervorruft^{285, 286}. Wirkungsmechanismus ist das Hervorrufen eines schwachen TCR-Stimulationssignals, was zu weniger Verfügbarkeit von NFATc2 im Kern²⁰⁶ und zur Förderung einer Th2-Antwort führt²⁸⁷.

Die Blockade von NFATc1 könnte außerdem die Gefahr von opportunistischen Infektionen in sich bergen, da CD4⁺ T-Zellen so in ihrer Funktion eingeschränkt wären, dass möglicherweise fakultativ pathogene Erreger nicht effektiv bekämpft werden könnten. Das wäre auch der Fall bei einer gleichzeitigen Blockade von NFATc1 und NFATc2, da hier CD4⁺ T-Zellen komplett in der Effektorfunktion eingeschränkt sind. Hierzu passt eine Studie von zwei pädiatrischen Patienten mit dem SCID-Syndrom (*severe combined immunodeficiency*, SCID), die zeigte, dass die T-Zellen dieser Patienten massive Aktivierungs- und Effektordefekte mit einer eingeschränkten Fähigkeit der Zytokinproduktion aufweisen. Dies wird durch eine unzureichende Dephosphorylierung und damit nukleären Translokation von NFAT-Faktoren erreicht²⁶⁰. Patienten mit diesem Syndrom sind sehr anfällig für virale und bakterielle sowie Pilz-Infektionen²⁸⁸.

Es stellt sich somit die Frage, wie eine spezifische Inhibition einzelner NFAT-Faktoren bewirkt werden kann. Für das VIVIT-Peptid wurde gezeigt, dass es die Interaktion mit Calcineurin und somit die Dephosphorylierung von NFATc1, NFATc2 und NFATc3 und vor allem die Kerntranslokation von NFATc2 blockiert²⁸¹. Somit inhibiert es wahrscheinlich stärker die Funktion von NFATc2 als von NFATc1 und NFATc3. Mittlerweile ist bekannt, dass neben dem N-terminalen PxIxIT-Motiv ein weiteres Motiv am C-Terminus von NFAT-Faktoren zur Interaktion mit Calcineurin benötigt wird, welches anhand seiner Aminosäure-Konsensussequenz LxVP bezeichnet wird^{289, 290}. Dieses Motiv ist nur moderat zwischen den einzelnen NFAT-Faktoren konserviert, und Calcineurin besitzt für die einzelnen LxVP-Motive von NFATc1 und NFATc2 eine unterschiedlich starke Affinität. Das bewirkt eine effizientere Bindung von NFATc1 an Calcineurin als NFATc2²⁸⁹. Insgesamt wurde für die

LxVP-Motive nachgewiesen, dass diese effektiver als die PxIxIT-Motive mit Calcineurin interagieren. Synthetische LxVP-Peptide inhibieren nicht nur die NFAT-Calcineurin-Interaktion sondern auch die Phosphatase Aktivität von Calcineurin²⁸⁹. Die Tatsache, dass die verschiedenen NFAT-Faktoren unterschiedliche PxIxIT und LxVP-Motive zur Interaktion mit Calcineurin benutzen ermöglicht synthetische Peptide anhand dieser Motive zu generieren, die spezifisch – oder wenigstens präferentiell – die Inhibition eines einzelnen NFAT-Faktors hervorrufen. So wurde gezeigt, dass ein chimäres NFATc2-Protein, welches das LxVP-Motiv von NFATc1 besitzt, mit höherer Affinität von Calcineurin gebunden wird als wildtypisches NFATc2²⁸⁹. Leider kommen die Calcineurin-Bindungsmotive PxIxIT und LxVP auch in anderen Proteinen, neben den NFAT-Faktoren, vor, weshalb z. B. die beiden endogenen Calcineurin-Inhibitoren AKAP79 und Cabin-1 auch durch synthetische Peptide inhibiert werden. Allerdings könnte auch hier anhand von genauen Strukturanalysen und Veränderungen einzelner Aminosäuren die Interaktion von Calcineurin mit NFAT-Inhibitoren verbessert und spezifischer gemacht werden. Eine einzelne ersetzte Aminosäure von Calcineurin blockiert beispielsweise spezifisch die Interaktion mit NFAT, aber nicht mehr mit AKAP oder Cabin-1^{290, 291}. Es gibt also Möglichkeiten NFAT-Faktoren spezifisch in ihrer Funktion zu inhibieren und dies selektiv für einzelne Familienmitglieder zu generieren. Inwieweit dies therapeutisch angewendet werden kann, ist anhand von *in vivo* Tierversuchsstudien mit dem VIVIT-Peptid erfolgreich getestet worden. Zusätzlich dazu sollten in Zukunft aber Studien zur spezifischen Blockade einzelner NFAT-Faktoren durchgeführt werden. Prinzipiell ist die Blockade von NFAT, insbesondere die einzelner Familienmitglieder, ein therapeutischer Ansatz mit hohem Potenzial.

6.2 Der Einfluss der SUMOylierung von NFATc1/C auf eine CD4⁺ T-Zell-vermittelte (Auto-) Immunantwort

In einer Studie zum funktionellen Unterschied der langen und kurzen Isoform von NFATc1 konnte gezeigt werden, dass sowohl die kurze Isoform NFATc1/A als auch die lange NFATc1/C grundsätzlich die Expression von IL-2 transaktivieren¹⁹¹. Allerdings kann die lange Isoform durch eine spezielle posttranslationale Proteinmodifikation, die SUMOylierung, in dieser Funktion beeinflusst werden. So wirkt SUMOyliertes NFATc1/C nicht mehr induzierend, sondern reprimiert die Expression des *Il2*-Gens¹⁹¹. Interessanterweise werden Effektorzytokine, wie in dieser Studie für IFN γ und IL-13 gezeigt wurde, aufgrund

der SUMOylierung verstärkt exprimiert¹⁹¹. Mit Hilfe unserer neuen *Nfatc1/C^{ΔSUMO}* Maus konnte nun in der vorliegenden Arbeit die Rolle der SUMOylierung *in vivo* untersucht werden. Übereinstimmend mit den *in vitro* Transfektionsdaten sekretieren naive *ex vivo* CD4⁺ T-Zellen – sobald die SUMOylierung von NFATc1/C durch die Mutation der beiden wichtigen Lysine K702 und K914 der beiden C-terminalen SUMOylierungsmotive verhindert wird – im Vergleich zu wildtypischen CD4⁺ T-Zellen nach Stimulation vermehrt IL-2. Die SUMOylierung von NFATc1/C stellt somit auch *in vivo* einen Regulationsmechanismus der *Il2*-Genexpression dar. Bemerkenswerterweise zeigte sich die erhöhte Produktion von IL-2 in *Nfatc1/C^{ΔSUMO}* CD4⁺ T-Zellen ebenfalls in *in vitro* differenzierten Th1- und Th17-Zellen. Die beiden jeweiligen Effektorzytokine, IFN γ und IL-17A, waren dagegen reduziert. Dies ist in Übereinstimmung mit vorhergehenden Daten, die zeigten, dass die SUMOylierung von NFATc1/C verstärkend auf die Expression von Effektorzytokinen wirkt und daher umgekehrt eine Blockade der SUMOylierung in einer reduzierten Synthese dieser resultiert¹⁹¹. Für IL-2 sind wichtige regulative Eigenschaften innerhalb einer Immunreaktion beschrieben worden. So inhibiert IL-2 zum einen die Th17-Zellentwicklung^{246, 250, 292} und fördert zum anderen die Expansion von Tregs³⁵. Die Blockade der Th17-Entwicklung durch IL-2 erfolgt über verschiedene Mechanismen. IL-2 aktiviert STAT5, das zusammen mit STAT3 – das durch das Th17-Differenzierungszytokin IL-6 aktiviert wird – um die Bindung am *Il17a*-Gen konkurriert^{246, 292}. Durch Bindung von STAT5 wird die Transkription von *Il17a* inhibiert^{246, 292}. Zusätzlich induziert IL-2 T-bet, und für eine retrovirale Transduktion von T-bet konnte eine Blockade der Th17-Zelldifferenzierung gezeigt werden²⁹³. Des Weiteren blockiert T-bet die über Runx1 vermittelte Aktivierung des ROR γ t-Gens⁴⁷, dem „Master“-Transkriptionsfaktor der Th17-Zelllinie⁶⁵. In Übereinstimmung zu dem inhibierenden Effekt von IL-2 auf Th17-Zellen zeigten Antikörperblockaden einen tatsächlichen Effekt der vermehrten IL-2-Produktion in Kulturen von *Nfatc1/C^{ΔSUMO}* CD4⁺ T-Zellen, da dadurch die IL-17A-Produktion auf „normale“ Mengen angehoben werden konnte. Dieser extrinsische Effekt des IL-2 von *Nfatc1/C^{ΔSUMO}* CD4⁺ T-Zellen zeigte sich im Falle der Th1-Differenzierungskultur nicht, obwohl auch für Th1-Zellen und der Produktion von IFN γ ein positiver Einfluss von IL-2 bekannt ist. So zeigten *Il2^{-/-}* Mäuse *in vivo* und *in vitro* eine eingeschränkte Th1-Differenzierung²⁹³. IL-2 vermittelt über STAT5 die Expression des IL12-Rezeptors- β 2 sowie von T-bet und wirkt somit fördernd auf die Entwicklung von Th1-Zellen²⁹³. Die Neutralisation mit anti-IL-2-Antikörpern konnte allerdings nur moderat die IFN γ -Produktion erhöhen. Da trotz des vermehrten IL-2 in Th1-Kulturen von *Nfatc1/C^{ΔSUMO}* CD4⁺ T-Zellen diese weniger IFN γ synthetisieren als wildtypische CD4⁺ T-Zellen gibt es

aufgrund der fehlenden SUMOylierung von NFATc1/C anscheinend Zell-intrinsische Effekte. Durch eine ChIP-Bindungsanalyse konnte belegt werden, dass es sich im Fall der IFN γ -Induktion um einen endogenen und direkten Mechanismus handelt, während für IL-17A das vermehrte IL-2 exogen reprimierend wirkt. So bindet die nicht-SUMOylierbare Form von NFATc1 im Vergleich zur wildtypischen Form von NFATc1 weniger gut an den Promotor von IFN γ , während im Fall der Th17-Differenzierung kein Bindungsunterschied am *Il17a*-Promotor festgestellt werden konnte und somit die beschriebenen exogenen Effekte von IL-2 hier ausschlaggebend sind. Ein möglicher Mechanismus, der zu dieser verminderten IFN γ -Synthese beiträgt, kann die veränderte Interaktion mit anderen Transkriptionsfaktoren aufgrund der fehlenden SUMOylierung sein. Es ist beschrieben, dass die SUMOylierung von Proteinen, insbesondere von Transkriptionsfaktoren, deren Funktion verändern kann, indem die Interaktion mit anderen Proteinen beeinflusst wird²⁵¹. NFAT-Faktoren binden immer mit transkriptionellen Partnern an Zielgene wie z. B. mit Transkriptionsfaktoren der AP1-Familie²⁶¹. Im Falle des *Ifng*-Gens ist bekannt, dass dort eine Interaktionen von NF- κ B mit NFAT stattfinden²⁵². Der NF- κ B Transkriptionsfaktor p65 bindet an den *Ifng*-Promotor in räumlicher Nähe zur NFATc1-Bindungsstelle²⁵². Anhand der Daten aus Luziferaseassays konnte gezeigt werden, dass p65 im Zusammenspiel mit der kurzen und mit der SUMOylierbaren langen Isoform von NFATc1/C verstärkend auf die Expression von IFN γ wirkt. Das trat aber nicht in Ko-Transfektionen mit der Δ SUMO-Mutante auf. Möglicherweise wird aufgrund der fehlenden SUMOylierung p65 weniger gut an den *Ifng*-Genlocus rekrutiert. Somit bietet die SUMOylierung von NFATc1/C eine bessere Bindungsplattform zur Interaktion mit anderen positiv wirkenden Transkriptionsfaktoren, die die Expression von Effektorzytokinen beeinflusst¹⁹¹. Dieser Effekt einer verbesserten Interaktion mit positiv verstärkenden transkriptionellen Partnern konnte im Fall der p65-NFAT Interaktion bei der Induktion von *Ifng* gezeigt werden.

