

Aus dem Institut für
Zelluläre und Molekulare Immunologie
(Prof. Dr. rer. nat. J. Wienands)
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**Die Rolle des antiapoptotischen Gens
Gimap5 für die Pathogenese
neuroinflammatorischer Erkrankungen**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät der
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Ann-Kathrin Witte

aus

Hannover

Göttingen 2017

Dekan:	Prof. Dr. rer. nat. Heyo K. Kroemer
Referent	Prof. Dr. rer. nat. Holger M. Reichardt
Ko-Referent:	PD Dr. rer. nat. Fred Lühder
Promotor-Vertretung:	Prof. Dr. mult. Thomas Meyer

Datum der mündlichen Prüfung: 09.11.2017

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "Die Rolle des antiapoptotischen Gens *Gimap5* für die Pathogenese neuroinflammatorischer Erkrankungen" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben. Ein Teil der Ergebnisse dieser Dissertation wurden bereits veröffentlicht (Fischer et al., 2016).

Göttingen, den
(Unterschrift)

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	V
Abkürzungsverzeichnis	VI
1 Einleitung	1
1.1 <i>Die Rolle der T-Zellen in der Immunantwort.....</i>	<i>1</i>
1.2 <i>T-Helfer-Zellen spielen eine wichtige Rolle in der Pathogenese vieler Autoimmunerkrankungen</i>	<i>4</i>
1.3 <i>Lymphopenie erhöht die Neigung zur Autoimmunität.....</i>	<i>5</i>
1.4 <i>Gimap5-Defizienz als Ursache für Lymphopenie und Autoimmunität.....</i>	<i>7</i>
1.5 <i>In PVG-Ratten führt eine Gimap5-Defizienz zu einer spontanen eosinophilen Gastroenteritis.....</i>	<i>10</i>
1.6 <i>Die Darmflora hat einen regulatorischen Effekt auf das Immunsystem</i>	<i>12</i>
1.7 <i>Multiple Sklerose</i>	<i>14</i>
1.8 <i>Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis als Tiermodell der Multiplen Sklerose.....</i>	<i>16</i>
1.9 <i>Zielsetzung</i>	<i>19</i>
2 Material und Methoden.....	20
2.1 <i>Allgemeine Hilfsmittel</i>	<i>20</i>
2.2 <i>Verbrauchsmaterialien.....</i>	<i>21</i>
2.3 <i>Chemikalien und Pufferzusätze</i>	<i>22</i>
2.4 <i>Oligonukleotide.....</i>	<i>23</i>
2.5 <i>Medien und Lösungen</i>	<i>24</i>
2.5.1 <i>Zellkultur</i>	<i>24</i>
2.5.2 <i>MACS® T-Zell-Isolation</i>	<i>24</i>
2.5.3 <i>Durchflusszytometrie.....</i>	<i>25</i>
2.6 <i>Antikörper und Reagenzien</i>	<i>25</i>
2.6.1 <i>Durchflusszytometrie: Antikörper und Färbungen.....</i>	<i>25</i>
2.6.2 <i>MACS® CD4+ Isolation</i>	<i>27</i>

2.6.3	Reagenzien für die T-Zell-Aktivierung	27
2.7	<i>Enzyme und Kits</i>	28
2.8	<i>Antibiotikum</i>	28
2.9	<i>Anästhesie</i>	28
2.9.1	Inhalationsanästhesie	28
2.10	<i>Software</i>	28
2.11	<i>Tiere</i>	29
2.12	<i>Tierexperimente</i>	29
2.12.1	Aktive Induktion der EAE.....	29
2.12.2	Bewertung der Krankheitssymptome.....	29
2.12.3	Antibiotikabehandlung.....	30
2.13	<i>Organentnahmen</i>	30
2.14	<i>Zelluläre Methoden</i>	31
2.14.1	Serumgewinnung	31
2.14.2	Lymphozytenisolation.....	31
2.14.3	T-Zell-Isolation	33
2.14.4	T-Zell-Transfer	34
2.14.5	Durchflusszytometrie.....	34
2.15	<i>Molekulare Methoden</i>	36
2.15.1	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	36
2.15.2	Gelelektrophorese.....	36
2.15.3	RNA-Isolation.....	37
2.15.4	cDNA-Synthese.....	37
2.15.5	quantitative Echtzeit-PCR (qrtPCR).....	38
2.15.6	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)	39
2.15.7	Cytometric Bead Array (CBA).....	41
2.16	<i>Statistik</i>	42
3	Ergebnisse	43
3.1	<i>Gimap5-defiziente Ratten zeigen eine schwere T-Zell-Lymphopenie</i>	43
3.2	<i>Folgen der Gimap5-Defizienz für Proliferation, Überleben und das TCR-Repertoire der T-Zellen</i>	46
3.2.1	Gimap5-defiziente T-Zellen zeigen eine erhöhte Apoptoserate	46
3.2.2	Naive Gimap5-defiziente CD4 ⁺ -T-Zellen durchlaufen einen beschleunigten Zellzyklus.....	47
3.2.3	Gimap5-defiziente T-Zellen zeigen ein verändertes V β -Spektrum.....	48
3.2.4	Anreicherung aktivierter T-Zellen in der Peripherie	49
3.3	<i>Phänotypische Auswirkungen einer Gimap5-Defizienz auf den Magen-Darm-Trakt</i>	51

3.3.1	Gimap5-defiziente Ratten entwickeln spontan massiven Durchfall und morphologische Störungen im Gastrointestinaltrakt.....	51
3.3.2	Eine Gimap5-Defizienz in Lewis-Ratten führt zu erhöhten Serum-Antikörper-Titern von IgE, aber nicht IgG.....	53
3.3.3	Gimap5-defiziente Ratten sind durch ein TH2-Zytokin-Milieu gekennzeichnet	54
3.4	<i>Eine Antibiotikabehandlung mit Enrofloxacin mildert den Darmphänotyp Gimap5-defizienter Ratten.....</i>	56
3.4.1	Die Enrofloxacin-Behandlung vermindert die Infiltration von Eosinophilen in die Darmschleimhaut.....	56
3.4.2	Eine Antibiotikabehandlung verhindert den starken Anstieg der IgE-Serum-Titer in Gimap5-defizienten Tieren.....	57
3.5	<i>Der Einfluss der Gimap5-Defizienz auf die EAE</i>	58
3.5.1	Die Gimap5-Defizienz in Lewis-Ratten führt zu einem schwereren Krankheitsverlauf einer aktiv mit gpMBP induzierten EAE	58
3.5.2	Charakterisierung der das Rückenmark infiltrierenden Lymphozyten	59
3.6	<i>Der Verlauf der EAE in Gimap5-defizienten Ratten wird durch eine antibiotische Behandlung nicht beeinflusst.....</i>	59
3.7	<i>Der Transfer von wildtypischen T-Zellen in Gimap5-defiziente Lewis-Ratten mildert den EAE-Verlauf</i>	60
4	Diskussion	63
4.1	<i>Die Auswirkungen einer Gimap5-Defizienz auf den Immunstatus</i>	64
4.2	<i>Der genetische Hintergrund bestimmt über den Phänotyp der Autoimmunerkrankung</i>	66
4.3	<i>Die Gimap5-Defizienz verstärkt den EAE-Verlauf</i>	68
4.4	<i>Die Darmflora beeinflusst die Entwicklung einer eosinophilen Gastroenteritis, jedoch nicht die der EAE</i>	70
4.5	<i>Ein T-Zell-Transfer lindert den Verlauf der EAE</i>	73
5	Zusammenfassung	75
6	Literaturverzeichnis.....	76
7	Anhang	84