Der SUMOylierungsstatus von NFATc1/C supprimiert also zum einen in direkter Weise, wie es für die Expression des *Ifng*-Gens gezeigt wurde, als auch indirekt über das autokrin produzierte IL-2 die Effektorzytokinproduktion, wie es für die Synthese von IL-17A gezeigt wurde.

Wie bereits erwähnt ist IL-2 ist ein wichtiges Zytokin für die Aufrechterhaltung der Homöostase der Treg-Population³⁵. Sowohl nTregs als auch iTregs exprimieren hohe Menge der hochaffinen α -Kette des IL-2-Rezeptors (CD25)^{31, 294}. Im Fall der iTregs (CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ iTregs) ist IL-2 sogar maßgeblich an der Entwicklung dieser aus naiven CD4⁺ T-Zellen in der Peripherie beteiligt²⁴⁸. Dieser positive Einfluss von IL-2 auf die *in vitro*

Differenzierung zu iTregs konnte für CD4⁺ T-Zellen der *Nfatc1/C^{ΔSUMO}* Mäuse nachgewiesen werden. Diese konnten ohne exogene Zugabe von IL-2 zu iTregs differenzieren. In der Kultur von *Nfatc1/C^{ΔSUMO}* CD4⁺ T-Zellen befand sich eine deutlich erhöhte Foxp3⁺ Population im Vergleich zur wildtypischen iTreg Kultur. Auch nTregs, die im Thymus entstehen, sind in der Peripherie für ihre zahlenmäßige Aufrechterhaltung von IL-2 abhängig²⁹⁵. Ebenso hat IL-2 einen stabilisierenden Einfluss auf Tregs, da diese in einem proinflammatorischen Umfeld in Anwesenheit von IL-6 zu Th17-Zellen konvertieren können^{78, 296}. In Anwesenheit von IL-2 und TGFβ dagegen bleiben diese Tregs Foxp3 positiv²⁴⁹. Der stabilisierende Einfluss des autokrin wirkenden IL-2 zeigte sich in der Zunahme Foxp3-positiver Zellen bei Th17-Differenzierung von *Nfatc1/C^{ΔSUMO}* CD4⁺ T-Zellen im Vergleich zur wildtypischen Th17-Zellen. Diese direkte und indirekte Funktion der SUMOylierung von NFATc1/C konnte auch unter inflammatorischen *in vivo* Bedingungen bestätigt werden. Die EAE war in *Nfatc1/C^{ΔSUMO}* Mäusen im Vergleich zu wildtypischen Wurfgeschwistern signifikant abgemildert. Im ZNS der *Nfatc1/C^{ΔSUMO}* Mäuse fanden sich – passend zu den *in vitro* Daten der *Nfatc1/C^{ΔSUMO}* CD4⁺ T-Zellen – signifikant erhöhte Mengen von Treg-Zellen und mehr IL-10-Produzenten. Gleichzeitig waren weniger IFNγ-, IL-17A-Einzelproduzenten und IL-17A⁺-IFNγ⁺ Doppelproduzenten nachzuweisen. MOG₃₅₋₅₅-spezifische *Nfatc1/C^{ΔSUMO}* CD4⁺ T-Zellen sekretierten in Reaktivierungskulturen erniedrigte Mengen von IFNγ und IL-17A, aber gleichzeitig erhöhte Mengen von IL-2. Die reduzierte Menge von GM-CSF, einem pathogenen Th17-Zytokin im ZNS von *Nfatc1/C^{ΔSUMO}* EAE-Mäusen belegte zusätzlich den inhibierenden Einfluss von IL-2 auf die Entwicklung von Th17-Zellen. Diese Störung wirkte sich auch auf die Zahl von IL-17A⁺-IFNγ⁺-Doppelproduzenten aus, da diese aus Th17-Zellen unter dem Einfluss von IL-12 entstehen⁷⁷.

Entscheidend für die Abmilderung der EAE-Symptome sind Tregs. Bei der EAE tragen sie durch IL-10-Sekretion zu einer Abmilderung der ZNS-Entzündungsreaktion bei¹³¹. IL-10 hemmt besonders die Population der pathogenen IL-17A⁺-IFNγ⁺-Doppelproduzenten und wirkt zusätzlich supprimierend auf pathogene Th17-Zellen^{254, 255}. Der positive Einfluss von IL-2 auf den Krankheitsverlauf einer EAE, wie bei den *Nfatc1/C^{ΔSUMO}* Mäusen zu sehen war, zeigen Studien zu einer therapeutischen Gabe von IL-2. Eine moderate Dosis an IL-2 – vor der Induktion einer EAE verabreicht – resultierte in einer stark abgeschwächten EAE. Diese Vorbehandlung förderte eine massive Expansion an Tregs und führte zu einer reduzierten Differenzierung an MOG-spezifischen Th17-Zellen²⁹⁷. Auch in *Nfatc1/C^{ΔSUMO}* Mäusen lag – vergleichbar mit einer vorherigen Gabe – vermehrt IL-2 vor, was sich in der erhöhten Anzahl an Tregs im ZNS schon ab Tag 10 belegen ließ. Die in *Nfatc1/C^{ΔSUMO}* EAE-Mäusen

beobachteten Effekte von IL-2 auf die Expansion an Tregs sowie die Inhibition der Th17-Immunantwort konnten auch in einer anderen Studie gezeigt werden. In dieser Arbeit wurde die Rolle der Ubiquitin-spezifischen Protease USP18 während der Th17-Differenzierung untersucht²⁹⁸. CD4⁺ T-Zellen aus *Usp18*^{-/-} Mäusen produzierten nach TCR-Stimulation erhöhte Mengen an IL-2, was einen positiven Einfluss auf die *in vitro* Induktion von iTregs und einen negativen auf die Entwicklung von Th17-Zellen hatte²⁹⁸. Bei der EAE waren *Usp18*^{-/-} Mäusen geschützt, was auf reduzierte Mengen an MOG-spezifischen Th17-Zellen und eine erhöhte Anzahl an IL-2-Produzenten zurückzuführen war²⁹⁸.

Der Befund, dass der SUMOylierungsstatus von NFATc1/C einen entscheidenden Einfluss auf eine (Auto-)Immunreaktion hat, stellt die Frage, ob eine Modulation der SUMOylierung einen therapeutischen Ansatz für Autoimmunkrankheiten darstellen kann. Die SUMOylierung von Zielproteinen ist ein mehrstufiger Prozess, der von verschiedenen Enzymen ausgeführt wird. Hierbei werden die SUMO-Proteine kovalent an die ε-Aminogruppe von Lysinen innerhalb einer spezifischen SUMOylierungskonsensussequenz gebunden. Dies erfolgt über eine enzymatische Kaskade, welche die hintereinandergeschalteten Funktionen von einem aktivierendem Enzym E1, einem konjugierenden Enzym E2 und einer E3-Ligase benötigt, um SUMO an das Zielsubstrat zu binden²⁹⁹. Bevor SUMO an das Substrat gebunden werden kann, muss es selbst zunächst von seiner Vorläuferstruktur zu konjugierbaren SUMO-Proteinen durch spezielle Proteasen prozessiert werden^{299, 300}. Diese Proteasen dienen auch dazu, SUMO wieder von Zielproteinen zu entfernen²⁹⁹. Da der Prozess der SUMO-Konjugation also ein mehrstufiger Prozess ist, ergeben sich mehrere mögliche Angriffspunkte der SUMOylierung. Eine Möglichkeit wäre die Inhibition von SUMO-spezifischen Proteasen (SENPs), was in einer Studie mit inhibitorischen Molekülen untersucht wurde³⁰⁰. Allerdings ist der Prozess der SUMO-Prozessierung und Dekonjugation von Proteinen innerhalb der Zelle ein dynamischer Prozess. Es gibt z. Z. noch keinen Ansatz einer zeitlich geregelten Inhibition der Proteasen, um so die Prozessierung und somit die Konjugation/Ligation von SUMO an Proteine zu verhindern³⁰⁰. Zwei neuere Ansätze zielen zum einen auf die Inhibition von SUMO-aktivierenden Enzymen E1 zur kompletten Blockade der SUMOylierung³⁰¹ und zum anderen auf eine Blockade des Übertragens von SUMO durch das konjugierende Enzym E2 Ubc9 ab³⁰². In dieser Studie wurde der SUMO1 Transfer von Ubc9 an Zielsubstrate durch einen zellpermeablen Inhibitor blockiert³⁰². Auch NFATc1/C wird durch Ubc9 mit SUMO1 SUMOyliert¹⁹¹. Allerdings stellt sich bei allen diesen Ansätzen die Frage der Spezifität. SUMOylierung ist eine posttranslationale Modifikation, die innerhalb einer Zelle viele Proteine betrifft. Blockiert man die SUMOylierung anhand von Inhibitoren der

konjugierenden Enzymkaskade, erhält man daher keine direkte Substratspezifität. Möglicherweise aber kann man anhand von genaueren Strukturanalysen der SUMO-Interaktionsmotive, den SIMs, die zur Interaktion von SUMO mit Zielproteinen sowie mit den Enzymen der konjugierenden Kaskade benötigt werden³⁰³, eine Substratspezifität erreichen. Abschließend kann man trotz aller Bedenken zur augenblicklichen Durchführbarkeit sagen, dass die Blockade der SUMOylierung von NFATc1/C mit einem spezifischen Inhibitor, aufgrund der positiven Wirkung auf die Population der Tregs bei gleichzeitiger negativer auf Th1- und Th17-Effektorzellen, ein interessanter therapeutischer Ansatz in der MS/EAE wäre.