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Signalkaskaden der Apoptose in Lymphozyten.....	8
Abbildung 2: Gradient nach Zentrifugation	33
Abbildung 3:Gimap5-defiziente Ratten zeigen eine T-Zell-Lymphopenie sowie einen relativen Mangel an CD8 ⁺ -T-Zellen im Blut.	43
Abbildung 4: Gimap5-defiziente Tiere weisen in den Lymphknoten eine T-Zell-Lymphopenie auf.	44
Abbildung 5: Gimap5-defiziente Ratten besitzen einen normalen Anteil regulatorischer T-Zellen.	45
Abbildung 6: Gimap5-defiziente T-Zellen zeigen eine stark erhöhte Spontan-Apoptoserate	46
Abbildung 7: Naive T-Zellen Gimap5-defizienter Ratten zeigen eine erhöhte Expression von Kontrollproteinen des Zellzyklus.....	47
Abbildung 8: Gimap5-defiziente T-Zellen zeigen ein verändertes V β -Spektrum in den Lymphknoten aber nicht im Thymus.....	48
Abbildung 9: Gimap5-defiziente T-Lymphozyten weisen in den peripheren lymphatischen Organen einen aktivierten Phänotyp auf.....	50
Abbildung 10: Gimap5-defiziente Ratten entwickeln spontan eine Gastroenteritis.....	51
Abbildung 11: Die Darmwand Gimap5-defizienter Tiere zeigt histologisch eine massive Infiltration eosinophiler Granulozyten.	52
Abbildung 12: Gimap5-defiziente Ratten weisen altersabhängig erhöhte IgE-, aber nicht IgG-Antikörper-Titer im Serum auf.....	54
Abbildung 13: <i>In vitro</i> costimulierte Gimap5-defiziente CD4 ⁺ -T-Zellen weisen eine TH2-Polarisation auf.	55
Abbildung 14: Eine Antibiotikabehandlung mildert die Infiltration eosinophiler Granulozyten in die Darmwand Gimap5-defizienter Tiere.	56
Abbildung 15: Eine Antibiotikabehandlung senkt die IgE-Titer in Gimap5-defizienten Tieren.	57
Abbildung 16: Gimap5-defiziente Ratten entwickeln eine schwerere EAE als Kontrolltiere.....	58

Abbildung 17: Analyse der das Rückenmark am Höhepunkt der EAE infiltrierenden Lymphozyten.	59
Abbildung 18: Der EAE-Verlauf bei Gimap5-defizienten Ratten wird von einer Antibiotikabehandlung nicht beeinflusst.	60
Abbildung 19: Ein adoptiver Transfer von GFP ⁺ wildtypischen T-Zellen in Gimap5-defiziente Ratten reduziert die Lymphopenie.	61
Abbildung 20: Ein T-Zell-Transfer in Gimap5-defiziente Ratten führt zu einem milderen EAE-Verlauf	62

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Allgemeine Hilfsmittel.....	20
Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien	21
Tabelle 3: Chemikalien und Zusätze	22
Tabelle 4: Primer für die qrt-PCR	23
Tabelle 5: Zellkulturmedien und -lösungen	24
Tabelle 6: MACS-Puffer	24
Tabelle 7: Puffer und Medien für die Durchflusszytometrie.....	25
Tabelle 8: Antikörper für die Durchflusszytometrie	25
Tabelle 9: MACS [®] technology microbeads	27
Tabelle 10 Klassifikation der Krankheitsstadien.....	30
Tabelle 11: PCR-Protokoll	36
Tabelle 12: qrtPCR-Protokoll.....	38
Tabelle 13: Standards IgE-ELISA.....	39
Tabelle 14: Standards IgG-ELISA	40
Tabelle 15 Standards Cytometric Bead Array.....	41

Abkürzungsverzeichnis

7-AAD	7-Aminoactinomycin
APC	Antigen-präsentierende Zelle
BB	BioBreeding
BHS	Blut-Hirn-Schranke
Bcl	<i>B-cell lymphoma</i>
BSS	<i>balanced salt solution</i>
CBA	<i>cytometric bead array</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CFA	<i>complete Freund's adjuvant</i>
DC	dendritische Zelle
DM	Diabetes mellitus
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DP-BB	Diabetes-prone BioBreeding
EAE	experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis
eGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
et al.	<i>et alii</i>
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
g	Erdbeschleunigung
g	Gramm
GALT	<i>gut associated lymphoid tissue</i>
Gimap	GTPase der immun-assoziierten Proteine
gpMBP	Myelin Basic Protein aus dem Meerschweinchen
GTPase	Guanosintriphosphatase
h	<i>hour</i>
HLA	<i>human leukocyte antigen</i>

IAN	immun-assoziiertes Nukleotid-bindendes Protein
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IFN	Interferon
LFA	Lymphozyten-Funktion-assoziiertes Antigen
LiP	Lymphopenie induzierte Proliferation
M-	<i>microfold</i>
MACS	<i>magnetic associated cell sorting</i>
MAMP	<i>microbe-associated molecular pattern</i>
MAP	mitogen-activated protein
MBP	myelin basic protein (MBP)
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (<i>major histocompatibility complex</i>)
min	Minute
MLN	mesenteriale Lymphknoten
MOG	Myelin Oligodendrozyten Glykoprotein
MS	Multiple Sklerose
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
NOD	<i>nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein</i>
PAMP	<i>pathogen-associated molecular pattern</i>
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
PP-MS	primär chronisch progrediente Multiple Sklerose
qrtPCR	Quantitative Echtzeit-PCR
RA	Rheumatoide Arthritis
RNA	Ribonukleinsäure

RR-MS	schubförmig remittierende Multiple Sklerose
RT	Raumtemperatur
SA	Streptavidin
SEM	<i>standard error of mean</i>
SLE	systemischer Lupus erythematodes
SP-MS	sekundär progrediente Multiple Sklerose
STAT	<i>signal transducer and activator of transcription</i>
TCR	T-Zell-Rezeptor
TGF	<i>transforming growth factor</i>
TH	T-Helfer-Zelle
TNF	Tumornekrosefaktor
Treg	regulatorische T-Zelle
(v/v)	Volumenprozent
WT	Wildtyp
ZNS	zentrales Nervensystem

1 Einleitung

1.1 Die Rolle der T-Zellen in der Immunantwort

Das Immunsystem wird von einem Netzwerk miteinander kommunizierender Organe, Zellen und Moleküle gebildet, das den Organismus vor Schäden durch Krankheitserreger oder entartete Zellen schützt. Man unterscheidet das unspezifische oder angeborene vom spezifischen oder erworbenen Immunsystem. Zum unspezifischen Immunsystem gehören unter anderem die Makrophagen und Monozyten, die neutrophilen, eosinophilen und basophilen Granulozyten, die Mastzellen, die natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) und das Komplementsystem. Die Makrophagen dienen nach Phagozytose eines Erregers als Antigen-präsentierende Zellen (APCs) und können so das spezifische Immunsystem aktivieren. Die wichtigsten Protagonisten des spezifischen Immunsystems sind die T- und B-Lymphozyten sowie die dendritischen Zellen (DCs). Die T-Lymphozyten vermitteln die zelluläre, die B-Zellen durch Antikörperproduktion die humorale Immunabwehr. Die unterschiedlichen Immunzellen entstehen im Knochenmark aus einer pluripotenten hämatopoetischen Stammzelle (Murphy und Weaver 2016). Während die B-Zellen sich im Knochenmark entwickeln und dieses verlassen, um in peripheren lymphatischen Organen zu Ende zu reifen (Zan und Casali 2015), wandern Vorläufer der T-Lymphozyten zur Reifung in den Thymus. Hier werden ihnen verschiedenste körpereigene Peptide auf den Haupthistokompatibilitätskomplex-Molekülen (MHC, *Major Histocompatibility Complex*) der kortikalen und medullären Thymus-Epithelzellen präsentiert. T-Zellen, die körpereigenes MHC und die darauf gebundenen Peptide erkennen, überleben (positive Selektion), die anderen gehen in Apoptose. In der negativen Selektion werden die übermäßig auf die präsentierten Selbstantigene reagierenden Zellen durch Apoptose negativ selektiert. So entstehen reife T-Zellen, deren T-Zell-Rezeptoren (TCR) körpereigene MHC erkennen können und jeweils spezifisch gegen ein Antigen gerichtet sind (Murphy und Weaver 2016). Der TCR ist ein transmembranenes Heterodimer, bestehend aus einer α - und einer β -Kette, die mit dem Cluster of Differentiation (CD)3-Komplex verbunden sind. Ähnlich wie Immunglobuline (Igs) bestehen die beiden Ketten aus einer variablen Domäne, die an der spezifischen Antigenbindung beteiligt ist, und einer der Verankerung in der Membran dienenden konstanten Domäne. Die Gene der α - und β -Ketten liegen als einzelne