7. Literaturverzeichnis

1. Rus H, Cudrici C, Niculescu F. The role of the complement system in innate immunity. *Immunologic research* 2005, **33**(2): 103-112.
2. Medzhitov R, Janeway CA, Jr. Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. *Science* 2002, **296**(5566): 298-300.
3. Medzhitov R, Janeway CA, Jr. Innate immune induction of the adaptive immune response. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* 1999, **64**: 429-435.
4. Sallusto F, Geginat J, Lanzavecchia A. Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. *Annual review of immunology* 2004, **22**: 745-763.
5. Shlomchik MJ, Weisel F. Germinal center selection and the development of memory B and plasma cells. *Immunological reviews* 2012, **247**(1): 52-63.
6. Ahmed R, Gray D. Immunological memory and protective immunity: understanding their relation. *Science* 1996, **272**(5258): 54-60.
7. O'Byrne KJ, Dalglish AG. Chronic immune activation and inflammation as the cause of malignancy. *British journal of cancer* 2001, **85**(4): 473-483.
8. Wang JH, Reinherz EL. The structural basis of alphabeta T-lineage immune recognition: TCR docking topologies, mechanotransduction, and co-receptor function. *Immunological reviews* 2012, **250**(1): 102-119.
9. Kuhns MS, Badgandi HB. Piecing together the family portrait of TCR-CD3 complexes. *Immunological reviews* 2012, **250**(1): 120-143.
10. Koch U, Radtke F. Mechanisms of T cell development and transformation. *Annual review of cell and developmental biology* 2011, **27**: 539-562.
11. Germain RN. T-cell development and the CD4-CD8 lineage decision. *Nature reviews Immunology* 2002, **2**(5): 309-322.
12. Janeway CA, Jr. Thymic selection: two pathways to life and two to death. *Immunity* 1994, **1**(1): 3-6.
13. Janeway CA, Jr. How the immune system works to protect the host from infection: a personal view. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2001, **98**(13): 7461-7468.
14. Takahama Y. Journey through the thymus: stromal guides for T-cell development and selection. *Nature reviews Immunology* 2006, **6**(2): 127-135.
15. Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nature immunology* 2003, **4**(4): 330-336.

16. Hsieh CS, Zheng Y, Liang Y, Fontenot JD, Rudensky AY. An intersection between the self-reactive regulatory and nonregulatory T cell receptor repertoires. *Nature immunology* 2006, **7**(4): 401-410.
17. 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. *Journal of immunology* 2002, **168**(9): 4399-4405.
18. Ribot J, Romagnoli P, van Meerwijk JP. Agonist ligands expressed by thymic epithelium enhance positive selection of regulatory T lymphocytes from precursors with a normally diverse TCR repertoire. *Journal of immunology* 2006, **177**(2): 1101-1107.
19. Tai X, Cowan M, Feigenbaum L, Singer A. CD28 costimulation of developing thymocytes induces Foxp3 expression and regulatory T cell differentiation independently of interleukin 2. *Nature immunology* 2005, **6**(2): 152-162.
20. Coquet JM, Ribot JC, Babala N, Middendorp S, van der Horst G, Xiao Y, *et al.* Epithelial and dendritic cells in the thymic medulla promote CD4+Foxp3+ regulatory T cell development via the CD27-CD70 pathway. *The Journal of experimental medicine* 2013, **210**(4): 715-728.
21. von Boehmer H. Central tolerance: essential for preventing autoimmune disease? *European journal of immunology* 2009, **39**(9): 2313-2316.
22. Jondal M, Schirmbeck R, Reimann J. MHC class I-restricted CTL responses to exogenous antigens. *Immunity* 1996, **5**(4): 295-302.
23. Harty JT, Bevan MJ. Responses of CD8(+) T cells to intracellular bacteria. *Current opinion in immunology* 1999, **11**(1): 89-93.
24. Harty JT, Tvinnereim AR, White DW. CD8+ T cell effector mechanisms in resistance to infection. *Annual review of immunology* 2000, **18**: 275-308.
25. Barry M, Bleackley RC. Cytotoxic T lymphocytes: all roads lead to death. *Nature reviews Immunology* 2002, **2**(6): 401-409.
26. Berke G. The CTL's kiss of death. *Cell* 1995, **81**(1): 9-12.
27. Shresta S, Pham CT, Thomas DA, Graubert TA, Ley TJ. How do cytotoxic lymphocytes kill their targets? *Current opinion in immunology* 1998, **10**(5): 581-587.
28. Wong P, Pamer EG. CD8 T cell responses to infectious pathogens. *Annual review of immunology* 2003, **21**: 29-70.
29. Chaudhry A, Rudensky AY. Control of inflammation by integration of environmental cues by regulatory T cells. *The Journal of clinical investigation* 2013, **123**(3): 939-944.

30. Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell* 2008, **133**(5): 775-787.
31. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *Journal of immunology* 1995, **155**(3): 1151-1164.
32. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 2003, **299**(5609): 1057-1061.
33. Mills KH. Regulatory T cells: friend or foe in immunity to infection? *Nature reviews Immunology* 2004, **4**(11): 841-855.
34. Cozzo C, Larkin J, 3rd, Caton AJ. Cutting edge: self-peptides drive the peripheral expansion of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Journal of immunology* 2003, **171**(11): 5678-5682.
35. Fontenot JD, Rasmussen JP, Gavin MA, Rudensky AY. A function for interleukin 2 in Foxp3-expressing regulatory T cells. *Nature immunology* 2005, **6**(11): 1142-1151.
36. Chen W, Jin W, Hardegen N, Lei KJ, Li L, Marinos N, *et al.* Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *The Journal of experimental medicine* 2003, **198**(12): 1875-1886.
37. von Boehmer H. Mechanisms of suppression by suppressor T cells. *Nature immunology* 2005, **6**(4): 338-344.
38. Tang Q, Bluestone JA. The Foxp3+ regulatory T cell: a jack of all trades, master of regulation. *Nature immunology* 2008, **9**(3): 239-244.
39. 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. *Nature immunology* 2007, **8**(12): 1353-1362.
40. Scheffold A, Murphy KM, Hofer T. Competition for cytokines: T(reg) cells take all. *Nature immunology* 2007, **8**(12): 1285-1287.
41. Zhu J, Paul WE. CD4 T cells: fates, functions, and faults. *Blood* 2008, **112**(5): 1557-1569.
42. Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *Journal of immunology* 1986, **136**(7): 2348-2357.
43. O'Shea JJ, Paul WE. Mechanisms underlying lineage commitment and plasticity of helper CD4+ T cells. *Science* 2010, **327**(5969): 1098-1102.

44. 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. *Nature immunology* 2002, **3**(6): 549-557.
45. Trinchieri G, Pflanz S, Kastelein RA. The IL-12 family of heterodimeric cytokines: new players in the regulation of T cell responses. *Immunity* 2003, **19**(5): 641-644.
46. Hwang ES, Szabo SJ, Schwartzberg PL, Glimcher LH. T helper cell fate specified by kinase-mediated interaction of T-bet with GATA-3. *Science* 2005, **307**(5708): 430-433.
47. Lazarevic V, Chen X, Shim JH, Hwang ES, Jang E, Bolm AN, *et al.* T-bet represses T(H)17 differentiation by preventing Runx1-mediated activation of the gene encoding RORgammat. *Nature immunology* 2011, **12**(1): 96-104.
48. Luckheeram RV, Zhou R, Verma AD, Xia B. CD4(+)T cells: differentiation and functions. *Clinical & developmental immunology* 2012, **2012**: 925135.
49. Hemmer B, Archelos JJ, Hartung HP. New concepts in the immunopathogenesis of multiple sclerosis. *Nature reviews Neuroscience* 2002, **3**(4): 291-301.
50. Goverman J. Autoimmune T cell responses in the central nervous system. *Nature reviews Immunology* 2009, **9**(6): 393-407.
51. Kopf M, Le Gros G, Bachmann M, Lamers MC, Bluethmann H, Kohler G. Disruption of the murine IL-4 gene blocks Th2 cytokine responses. *Nature* 1993, **362**(6417): 245-248.
52. Swain SL, Weinberg AD, English M, Huston G. IL-4 directs the development of Th2-like helper effectors. *Journal of immunology* 1990, **145**(11): 3796-3806.
53. Le Gros G, Ben-Sasson SZ, Seder R, Finkelman FD, Paul WE. Generation of interleukin 4 (IL-4)-producing cells in vivo and in vitro: IL-2 and IL-4 are required for in vitro generation of IL-4-producing cells. *The Journal of experimental medicine* 1990, **172**(3): 921-929.
54. Kaplan MH, Schindler U, Smiley ST, Grusby MJ. Stat6 is required for mediating responses to IL-4 and for development of Th2 cells. *Immunity* 1996, **4**(3): 313-319.
55. Zheng W, Flavell RA. The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells. *Cell* 1997, **89**(4): 587-596.
56. Zhu J, Yamane H, Cote-Sierra J, Guo L, Paul WE. GATA-3 promotes Th2 responses through three different mechanisms: induction of Th2 cytokine production, selective growth of Th2 cells and inhibition of Th1 cell-specific factors. *Cell research* 2006, **16**(1): 3-10.
57. Cote-Sierra J, Foucras G, Guo L, Chiodetti L, Young HA, Hu-Li J, *et al.* Interleukin 2 plays a central role in Th2 differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2004, **101**(11): 3880-3885.

58. Zhu J, Cote-Sierra J, Guo L, Paul WE. Stat5 activation plays a critical role in Th2 differentiation. *Immunity* 2003, **19**(5): 739-748.
59. Rengarajan J, Mowen KA, McBride KD, Smith ED, Singh H, Glimcher LH. Interferon regulatory factor 4 (IRF4) interacts with NFATc2 to modulate interleukin 4 gene expression. *The Journal of experimental medicine* 2002, **195**(8): 1003-1012.
60. Murphy CA, Langrish CL, Chen Y, Blumenschein W, McClanahan T, Kastelein RA, *et al.* Divergent pro- and antiinflammatory roles for IL-23 and IL-12 in joint autoimmune inflammation. *The Journal of experimental medicine* 2003, **198**(12): 1951-1957.
61. Cua DJ, Sherlock J, Chen Y, Murphy CA, Joyce B, Seymour B, *et al.* Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature* 2003, **421**(6924): 744-748.
62. Aggarwal S, Ghilardi N, Xie MH, de Sauvage FJ, Gurney AL. Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17. *The Journal of biological chemistry* 2003, **278**(3): 1910-1914.
63. Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, Turner H, Murphy TL, Murphy KM, *et al.* Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nature immunology* 2005, **6**(11): 1123-1132.
64. Moseley TA, Haudenschild DR, Rose L, Reddi AH. Interleukin-17 family and IL-17 receptors. *Cytokine & growth factor reviews* 2003, **14**(2): 155-174.
65. Ivanov, II, McKenzie BS, Zhou L, Tadokoro CE, Lepelley A, Lafaille JJ, *et al.* The orphan nuclear receptor ROR γ directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. *Cell* 2006, **126**(6): 1121-1133.
66. Ghoreschi K, Laurence A, Yang XP, Tato CM, McGeachy MJ, Konkel JE, *et al.* Generation of pathogenic T(H)17 cells in the absence of TGF-beta signalling. *Nature* 2010, **467**(7318): 967-971.
67. Veldhoen M, Hocking RJ, Atkins CJ, Locksley RM, Stockinger B. TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity* 2006, **24**(2): 179-189.
68. Manel N, Unutmaz D, Littman DR. The differentiation of human T(H)-17 cells requires transforming growth factor-beta and induction of the nuclear receptor ROR γ . *Nature immunology* 2008, **9**(6): 641-649.
69. Yang XO, Panopoulos AD, Nurieva R, Chang SH, Wang D, Watowich SS, *et al.* STAT3 regulates cytokine-mediated generation of inflammatory helper T cells. *The Journal of biological chemistry* 2007, **282**(13): 9358-9363.
70. Nurieva R, Yang XO, Martinez G, Zhang Y, Panopoulos AD, Ma L, *et al.* Essential autocrine regulation by IL-21 in the generation of inflammatory T cells. *Nature* 2007, **448**(7152): 480-483.