Abschnitte verschlüsselter *variable* (V), *diversity* (D) (nur für die β -Kette), *joining* (J) und *constant* (C) Gensegmente vor. Während der T-Zell-Reifung durchlaufen die Segmente eine Rekombination, sodass multiple $V\alpha$ -Ja und $V\beta$ -D β -J β -Kombinationen entstehen. Durch posttranskriptionelles Ribonukleinsäure (RNA)-Splicing werden diese Kombinationen an ihre zugehörige konstante (C)-Genregion angehängt. Es entstehen folglich $V\alpha$ -Ja-C α - und $V\beta$ -D β -J β -C β -RNA-Moleküle, aus denen nach der Translation die reifen α - und β -Ketten hervorgehen. Jede T-Zelle exprimiert nur ein individuelles TCR-Produkt (Murphy und Weaver 2016). Es entsteht jedoch ein potenziell sehr vielfältiges TCR-Repertoire, mit geschätzt bis zu 10^{15} individuellen Kombinationsmöglichkeiten. Trotzdem findet sich ein beschränkter Gebrauch der TCR Gen-Elemente unter T-Zell-Klonen eines Organismus, die unter anderem abhängig von den MHC-Haplotypen sind, welche die positive Selektion der Klone bedingen (Zamvil und Steinman 1990). In peripheren lymphatischen Organen können die T-Zellen auf ihr spezifisches, von einer APC präsentiertes Antigen treffen. Der TCR bindet an das Antigen und an die MHC-Struktur der APC. Zusätzlich benötigen die T-Lymphozyten für die Aktivierung ein costimulatorisches Signal zwischen den Oberflächenmolekülen CD28 auf der T-Zelle und B7 auf der APC (Murphy und Weaver 2016).

Man unterscheidet funktionell zwei Hauptspezies von T-Zellen. Die $CD8^+$ -zytotoxischen T-Zellen erkennen auf MHC-Klasse-I-Molekülen präsentierte Antigenpeptide und können nach Stimulation Zellen lysieren (Murphy und Weaver 2016). Die $CD4^+$ -T-Zellen erkennen Antigene dagegen auf MHC-Klasse-II-Molekülen und haben eine in erster Linie immunmodulierende Funktion. Ursprünglich wurden zwei verschiedene $CD4^+$ -Zelllinien unterschieden, die als T-Helfer-Zellen (TH) 1 und 2 bezeichnet wurden und für die Abwehr unterschiedlicher Pathogene relevant sind. Heute sind neben den TH1- und TH2-Zellen weitere Subgruppen $CD4^+$ -T-Zellen bekannt, die nach ihrer Funktion und Zytokinproduktion eingeteilt werden (Cosmi et al. 2014). Darunter befinden sich unter anderem die TH17-Zellen, die eine wichtige Rolle in der Abwehr extrazellulärer Pathogene spielen (Annunziato et al. 2012), die regulatorischen T-Zellen (Tregs), die überschießende Immunreaktionen supprimieren und die Selbsttoleranz eines Organismus wahren, und folliculäre T-Helfer-Zellen, die den B-Zellen Hilfe bei der Antikörperproduktion leisten (Cosmi et al. 2014; Geginat et al. 2014).