71. Chen Q, Yang W, Gupta S, Biswas P, Smith P, Bhagat G, *et al.* IRF-4-binding protein inhibits interleukin-17 and interleukin-21 production by controlling the activity of IRF-4 transcription factor. *Immunity* 2008, **29**(6): 899-911.
72. 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. *The Journal of experimental medicine* 2005, **201**(2): 233-240.
73. Zhou L, Ivanov, II, Spolski R, Min R, Shenderov K, Egawa T, *et al.* IL-6 programs T(H)-17 cell differentiation by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways. *Nature immunology* 2007, **8**(9): 967-974.
74. Zhou L, Chong MM, Littman DR. Plasticity of CD4⁺ T cell lineage differentiation. *Immunity* 2009, **30**(5): 646-655.
75. Lee YK, Turner H, Maynard CL, Oliver JR, Chen D, Elson CO, *et al.* Late developmental plasticity in the T helper 17 lineage. *Immunity* 2009, **30**(1): 92-107.
76. Lexberg MH, Taubner A, Forster A, Albrecht I, Richter A, Kamradt T, *et al.* Th memory for interleukin-17 expression is stable in vivo. *European journal of immunology* 2008, **38**(10): 2654-2664.
77. Hirota K, Duarte JH, Veldhoen M, Hornsby E, Li Y, Cua DJ, *et al.* Fate mapping of IL-17-producing T cells in inflammatory responses. *Nature immunology* 2011, **12**(3): 255-263.
78. Bettelli E, Carrier Y, Gao W, Korn T, Strom TB, Oukka M, *et al.* Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* 2006, **441**(7090): 235-238.
79. Veldhoen M, Uyttenhove C, van Snick J, Helmby H, Westendorf A, Buer J, *et al.* Transforming growth factor-beta 'reprograms' the differentiation of T helper 2 cells and promotes an interleukin 9-producing subset. *Nature immunology* 2008, **9**(12): 1341-1346.
80. Peine M, Rausch S, Helmstetter C, Frohlich A, Hegazy AN, Kuhl AA, *et al.* Stable Tbet(+)/GATA-3(+) Th1/Th2 hybrid cells arise in vivo, can develop directly from naive precursors, and limit immunopathologic inflammation. *PLoS biology* 2013, **11**(8): e1001633.
81. 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. *Nature genetics* 2001, **27**(1): 20-21.
82. Wildin RS, Ramsdell F, Peake J, Faravelli F, Casanova JL, Buist N, *et al.* X-linked neonatal diabetes mellitus, enteropathy and endocrinopathy syndrome is the human equivalent of mouse scurfy. *Nature genetics* 2001, **27**(1): 18-20.
83. Ridgway WM, Fathman CG. MHC structure and autoimmune T cell repertoire development. *Current opinion in immunology* 1999, **11**(6): 638-642.

84. Fujinami RS, von Herrath MG, Christen U, Whitton JL. Molecular mimicry, bystander activation, or viral persistence: infections and autoimmune disease. *Clinical microbiology reviews* 2006, **19**(1): 80-94.
85. Oldstone MB. Molecular mimicry and autoimmune disease. *Cell* 1987, **50**(6): 819-820.
86. Ohashi PS. T-cell signalling and autoimmunity: molecular mechanisms of disease. *Nature reviews Immunology* 2002, **2**(6): 427-438.
87. Shevach EM. Regulatory T cells in autoimmunity*. *Annual review of immunology* 2000, **18**: 423-449.
88. Hafler DA. Multiple sclerosis. *The Journal of clinical investigation* 2004, **113**(6): 788-794.
89. Goverman J, Perchellet A, Huseby ES. The role of CD8(+) T cells in multiple sclerosis and its animal models. *Current drug targets Inflammation and allergy* 2005, **4**(2): 239-245.
90. Mrass P, Weninger W. Immune cell migration as a means to control immune privilege: lessons from the CNS and tumors. *Immunological reviews* 2006, **213**: 195-212.
91. Larochelle C, Alvarez JI, Prat A. How do immune cells overcome the blood-brain barrier in multiple sclerosis? *FEBS letters* 2011, **585**(23): 3770-3780.
92. Minagar A, Alexander JS. Blood-brain barrier disruption in multiple sclerosis. *Multiple sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)* 2003, **9**(6): 540-549.
93. Alvarez JI, Teale JM. Breakdown of the blood brain barrier and blood-cerebrospinal fluid barrier is associated with differential leukocyte migration in distinct compartments of the CNS during the course of murine NCC. *Journal of neuroimmunology* 2006, **173**(1-2): 45-55.
94. Ransohoff RM, Kivisakk P, Kidd G. Three or more routes for leukocyte migration into the central nervous system. *Nature reviews Immunology* 2003, **3**(7): 569-581.
95. Miller DH, Khan OA, Sheremata WA, Blumhardt LD, Rice GP, Libonati MA, *et al.* A controlled trial of natalizumab for relapsing multiple sclerosis. *The New England journal of medicine* 2003, **348**(1): 15-23.
96. Balcer LJ, Galetta SL, Calabresi PA, Confavreux C, Giovannoni G, Havrdova E, *et al.* Natalizumab reduces visual loss in patients with relapsing multiple sclerosis. *Neurology* 2007, **68**(16): 1299-1304.
97. Polman CH, O'Connor PW, Havrdova E, Hutchinson M, Kappos L, Miller DH, *et al.* A randomized, placebo-controlled trial of natalizumab for relapsing multiple sclerosis. *The New England journal of medicine* 2006, **354**(9): 899-910.

98. Rudick RA, Miller DM. Health-related quality of life in multiple sclerosis: current evidence, measurement and effects of disease severity and treatment. *CNS drugs* 2008, **22**(10): 827-839.
99. 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. *The New England journal of medicine* 2007, **357**(9): 851-862.
100. Ebers GC, Sadovnick AD, Risch NJ. A genetic basis for familial aggregation in multiple sclerosis. Canadian Collaborative Study Group. *Nature* 1995, **377**(6545): 150-151.
101. Oksenberg JR, Hauser SL. Genetics of multiple sclerosis. *Neurologic clinics* 2005, **23**(1): 61-75, vi.
102. Sibley WA, Bamford CR, Clark K. Clinical viral infections and multiple sclerosis. *Lancet* 1985, **1**(8441): 1313-1315.
103. Lauer K. The risk of multiple sclerosis in the U.S.A. in relation to sociogeographic features: a factor-analytic study. *Journal of clinical epidemiology* 1994, **47**(1): 43-48.
104. Hewer S, Lucas R, van der Mei I, Taylor BV. Vitamin D and multiple sclerosis. *Journal of clinical neuroscience : official journal of the Neurosurgical Society of Australasia* 2013, **20**(5): 634-641.
105. Constantinescu CS, Farooqi N, O'Brien K, Gran B. Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) as a model for multiple sclerosis (MS). *British journal of pharmacology* 2011, **164**(4): 1079-1106.
106. Stromnes IM, Goverman JM. Active induction of experimental allergic encephalomyelitis. *Nature protocols* 2006, **1**(4): 1810-1819.
107. Stromnes IM, Goverman JM. Passive induction of experimental allergic encephalomyelitis. *Nature protocols* 2006, **1**(4): 1952-1960.
108. Pette M, Fujita K, Kitze B, Whitaker JN, Albert E, Kappos L, *et al.* Myelin basic protein-specific T lymphocyte lines from MS patients and healthy individuals. *Neurology* 1990, **40**(11): 1770-1776.
109. Ota K, Matsui M, Milford EL, Mackin GA, Weiner HL, Hafler DA. T-cell recognition of an immunodominant myelin basic protein epitope in multiple sclerosis. *Nature* 1990, **346**(6280): 183-187.
110. Bielekova B, Sung MH, Kadom N, Simon R, McFarland H, Martin R. Expansion and functional relevance of high-avidity myelin-specific CD4+ T cells in multiple sclerosis. *Journal of immunology* 2004, **172**(6): 3893-3904.
111. Nicoletti F, Patti F, Cocuzza C, Zaccone P, Nicoletti A, Di Marco R, *et al.* Elevated serum levels of interleukin-12 in chronic progressive multiple sclerosis. *Journal of neuroimmunology* 1996, **70**(1): 87-90.

112. Drulovic J, Mostarica-Stojkovic M, Levic Z, Stojavljevic N, Pravica V, Mesaros S. Interleukin-12 and tumor necrosis factor-alpha levels in cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients. *Journal of the neurological sciences* 1997, **147**(2): 145-150.
113. Traugott U, Lebon P. Interferon-gamma and Ia antigen are present on astrocytes in active chronic multiple sclerosis lesions. *Journal of the neurological sciences* 1988, **84**(2-3): 257-264.
114. Bettelli E, Sullivan B, Szabo SJ, Sobel RA, Glimcher LH, Kuchroo VK. Loss of T-bet, but not STAT1, prevents the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *The Journal of experimental medicine* 2004, **200**(1): 79-87.
115. Leonard JP, Waldburger KE, Goldman SJ. Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis by antibodies against interleukin 12. *The Journal of experimental medicine* 1995, **181**(1): 381-386.
116. Jager A, Dardalhon V, Sobel RA, Bettelli E, Kuchroo VK. Th1, Th17, and Th9 effector cells induce experimental autoimmune encephalomyelitis with different pathological phenotypes. *Journal of immunology* 2009, **183**(11): 7169-7177.
117. Ferber IA, Brocke S, Taylor-Edwards C, Ridgway W, Dinisco C, Steinman L, *et al.* Mice with a disrupted IFN-gamma gene are susceptible to the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *Journal of immunology* 1996, **156**(1): 5-7.
118. Becher B, Durell BG, Noelle RJ. Experimental autoimmune encephalitis and inflammation in the absence of interleukin-12. *The Journal of clinical investigation* 2002, **110**(4): 493-497.
119. Gutcher I, Becher B. APC-derived cytokines and T cell polarization in autoimmune inflammation. *The Journal of clinical investigation* 2007, **117**(5): 1119-1127.
120. Matusevicius D, Kivisakk P, He B, Kostulas N, Ozenci V, Fredrikson S, *et al.* Interleukin-17 mRNA expression in blood and CSF mononuclear cells is augmented in multiple sclerosis. *Multiple sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)* 1999, **5**(2): 101-104.
121. Lock C, Hermans G, Pedotti R, Brendolan A, Schadt E, Garren H, *et al.* Gene-microarray analysis of multiple sclerosis lesions yields new targets validated in autoimmune encephalomyelitis. *Nature medicine* 2002, **8**(5): 500-508.
122. Hofstetter HH, Ibrahim SM, Koczan D, Kruse N, Weishaupt A, Toyka KV, *et al.* Therapeutic efficacy of IL-17 neutralization in murine experimental autoimmune encephalomyelitis. *Cellular immunology* 2005, **237**(2): 123-130.
123. 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. *Nature medicine* 2007, **13**(10): 1173-1175.

124. Kebir H, Ifergan I, Alvarez JI, Bernard M, Poirier J, Arbour N, *et al.* Preferential recruitment of interferon-gamma-expressing TH17 cells in multiple sclerosis. *Annals of neurology* 2009, **66**(3): 390-402.
125. Racke MK, Bonomo A, Scott DE, Cannella B, Levine A, Raine CS, *et al.* Cytokine-induced immune deviation as a therapy for inflammatory autoimmune disease. *The Journal of experimental medicine* 1994, **180**(5): 1961-1966.
126. van der Veen RC, Kapp JA, Trotter JL. Fine-specificity differences in the recognition of an encephalitogenic peptide by T helper 1 and 2 cells. *Journal of neuroimmunology* 1993, **48**(2): 221-226.
127. Platten M, Ho PP, Youssef S, Fontoura P, Garren H, Hur EM, *et al.* Treatment of autoimmune neuroinflammation with a synthetic tryptophan metabolite. *Science* 2005, **310**(5749): 850-855.
128. Duda PW, Schmied MC, Cook SL, Krieger JI, Hafler DA. Glatiramer acetate (Copaxone) induces degenerate, Th2-polarized immune responses in patients with multiple sclerosis. *The Journal of clinical investigation* 2000, **105**(7): 967-976.
129. Zhang X, Koldzic DN, Izikson L, Reddy J, Nazareno RF, Sakaguchi S, *et al.* IL-10 is involved in the suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis by CD25+CD4+ regulatory T cells. *International immunology* 2004, **16**(2): 249-256.
130. O'Connor RA, Anderton SM. Foxp3+ regulatory T cells in the control of experimental CNS autoimmune disease. *Journal of neuroimmunology* 2008, **193**(1-2): 1-11.
131. McGeachy MJ, Stephens LA, Anderton SM. Natural recovery and protection from autoimmune encephalomyelitis: contribution of CD4+CD25+ regulatory cells within the central nervous system. *Journal of immunology* 2005, **175**(5): 3025-3032.
132. Venken K, Hellings N, Thewissen M, Somers V, Hensen K, Rummens JL, *et al.* Compromised CD4+ CD25(high) regulatory T-cell function in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis is correlated with a reduced frequency of FOXP3-positive cells and reduced FOXP3 expression at the single-cell level. *Immunology* 2008, **123**(1): 79-89.
133. Huan J, Culbertson N, Spencer L, Bartholomew R, Burrows GG, Chou YK, *et al.* Decreased FOXP3 levels in multiple sclerosis patients. *Journal of neuroscience research* 2005, **81**(1): 45-52.
134. Haas J, Hug A, Viehöver A, Fritzsching B, Falk CS, Filser A, *et al.* Reduced suppressive effect of CD4+CD25high regulatory T cells on the T cell immune response against myelin oligodendrocyte glycoprotein in patients with multiple sclerosis. *European journal of immunology* 2005, **35**(11): 3343-3352.
135. Martinez-Forero I, Garcia-Munoz R, Martinez-Pasamar S, Inoges S, Lopez-Diaz de Cerio A, Palacios R, *et al.* IL-10 suppressor activity and ex vivo Tr1 cell function are impaired in multiple sclerosis. *European journal of immunology* 2008, **38**(2): 576-586.

136. Viglietta V, Baecher-Allan C, Weiner HL, Hafler DA. Loss of functional suppression by CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. *The Journal of experimental medicine* 2004, **199**(7): 971-979.
137. Xu L, Xu Z, Xu M. Glucocorticoid treatment restores the impaired suppressive function of regulatory T cells in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. *Clinical and experimental immunology* 2009, **158**(1): 26-30.
138. Korporal M, Haas J, Balint B, Fritzsching B, Schwarz A, Moeller S, *et al.* Interferon beta-induced restoration of regulatory T-cell function in multiple sclerosis is prompted by an increase in newly generated naive regulatory T cells. *Archives of neurology* 2008, **65**(11): 1434-1439.
139. Friese MA, Fugger L. Autoreactive CD8+ T cells in multiple sclerosis: a new target for therapy? *Brain : a journal of neurology* 2005, **128**(Pt 8): 1747-1763.
140. 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. *The Journal of experimental medicine* 2001, **194**(5): 669-676.
141. Buckle GJ, Hollsberg P, Hafler DA. Activated CD8+ T cells in secondary progressive MS secrete lymphotoxin. *Neurology* 2003, **60**(4): 702-705.
142. Mycko M, Kowalski W, Kwinkowski M, Buenafe AC, Szymanska B, Tronczynska E, *et al.* Multiple sclerosis: the frequency of allelic forms of tumor necrosis factor and lymphotoxin-alpha. *Journal of neuroimmunology* 1998, **84**(2): 198-206.
143. 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. *Journal of immunology* 2004, **172**(8): 5120-5127.
144. 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. *The Journal of clinical investigation* 2013, **123**(1): 247-260.
145. Berer K, Wekerle H, Krishnamoorthy G. B cells in spontaneous autoimmune diseases of the central nervous system. *Molecular immunology* 2011, **48**(11): 1332-1337.
146. McLaughlin KA, Wucherpfennig KW. B cells and autoantibodies in the pathogenesis of multiple sclerosis and related inflammatory demyelinating diseases. *Advances in immunology* 2008, **98**: 121-149.
147. Colombo M, Dono M, Gazzola P, Roncella S, Valetto A, Chiorazzi N, *et al.* Accumulation of clonally related B lymphocytes in the cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients. *Journal of immunology* 2000, **164**(5): 2782-2789.
148. Iglesias A, Bauer J, Litzemberger T, Schubart A, Linington C. T- and B-cell responses to myelin oligodendrocyte glycoprotein in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Glia* 2001, **36**(2): 220-234.

149. Fillatreau S, Sweenie CH, McGeachy MJ, Gray D, Anderton SM. B cells regulate autoimmunity by provision of IL-10. *Nature immunology* 2002, **3**(10): 944-950.
150. Matsushita T, Yanaba K, Bouaziz JD, Fujimoto M, Tedder TF. Regulatory B cells inhibit EAE initiation in mice while other B cells promote disease progression. *The Journal of clinical investigation* 2008, **118**(10): 3420-3430.
151. Bhattacharyya S, Deb J, Patra AK, Thuy Pham DA, Chen W, Vaeth M, *et al.* NFATc1 affects mouse splenic B cell function by controlling the calcineurin--NFAT signaling network. *The Journal of experimental medicine* 2011, **208**(4): 823-839.
152. Duddy M, Niino M, Adatia F, Hebert S, Freedman M, Atkins H, *et al.* Distinct effector cytokine profiles of memory and naive human B cell subsets and implication in multiple sclerosis. *Journal of immunology* 2007, **178**(10): 6092-6099.
153. Raddassi K, Kent SC, Yang J, Bourcier K, Bradshaw EM, Seyfert-Margolis V, *et al.* Increased frequencies of myelin oligodendrocyte glycoprotein/MHC class II-binding CD4 cells in patients with multiple sclerosis. *Journal of immunology* 2011, **187**(2): 1039-1046.
154. Rivers TM, Sprunt DH, Berry GP. OBSERVATIONS ON ATTEMPTS TO PRODUCE ACUTE DISSEMINATED ENCEPHALOMYELITIS IN MONKEYS. *The Journal of experimental medicine* 1933, **58**(1): 39-53.
155. Abreu SL. Suppression of experimental allergic encephalomyelitis by interferon. *Immunological communications* 1982, **11**(1): 1-7.
156. Teitelbaum D, Meshorer A, Hirshfeld T, Arnon R, Sela M. Suppression of experimental allergic encephalomyelitis by a synthetic polypeptide. *European journal of immunology* 1971, **1**(4): 242-248.
157. Yednock TA, Cannon C, Fritz LC, Sanchez-Madrid F, Steinman L, Karin N. Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis by antibodies against alpha 4 beta 1 integrin. *Nature* 1992, **356**(6364): 63-66.
158. Shaw JP, Utz PJ, Durand DB, Toole JJ, Emmel EA, Crabtree GR. Identification of a putative regulator of early T cell activation genes. *Science* 1988, **241**(4862): 202-205.
159. Serfling E, Barthelmas R, Pfeuffer I, Schenk B, Zarius S, Swoboda R, *et al.* Ubiquitous and lymphocyte-specific factors are involved in the induction of the mouse interleukin 2 gene in T lymphocytes. *The EMBO journal* 1989, **8**(2): 465-473.
160. Muller MR, Rao A. NFAT, immunity and cancer: a transcription factor comes of age. *Nature reviews Immunology* 2010, **10**(9): 645-656.
161. Goodridge HS, Simmons RM, Underhill DM. Dectin-1 stimulation by *Candida albicans* yeast or zymosan triggers NFAT activation in macrophages and dendritic cells. *Journal of immunology* 2007, **178**(5): 3107-3115.

162. Klein M, Klein-Hessling S, Palmetshofer A, Serfling E, Tertilt C, Bopp T, *et al.* Specific and redundant roles for NFAT transcription factors in the expression of mast cell-derived cytokines. *Journal of immunology* 2006, **177**(10): 6667-6674.
163. Crist SA, Sprague DL, Ratliff TL. Nuclear factor of activated T cells (NFAT) mediates CD154 expression in megakaryocytes. *Blood* 2008, **111**(7): 3553-3561.
164. Hogan PG, Chen L, Nardone J, Rao A. Transcriptional regulation by calcium, calcineurin, and NFAT. *Genes & development* 2003, **17**(18): 2205-2232.
165. Horsley V, Aliprantis AO, Polak L, Glimcher LH, Fuchs E. NFATc1 balances quiescence and proliferation of skin stem cells. *Cell* 2008, **132**(2): 299-310.
166. Heit JJ, Apelqvist AA, Gu X, Winslow MM, Neilson JR, Crabtree GR, *et al.* Calcineurin/NFAT signalling regulates pancreatic beta-cell growth and function. *Nature* 2006, **443**(7109): 345-349.
167. Winslow MM, Pan M, Starbuck M, Gallo EM, Deng L, Karsenty G, *et al.* Calcineurin/NFAT signaling in osteoblasts regulates bone mass. *Developmental cell* 2006, **10**(6): 771-782.
168. Kiani A, Habermann I, Haase M, Feldmann S, Boxberger S, Sanchez-Fernandez MA, *et al.* Expression and regulation of NFAT (nuclear factors of activated T cells) in human CD34+ cells: down-regulation upon myeloid differentiation. *Journal of leukocyte biology* 2004, **76**(5): 1057-1065.
169. Macian F. NFAT proteins: key regulators of T-cell development and function. *Nature reviews Immunology* 2005, **5**(6): 472-484.
170. Graef IA, Chen F, Crabtree GR. NFAT signaling in vertebrate development. *Current opinion in genetics & development* 2001, **11**(5): 505-512.
171. Serfling E, Avots A, Klein-Hessling S, Rudolf R, Vaeth M, Berberich-Siebelt F. NFATc1/alphaA: The other Face of NFAT Factors in Lymphocytes. *Cell communication and signaling : CCS* 2012, **10**(1): 16.
172. Miyakawa H, Woo SK, Dahl SC, Handler JS, Kwon HM. Tonicity-responsive enhancer binding protein, a rel-like protein that stimulates transcription in response to hypertonicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1999, **96**(5): 2538-2542.
173. Lopez-Rodriguez C, Aramburu J, Rakeman AS, Rao A. NFAT5, a constitutively nuclear NFAT protein that does not cooperate with Fos and Jun. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1999, **96**(13): 7214-7219.
174. Serfling E, Chuvpilo S, Liu J, Hofer T, Palmetshofer A. NFATc1 autoregulation: a crucial step for cell-fate determination. *Trends in immunology* 2006, **27**(10): 461-469.

175. Feske S, Okamura H, Hogan PG, Rao A. Ca²⁺/calcineurin signalling in cells of the immune system. *Biochemical and biophysical research communications* 2003, **311**(4): 1117-1132.
176. Jain J, McCaffrey PG, Valge-Archer VE, Rao A. Nuclear factor of activated T cells contains Fos and Jun. *Nature* 1992, **356**(6372): 801-804.
177. Avni O, Lee D, Macian F, Szabo SJ, Glimcher LH, Rao A. T(H) cell differentiation is accompanied by dynamic changes in histone acetylation of cytokine genes. *Nature immunology* 2002, **3**(7): 643-651.
178. Lee DU, Avni O, Chen L, Rao A. A distal enhancer in the interferon-gamma (IFN-gamma) locus revealed by genome sequence comparison. *The Journal of biological chemistry* 2004, **279**(6): 4802-4810.
179. Jin L, Sliz P, Chen L, Macian F, Rao A, Hogan PG, *et al.* An asymmetric NFAT1 dimer on a pseudo-palindromic kappa B-like DNA site. *Nature structural biology* 2003, **10**(10): 807-811.
180. Giffin MJ, Stroud JC, Bates DL, von Koenig KD, Hardin J, Chen L. Structure of NFAT1 bound as a dimer to the HIV-1 LTR kappa B element. *Nature structural biology* 2003, **10**(10): 800-806.
181. Okamura H, Garcia-Rodriguez C, Martinson H, Qin J, Virshup DM, Rao A. A conserved docking motif for CK1 binding controls the nuclear localization of NFAT1. *Molecular and cellular biology* 2004, **24**(10): 4184-4195.
182. Gwack Y, Sharma S, Nardone J, Tanasa B, Iuga A, Srikanth S, *et al.* A genome-wide Drosophila RNAi screen identifies DYRK-family kinases as regulators of NFAT. *Nature* 2006, **441**(7093): 646-650.
183. Beals CR, Sheridan CM, Turck CW, Gardner P, Crabtree GR. Nuclear export of NF-ATc enhanced by glycogen synthase kinase-3. *Science* 1997, **275**(5308): 1930-1934.
184. Huang GN, Huso DL, Bouyain S, Tu J, McCorkell KA, May MJ, *et al.* NFAT binding and regulation of T cell activation by the cytoplasmic scaffolding Homer proteins. *Science* 2008, **319**(5862): 476-481.
185. Aramburu J, Yaffe MB, Lopez-Rodriguez C, Cantley LC, Hogan PG, Rao A. Affinity-driven peptide selection of an NFAT inhibitor more selective than cyclosporin A. *Science* 1999, **285**(5436): 2129-2133.
186. Noguchi H, Matsushita M, Okitsu T, Moriwaki A, Tomizawa K, Kang S, *et al.* A new cell-permeable peptide allows successful allogeneic islet transplantation in mice. *Nature medicine* 2004, **10**(3): 305-309.
187. Frischbutter S, Gabriel C, Bendfeldt H, Radbruch A, Baumgrass R. Dephosphorylation of Bcl-10 by calcineurin is essential for canonical NF-kappaB activation in Th cells. *European journal of immunology* 2011, **41**(8): 2349-2357.

188. Chuvpilo S, Jankevics E, Tyrsin D, Akimzhanov A, Moroz D, Jha MK, *et al.* Autoregulation of NFATc1/A expression facilitates effector T cells to escape from rapid apoptosis. *Immunity* 2002, **16**(6): 881-895.
189. Serfling E, Berberich-Siebelt F, Chuvpilo S, Jankevics E, Klein-Hessling S, Twardzik T, *et al.* The role of NF-AT transcription factors in T cell activation and differentiation. *Biochimica et biophysica acta* 2000, **1498**(1): 1-18.
190. Terui Y, Saad N, Jia S, McKeon F, Yuan J. Dual role of sumoylation in the nuclear localization and transcriptional activation of NFAT1. *The Journal of biological chemistry* 2004, **279**(27): 28257-28265.
191. Nayak A, Glockner-Pagel J, Vaeth M, Schumann JE, Buttman M, Bopp T, *et al.* Sumoylation of the transcription factor NFATc1 leads to its subnuclear relocalization and interleukin-2 repression by histone deacetylase. *The Journal of biological chemistry* 2009, **284**(16): 10935-10946.
192. Gill G. Something about SUMO inhibits transcription. *Current opinion in genetics & development* 2005, **15**(5): 536-541.
193. Heissmeyer V, Macian F, Im SH, Varma R, Feske S, Venuprasad K, *et al.* Calcineurin imposes T cell unresponsiveness through targeted proteolysis of signaling proteins. *Nature immunology* 2004, **5**(3): 255-265.
194. Vaeth M, Schliesser U, Muller G, Reissig S, Satoh K, Tuettenberg A, *et al.* Dependence on nuclear factor of activated T-cells (NFAT) levels discriminates conventional T cells from Foxp3+ regulatory T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2012, **109**(40): 16258-16263.
195. Baine I, Abe BT, Macian F. Regulation of T-cell tolerance by calcium/NFAT signaling. *Immunological reviews* 2009, **231**(1): 225-240.
196. Berland R, Wortis HH. Normal B-1a cell development requires B cell-intrinsic NFATc1 activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2003, **100**(23): 13459-13464.
197. Xanthoudakis S, Viola JP, Shaw KT, Luo C, Wallace JD, Bozza PT, *et al.* An enhanced immune response in mice lacking the transcription factor NFAT1. *Science* 1996, **272**(5263): 892-895.
198. Yoshida H, Nishina H, Takimoto H, Marengere LE, Wakeham AC, Bouchard D, *et al.* The transcription factor NF-ATc1 regulates lymphocyte proliferation and Th2 cytokine production. *Immunity* 1998, **8**(1): 115-124.
199. Schuh K, Kneitz B, Heyer J, Bommhardt U, Jankevics E, Berberich-Siebelt F, *et al.* Retarded thymic involution and massive germinal center formation in NF-ATp-deficient mice. *European journal of immunology* 1998, **28**(8): 2456-2466.
200. Ranger AM, Hodge MR, Gravallesse EM, Oukka M, Davidson L, Alt FW, *et al.* Delayed lymphoid repopulation with defects in IL-4-driven responses produced by inactivation of NF-ATc. *Immunity* 1998, **8**(1): 125-134.

201. Peng SL, Gerth AJ, Ranger AM, Glimcher LH. NFATc1 and NFATc2 together control both T and B cell activation and differentiation. *Immunity* 2001, **14**(1): 13-20.
202. Oukka M, Ho IC, de la Brousse FC, Hoey T, Grusby MJ, Glimcher LH. The transcription factor NFAT4 is involved in the generation and survival of T cells. *Immunity* 1998, **9**(3): 295-304.
203. Ranger AM, Oukka M, Rengarajan J, Glimcher LH. Inhibitory function of two NFAT family members in lymphoid homeostasis and Th2 development. *Immunity* 1998, **9**(5): 627-635.
204. Rengarajan J, Tang B, Glimcher LH. NFATc2 and NFATc3 regulate T(H)2 differentiation and modulate TCR-responsiveness of naive T(H)cells. *Nature immunology* 2002, **3**(1): 48-54.
205. Rengarajan J, Mittelstadt PR, Mages HW, Gerth AJ, Kroczek RA, Ashwell JD, *et al.* Sequential involvement of NFAT and Egr transcription factors in FasL regulation. *Immunity* 2000, **12**(3): 293-300.
206. Brogdon JL, Leitenberg D, Bottomly K. The potency of TCR signaling differentially regulates NFATc/p activity and early IL-4 transcription in naive CD4+ T cells. *Journal of immunology* 2002, **168**(8): 3825-3832.
207. Purvis HA, Stoop JN, Mann J, Woods S, Kozijn AE, Hambleton S, *et al.* Low-strength T-cell activation promotes Th17 responses. *Blood* 2010, **116**(23): 4829-4837.
208. Hermann-Kleiter N, Baier G. NFAT pulls the strings during CD4+ T helper cell effector functions. *Blood* 2010, **115**(15): 2989-2997.
209. Kiani A, Garcia-Cozar FJ, Habermann I, Laforsch S, Aebischer T, Ehninger G, *et al.* Regulation of interferon-gamma gene expression by nuclear factor of activated T cells. *Blood* 2001, **98**(5): 1480-1488.
210. Campbell PM, Pimm J, Ramassar V, Halloran PF. Identification of a calcium-inducible, cyclosporine sensitive element in the IFN-gamma promoter that is a potential NFAT binding site. *Transplantation* 1996, **61**(6): 933-939.
211. Balasubramani A, Mukasa R, Hatton RD, Weaver CT. Regulation of the Ifng locus in the context of T-lineage specification and plasticity. *Immunological reviews* 2010, **238**(1): 216-232.
212. Porter CM, Clipstone NA. Sustained NFAT signaling promotes a Th1-like pattern of gene expression in primary murine CD4+ T cells. *Journal of immunology* 2002, **168**(10): 4936-4945.
213. Agarwal S, Avni O, Rao A. Cell-type-restricted binding of the transcription factor NFAT to a distal IL-4 enhancer in vivo. *Immunity* 2000, **12**(6): 643-652.
214. Ansel KM, Djuretic I, Tanasa B, Rao A. Regulation of Th2 differentiation and Il4 locus accessibility. *Annual review of immunology* 2006, **24**: 607-656.

215. Lee CG, Kang KH, So JS, Kwon HK, Son JS, Song MK, *et al.* A distal cis-regulatory element, CNS-9, controls NFAT1 and IRF4-mediated IL-10 gene activation in T helper cells. *Molecular immunology* 2009, **46**(4): 613-621.
216. Kiani A, Viola JP, Lichtman AH, Rao A. Down-regulation of IL-4 gene transcription and control of Th2 cell differentiation by a mechanism involving NFAT1. *Immunity* 1997, **7**(6): 849-860.
217. Gomez-Rodriguez J, Sahu N, Handon R, Davidson TS, Anderson SM, Kirby MR, *et al.* Differential expression of interleukin-17A and -17F is coupled to T cell receptor signaling via inducible T cell kinase. *Immunity* 2009, **31**(4): 587-597.
218. Liu XK, Lin X, Gaffen SL. Crucial role for nuclear factor of activated T cells in T cell receptor-mediated regulation of human interleukin-17. *The Journal of biological chemistry* 2004, **279**(50): 52762-52771.
219. Ghosh S, Koralov SB, Stevanovic I, Sundrud MS, Sasaki Y, Rajewsky K, *et al.* Hyperactivation of nuclear factor of activated T cells 1 (NFAT1) in T cells attenuates severity of murine autoimmune encephalomyelitis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2010, **107**(34): 15169-15174.
220. 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. *Nature immunology* 2007, **8**(9): 958-966.
221. Hu CM, Jang SY, Fanzo JC, Pernis AB. Modulation of T cell cytokine production by interferon regulatory factor-4. *The Journal of biological chemistry* 2002, **277**(51): 49238-49246.
222. Kim HP, Korn LL, Gamero AM, Leonard WJ. Calcium-dependent activation of interleukin-21 gene expression in T cells. *The Journal of biological chemistry* 2005, **280**(26): 25291-25297.
223. Zheng Y, Josefowicz S, Chaudhry A, Peng XP, Forbush K, Rudensky AY. Role of conserved non-coding DNA elements in the Foxp3 gene in regulatory T-cell fate. *Nature* 2010, **463**(7282): 808-812.
224. Tone Y, Furuuchi K, Kojima Y, Tykocinski ML, Greene MI, Tone M. Smad3 and NFAT cooperate to induce Foxp3 expression through its enhancer. *Nature immunology* 2008, **9**(2): 194-202.
225. Bopp T, Palmetshofer A, Serfling E, Heib V, Schmitt S, Richter C, *et al.* NFATc2 and NFATc3 transcription factors play a crucial role in suppression of CD4+ T lymphocytes by CD4+ CD25+ regulatory T cells. *The Journal of experimental medicine* 2005, **201**(2): 181-187.
226. Bettelli E, Baeten D, Jager A, Sobel RA, Kuchroo VK. Myelin oligodendrocyte glycoprotein-specific T and B cells cooperate to induce a Devic-like disease in mice. *The Journal of clinical investigation* 2006, **116**(9): 2393-2402.

227. Lee PP, Fitzpatrick DR, Beard C, Jessup HK, Lehar S, Makar KW, *et al.* A critical role for Dnmt1 and DNA methylation in T cell development, function, and survival. *Immunity* 2001, **15**(5): 763-774.
228. Sawada S, Scarborough JD, Killeen N, Littman DR. A lineage-specific transcriptional silencer regulates CD4 gene expression during T lymphocyte development. *Cell* 1994, **77**(6): 917-929.
229. Feske S, Giltnane J, Dolmetsch R, Staudt LM, Rao A. Gene regulation mediated by calcium signals in T lymphocytes. *Nature immunology* 2001, **2**(4): 316-324.
230. Feske S. Calcium signalling in lymphocyte activation and disease. *Nature reviews Immunology* 2007, **7**(9): 690-702.
231. Morgan AJ, Jacob R. Ionomycin enhances Ca²⁺ influx by stimulating store-regulated cation entry and not by a direct action at the plasma membrane. *The Biochemical journal* 1994, **300 (Pt 3)**: 665-672.
232. Yang XO, Pappu BP, Nurieva R, Akimzhanov A, Kang HS, Chung Y, *et al.* T helper 17 lineage differentiation is programmed by orphan nuclear receptors ROR alpha and ROR gamma. *Immunity* 2008, **28**(1): 29-39.
233. Szabo SJ, Kim ST, Costa GL, Zhang X, Fathman CG, Glimcher LH. A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell* 2000, **100**(6): 655-669.
234. Fletcher JM, Lalor SJ, Sweeney CM, Tubridy N, Mills KH. T cells in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *Clinical and experimental immunology* 2010, **162**(1): 1-11.
235. Rodgers JM, Miller SD. Cytokine control of inflammation and repair in the pathology of multiple sclerosis. *The Yale journal of biology and medicine* 2012, **85**(4): 447-468.
236. Codarri L, Gyulveszi G, Tosevski V, Hesske L, Fontana A, Magrenat L, *et al.* RORgammat drives production of the cytokine GM-CSF in helper T cells, which is essential for the effector phase of autoimmune neuroinflammation. *Nature immunology* 2011, **12**(6): 560-567.
237. Bai L, Lennon DP, Eaton V, Maier K, Caplan AI, Miller SD, *et al.* Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells induce Th2-polarized immune response and promote endogenous repair in animal models of multiple sclerosis. *Glia* 2009, **57**(11): 1192-1203.
238. Young DA, Lowe LD, Booth SS, Whitters MJ, Nicholson L, Kuchroo VK, *et al.* IL-4, IL-10, IL-13, and TGF-beta from an altered peptide ligand-specific Th2 cell clone down-regulate adoptive transfer of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of immunology* 2000, **164**(7): 3563-3572.
239. Cua DJ, Hinton DR, Stohlman SA. Self-antigen-induced Th2 responses in experimental allergic encephalomyelitis (EAE)-resistant mice. Th2-mediated suppression of autoimmune disease. *Journal of immunology* 1995, **155**(8): 4052-4059.

240. Constantinescu CS, Hilliard B, Ventura E, Wysocka M, Showe L, Lavi E, *et al.* Modulation of susceptibility and resistance to an autoimmune model of multiple sclerosis in prototypically susceptible and resistant strains by neutralization of interleukin-12 and interleukin-4, respectively. *Clinical immunology (Orlando, Fla)* 2001, **98**(1): 23-30.
241. Petermann F, Korn T. Cytokines and effector T cell subsets causing autoimmune CNS disease. *FEBS letters* 2011, **585**(23): 3747-3757.
242. Almolda B, Gonzalez B, Castellano B. Antigen presentation in EAE: role of microglia, macrophages and dendritic cells. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 2011, **16**: 1157-1171.
243. Rahemtulla A, Fung-Leung WP, Schilham MW, Kundig TM, Sambhara SR, Narendran A, *et al.* Normal development and function of CD8+ cells but markedly decreased helper cell activity in mice lacking CD4. *Nature* 1991, **353**(6340): 180-184.
244. Biswas PS, Gupta S, Stirzaker RA, Kumar V, Jessberger R, Lu TT, *et al.* Dual regulation of IRF4 function in T and B cells is required for the coordination of T-B cell interactions and the prevention of autoimmunity. *The Journal of experimental medicine* 2012, **209**(3): 581-596.
245. Burchill MA, Yang J, Vang KB, Farrar MA. Interleukin-2 receptor signaling in regulatory T cell development and homeostasis. *Immunology letters* 2007, **114**(1): 1-8.
246. Laurence A, Tato CM, Davidson TS, Kanno Y, Chen Z, Yao Z, *et al.* Interleukin-2 signaling via STAT5 constrains T helper 17 cell generation. *Immunity* 2007, **26**(3): 371-381.
247. Stockinger B. Good for Goose, but not for Gander: IL-2 interferes with Th17 differentiation. *Immunity* 2007, **26**(3): 278-279.
248. Guo Z, Khattar M, Schroder PM, Miyahara Y, Wang G, He X, *et al.* A dynamic dual role of IL-2 signaling in the two-step differentiation process of adaptive regulatory T cells. *Journal of immunology* 2013, **190**(7): 3153-3162.
249. Horwitz DA, Zheng SG, Wang J, Gray JD. Critical role of IL-2 and TGF-beta in generation, function and stabilization of Foxp3+CD4+ Treg. *European journal of immunology* 2008, **38**(4): 912-915.
250. Liao W, Lin JX, Leonard WJ. IL-2 family cytokines: new insights into the complex roles of IL-2 as a broad regulator of T helper cell differentiation. *Current opinion in immunology* 2011, **23**(5): 598-604.
251. Meulmeester E, Melchior F. Cell biology: SUMO. *Nature* 2008, **452**(7188): 709-711.
252. Sica A, Dorman L, Viggiano V, Cippitelli M, Ghosh P, Rice N, *et al.* Interaction of NF-kappaB and NFAT with the interferon-gamma promoter. *The Journal of biological chemistry* 1997, **272**(48): 30412-30420.

253. 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. *Journal of immunology* 2002, **169**(9): 4712-4716.
254. Huber S, Gagliani N, Esplugues E, O'Connor W, Jr., Huber FJ, Chaudhry A, *et al.* Th17 cells express interleukin-10 receptor and are controlled by Foxp3(-) and Foxp3+ regulatory CD4+ T cells in an interleukin-10-dependent manner. *Immunity* 2011, **34**(4): 554-565.
255. Chaudhry A, Samstein RM, Treuting P, Liang Y, Pils MC, Heinrich JM, *et al.* Interleukin-10 signaling in regulatory T cells is required for suppression of Th17 cell-mediated inflammation. *Immunity* 2011, **34**(4): 566-578.
256. Mombaerts P. Lymphocyte development and function in T-cell receptor and RAG-1 mutant mice. *International reviews of immunology* 1995, **13**(1): 43-63.
257. Buch T, Uthoff-Hachenberg C, Waisman A. Protection from autoimmune brain inflammation in mice lacking IFN-regulatory factor-1 is associated with Th2-type cytokines. *International immunology* 2003, **15**(7): 855-859.
258. Gimsa U, Wolf SA, Haas D, Bechmann I, Nitsch R. Th2 cells support intrinsic anti-inflammatory properties of the brain. *Journal of neuroimmunology* 2001, **119**(1): 73-80.
259. Mekala DJ, Alli RS, Geiger TL. IL-10-dependent suppression of experimental allergic encephalomyelitis by Th2-differentiated, anti-TCR redirected T lymphocytes. *Journal of immunology* 2005, **174**(6): 3789-3797.
260. Feske S, Draeger R, Peter HH, Eichmann K, Rao A. The duration of nuclear residence of NFAT determines the pattern of cytokine expression in human SCID T cells. *Journal of immunology* 2000, **165**(1): 297-305.
261. Macian F, Lopez-Rodriguez C, Rao A. Partners in transcription: NFAT and AP-1. *Oncogene* 2001, **20**(19): 2476-2489.
262. Lodygin D, Odoardi F, Schlager C, Korner H, Kitz A, Nosov M, *et al.* A combination of fluorescent NFAT and H2B sensors uncovers dynamics of T cell activation in real time during CNS autoimmunity. *Nature medicine* 2013, **19**(6): 784-790.
263. Schuh K, Kneitz B, Heyer J, Siebelt F, Fischer C, Jankevics E, *et al.* NF-ATp plays a prominent role in the transcriptional induction of Th2-type lymphokines. *Immunology letters* 1997, **57**(1-3): 171-175.
264. Hodge MR, Ranger AM, Charles de la Brousse F, Hoey T, Grusby MJ, Glimcher LH. Hyperproliferation and dysregulation of IL-4 expression in NF-ATp-deficient mice. *Immunity* 1996, **4**(4): 397-405.
265. Hock M, Vaeth M, Rudolf R, Patra AK, Pham DA, Muhammad K, *et al.* NFATc1 induction in peripheral T and B lymphocytes. *Journal of immunology* 2013, **190**(5): 2345-2353.

266. Kim HP, Imbert J, Leonard WJ. Both integrated and differential regulation of components of the IL-2/IL-2 receptor system. *Cytokine & growth factor reviews* 2006, **17**(5): 349-366.
267. Kim HP, Leonard WJ. The basis for TCR-mediated regulation of the IL-2 receptor alpha chain gene: role of widely separated regulatory elements. *The EMBO journal* 2002, **21**(12): 3051-3059.
268. Schuh K, Twardzik T, Kneitz B, Heyer J, Schimpl A, Serfling E. The interleukin 2 receptor alpha chain/CD25 promoter is a target for nuclear factor of activated T cells. *The Journal of experimental medicine* 1998, **188**(7): 1369-1373.
269. Becher B, Segal BM. T(H)17 cytokines in autoimmune neuro-inflammation. *Current opinion in immunology* 2011, **23**(6): 707-712.
270. Komiyama Y, Nakae S, Matsuki T, Nambu A, Ishigame H, Kakuta S, *et al.* IL-17 plays an important role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of immunology* 2006, **177**(1): 566-573.
271. Haak S, Croxford AL, Kreymborg K, Heppner FL, Pouly S, Becher B, *et al.* IL-17A and IL-17F do not contribute vitally to autoimmune neuro-inflammation in mice. *The Journal of clinical investigation* 2009, **119**(1): 61-69.
272. El-Behi M, Ciric B, Dai H, Yan Y, Cullimore M, Safavi F, *et al.* The encephalitogenicity of T(H)17 cells is dependent on IL-1- and IL-23-induced production of the cytokine GM-CSF. *Nature immunology* 2011, **12**(6): 568-575.
273. McQualter JL, Darwiche R, Ewing C, Onuki M, Kay TW, Hamilton JA, *et al.* Granulocyte macrophage colony-stimulating factor: a new putative therapeutic target in multiple sclerosis. *The Journal of experimental medicine* 2001, **194**(7): 873-882.
274. Karpus WJ, Gould KE, Swanborg RH. CD4+ suppressor cells of autoimmune encephalomyelitis respond to T cell receptor-associated determinants on effector cells by interleukin-4 secretion. *European journal of immunology* 1992, **22**(7): 1757-1763.
275. Bettelli E, Das MP, Howard ED, Weiner HL, Sobel RA, Kuchroo VK. IL-10 is critical in the regulation of autoimmune encephalomyelitis as demonstrated by studies of IL-10- and IL-4-deficient and transgenic mice. *Journal of immunology* 1998, **161**(7): 3299-3306.
276. Couper KN, Blount DG, Riley EM. IL-10: the master regulator of immunity to infection. *Journal of immunology* 2008, **180**(9): 5771-5777.
277. Kaminuma O, Kitamura F, Kitamura N, Hiroi T, Miyoshi H, Miyawaki A, *et al.* Differential contribution of NFATc2 and NFATc1 to TNF-alpha gene expression in T cells. *Journal of immunology* 2008, **180**(1): 319-326.
278. Diehl S, Rincon M. The two faces of IL-6 on Th1/Th2 differentiation. *Molecular immunology* 2002, **39**(9): 531-536.

279. Zhu J, Yamane H, Paul WE. Differentiation of effector CD4 T cell populations (*). *Annual review of immunology* 2010, **28**: 445-489.
280. O'Shea JJ, Steward-Tharp SM, Laurence A, Watford WT, Wei L, Adamson AS, *et al.* Signal transduction and Th17 cell differentiation. *Microbes and infection / Institut Pasteur* 2009, **11**(5): 599-611.
281. Yu H, van Berkel TJ, Biessen EA. Therapeutic potential of VIVIT, a selective peptide inhibitor of nuclear factor of activated T cells, in cardiovascular disorders. *Cardiovascular drug reviews* 2007, **25**(2): 175-187.
282. Kuriyama M, Matsushita M, Tateishi A, Moriwaki A, Tomizawa K, Ishino K, *et al.* A cell-permeable NFAT inhibitor peptide prevents pressure-overload cardiac hypertrophy. *Chemical biology & drug design* 2006, **67**(3): 238-243.
283. Choi JM, Sohn JH, Park TY, Park JW, Lee SK. Cell permeable NFAT inhibitory peptide Sim-2-VIVIT inhibits T-cell activation and alleviates allergic airway inflammation and hyper-responsiveness. *Immunology letters* 2012, **143**(2): 170-176.
284. Elloumi HZ, Maharshak N, Rao KN, Kobayashi T, Ryu HS, Muhlbauer M, *et al.* A cell permeable peptide inhibitor of NFAT inhibits macrophage cytokine expression and ameliorates experimental colitis. *PloS one* 2012, **7**(3): e34172.
285. Racke MK, Lovett-Racke AE, Karandikar NJ. The mechanism of action of glatiramer acetate treatment in multiple sclerosis. *Neurology* 2010, **74 Suppl 1**: S25-30.
286. 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. *Journal of immunology* 2003, **170**(9): 4483-4488.
287. Podojil JR, Padval MV, Miller SD. Combination treatment of mice with CRx-153 (nortriptyline and desloratadine) decreases the severity of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Cellular immunology* 2011, **270**(2): 237-250.
288. Notarangelo LD. Partial defects of T-cell development associated with poor T-cell function. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2013, **131**(5): 1297-1305.
289. Martinez-Martinez S, Rodriguez A, Lopez-Maderuelo MD, Ortega-Perez I, Vazquez J, Redondo JM. Blockade of NFAT activation by the second calcineurin binding site. *The Journal of biological chemistry* 2006, **281**(10): 6227-6235.
290. Rodriguez A, Roy J, Martinez-Martinez S, Lopez-Maderuelo MD, Nino-Moreno P, Orti L, *et al.* A conserved docking surface on calcineurin mediates interaction with substrates and immunosuppressants. *Molecular cell* 2009, **33**(5): 616-626.
291. Rodriguez A, Martinez-Martinez S, Lopez-Maderuelo MD, Ortega-Perez I, Redondo JM. The linker region joining the catalytic and the regulatory domains of CnA is essential for binding to NFAT. *The Journal of biological chemistry* 2005, **280**(11): 9980-9984.

292. Yang XP, Ghoreschi K, Steward-Tharp SM, Rodriguez-Canales J, Zhu J, Grainger JR, *et al.* Opposing regulation of the locus encoding IL-17 through direct, reciprocal actions of STAT3 and STAT5. *Nature immunology* 2011, **12**(3): 247-254.
293. Liao W, Lin JX, Wang L, Li P, Leonard WJ. Modulation of cytokine receptors by IL-2 broadly regulates differentiation into helper T cell lineages. *Nature immunology* 2011, **12**(6): 551-559.
294. Papiernik M, de Moraes ML, Pontoux C, Vasseur F, Penit C. Regulatory CD4 T cells: expression of IL-2R alpha chain, resistance to clonal deletion and IL-2 dependency. *International immunology* 1998, **10**(4): 371-378.
295. Maloy KJ, Powrie F. Fueling regulation: IL-2 keeps CD4+ Treg cells fit. *Nature immunology* 2005, **6**(11): 1071-1072.
296. Xu L, Kitani A, Fuss I, Strober W. Cutting edge: regulatory T cells induce CD4+CD25-Foxp3- T cells or are self-induced to become Th17 cells in the absence of exogenous TGF-beta. *Journal of immunology* 2007, **178**(11): 6725-6729.
297. Rouse M, Nagarkatti M, Nagarkatti PS. The role of IL-2 in the activation and expansion of regulatory T-cells and the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Immunobiology* 2013, **218**(4): 674-682.
298. Liu X, Li H, Zhong B, Blonska M, Gorjestani S, Yan M, *et al.* USP18 inhibits NF-kappaB and NFAT activation during Th17 differentiation by deubiquitinating the TAK1-TAB1 complex. *The Journal of experimental medicine* 2013, **210**(8): 1575-1590.
299. Johnson ES. Protein modification by SUMO. *Annual review of biochemistry* 2004, **73**: 355-382.
300. Albrow VE, Ponder EL, Fasci D, Bekes M, Deu E, Salvesen GS, *et al.* Development of small molecule inhibitors and probes of human SUMO deconjugating proteases. *Chemistry & biology* 2011, **18**(6): 722-732.
301. Kumar A, Ito A, Hirohama M, Yoshida M, Zhang KY. Identification of sumoylation activating enzyme 1 inhibitors by structure-based virtual screening. *Journal of chemical information and modeling* 2013, **53**(4): 809-820.
302. Kim YS, Nagy K, Keyser S, Schneekloth JS, Jr. An electrophoretic mobility shift assay identifies a mechanistically unique inhibitor of protein sumoylation. *Chemistry & biology* 2013, **20**(4): 604-613.
303. Wang J. SUMO conjugation and cardiovascular development. *Frontiers in bioscience (Landmark edition)* 2009, **14**: 1219-1229.

Anhang

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AP-1	<i>Activating Protein 1</i>
APC	Antigen präsentierende Zelle
ATP	Adenosin-Tri-Phosphat
BCR	B-Zell Rezeptor (<i>B cell receptor</i>)
BHS	Blut-Hirn-Schranke
BSA	Bovines Serumalbumin
BSS	<i>balanced salt solution</i>
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CD	Differenzierungsantigen (<i>cluster of differentiation</i>)
ChIP	Chromatin-Immunpräzipitation
Ci	Curie
CRAC	<i>Calcium release activated channel</i>
Cre	<i>causes/circular recombination</i>
CsA	Cyclosporin A
°C	Grad Celsius
d	Tag
DAG	Diacylglycerol
d. h.	das heißt
DKO	doppelter <i>knock-out</i>
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothieitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EAE	Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ER	Endoplasmatisches Retikulum

<i>et al.</i>	et aliter
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i>
FCS	Fötales Kälberserum (fetal calf serum)
FITC	Fluoreszein-Isothiocyanat
Foxp3	<i>forkhead box P3</i>
g	Gramm
GM-CSF	<i>granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i>
GSK3 β	Glykogen-Synthase Kinase 3 β
h	Stunden
HDAC	Histon-Deacetylase
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
InsP ₃	Inositol-1,4,5-Triphosphat
Iono	Ionomycin
IPEX	<i>immunodysregulation, polyendokrinopathy X-linked syndrom</i>
ITAM	<i>immunereceptor tyrosine-based activation motifs</i>
i.p.	intraperitoneal
iTreg	induzierte regulatorische T-Zelle
i.v.	intravenös
JNK	c-Jun N-terminal kinase
KO	<i>knock-out</i>
l	Liter
ml	Milliliter
MAPK MAP	Kinase (<i>mitogen activated protein kinases</i>)
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
min	Minuten
MS	Multiple Sklerose
mol	Teilchenzahl in 12 g Kohlenstoff (Isotop ¹² C)
NFAT	<i>nuclear factor of activated T cells</i>
NF- κ B	<i>nuclear factor κB</i>
NLS	<i>nuclear localization signal</i>
nTreg	natürliche regulatorische T-Zelle

OD	Optische Dichte
PAMPs	<i>pathogen-associated molecular patterns</i>
PBS	Phosphat-Puffer (<i>phosphate-buffered saline</i>)
PE	Phycoerythrin
PDE	Phosphodiesterase
PFA	Paraformaldehyd
PKC	Proteinkinase C
PLC γ	Phospholipase C γ
PRRs	<i>Pattern-recognition receptors</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RPMI	Roswell Park Memorial Institute, ein Zellkulturmedium
RSD	<i>rel similarity domain</i>
Rag	<i>recombination gene</i>
rpm	<i>rotations per minutes</i>
RT	Raumtemperatur (~20°C)
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SRRs	<i>serine rich repeats</i>
STAT	<i>signal transducer and activator of transcription</i>
STIM	<i>stromal interaction molecule</i>
TAD	Transaktivierungsdomäne (<i>transactivation domain</i>)
TBS	Tris-Puffer (<i>Tris-buffered saline</i>)
TCR	T-Zell Rezeptor (<i>T cell receptor</i>)
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Th	Helfer-T-Zelle
TGF β	<i>transforming growth factor β</i>
TNF α	Tumor Nekrose Faktor α
TonEBP	<i>tonicity element binding protein</i>
TPA	Phorbolster (12-0-Tetradecanoylphorbol-13-acetat)
Treg	regulatorische T-Zelle
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Unit
ÜN	über Nacht
V	Volt
z. B.	zum Beispiel

ZNS	Zentrales Nervensystem
z. Z	zur Zeit

Einheiten

k	Kilo (10^3)
m	Milli (10^{-3})
μ	Mikro (10^{-6})
n	Nano (10^{-9})
p	Piko (10^{-12})