Obwohl die unterschiedlichen TH-Zell-Spezies mittlerweile differenzierter betrachtet werden, ermöglicht das dichotome TH1/TH2-Modell trotzdem ein Grundverständnis für den Ablauf CD4⁺-gesteuerter immunologischer Regulation sowie die Einteilung in inflammatorische und nicht-inflammatorische Immunantworten. Nach Erkennung eines Antigens, das in Form kurzer Peptide, die abgebauten Proteinen entstammen, auf den MHC-Molekülen einer APC präsentiert wird (Attaf et al. 2015), leiten die CD4⁺-Zellen eine entsprechende Immunantwort ein. Je nach Antigen und Umgebungsfaktoren rekrutieren TH-Zellen unterschiedliche Immunzellen, um die Pathogene zu eliminieren. Grob unterteilt man die TH-Zell-vermittelten Immunantworten in eine Zell-vermittelte inflammatorische und in eine humorale nicht-inflammatorische Reaktion, die entsprechend von den TH-Zell-Untergruppen 1 bzw. 2 koordiniert werden. Man geht davon aus, dass sich naive T-Zellen durch Art und Konzentration des Antigens und durch Zytokine in der Umgebung zu TH1- oder TH2-Zellen entwickeln. Immunologische Stimuli, die Makrophagen und dendritische Zellen aktivieren und eine Sekretion inflammatorischer Zytokine wie Interleukin (IL)-12 initiieren, lösen eine TH1-dominante proinflammatorische Immunantwort aus. Charakteristisch ist diese Antwort für Infektionen mit Mykobakterien und Pilzerregern. Im Gegensatz dazu lösen persistierende oder hoch konzentrierte Antigene, die nur eine geringe IL-12-Synthese induzieren, eher eine TH2-dominante Immunantwort aus. Typisch ist die TH2-dominante Immunantwort für Infektionen mit extrazellulären Bakterien, Helminthen und für Umweltallergene. Während der laufenden Immunantwort induzieren die vom dominanten TH-Subtyp produzierten Zytokine die Proliferation des eigenen Zelltyps und unterdrücken den gegenläufigen Signalweg (Abbas et al. 1996). TH1-Zellen produzieren überwiegend IL-12, Interferon (IFN)- γ und Tumornekrosefaktor (TNF) β , TH2-Zellen dagegen vorwiegend IL-3, IL-4, IL-5, IL-10 und IL-13.

Trifft eine naive T-Zelle auf eine APC, die ihr spezifisches Antigen präsentiert, wird sie aktiviert, schüttet IL-2 aus und proliferiert. Von aktivierten Makrophagen und DCs synthetisiertes IL-12 aktiviert in den T-Zellen den spezifischen Transkriptionsfaktor „Signal Transducer and Activator of Transcription“ (STAT)4, der zu einer Differenzierung in TH1-Zellen führt. TH1-Zellen stimulieren über IFN- γ Makrophagen zur Phagozytose und Elimination von Antigenen. Außerdem fördert IFN- γ in B-Zellen die Produktion Komplement-fixierender und opsonierender

Antikörper, die zusammen an Antigene binden und sie dadurch zur Phagozytose kennzeichnen. IL-2 und IFN- γ führen zu einer Differenzierung von CD8⁺-T-Zellen in aktivierte zytotoxische T-Lymphozyten. Eine geringere IL-12-Konzentration in der Umgebung, eine höhere Antigenkonzentration und IL-4 bewirken über den IL-4-spezifischen Transkriptionsfaktor STAT6 eine Differenzierung zu TH2-Lymphozyten. Die von ihnen produzierten Interleukine 4, 10 und 13 wirken anti-inflammatorisch, IL-5 fördert die Differenzierung und Aktivierung eosinophiler Granulozyten. IL-4 und IL-13 stimulieren B-Zellen zum Antikörper-Klassenwechsel von IgM zu den neutralisierenden Antikörpern IgG1 sowie zu IgE (Abbas et al. 1996).

1.2 T-Helfer-Zellen spielen eine wichtige Rolle in der Pathogenese vieler Autoimmunerkrankungen

In einem gesunden Organismus sichern verschiedene Mechanismen dessen Schutz vor Autoimmunreaktionen. Zu diesen gehören die oben beschriebenen T-Zell-Selektionsmechanismen im Thymus, in denen potenziell autoreaktive Zellen mittels Apoptose aussortiert werden (Murphy und Weaver 2016). Außerdem verhindert die Costimulation als Bedingung der T-Zell-Aktivierung durch APCs eine vorschnelle Aktivierung, und regulatorische T-Zellen drosseln die überschießenden Immunreaktionen (Murphy und Weaver 2016). Autoimmunerkrankungen entstehen, wenn die Schutzmechanismen versagen und infolgedessen das Immunsystem sich gegen körpereigene Strukturen wendet. Dabei sind unter anderem die TH-Zellen an der Pathogenese vieler Störungen des Immunsystems beteiligt. Vorwiegend TH1- und TH17-Zellen wurden mit der Entwicklung organspezifischer und systemischer Autoimmunerkrankungen sowie anderen chronischen Entzündungsprozessen assoziiert. Die experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis (EAE) als Tiermodell für Multiple Sklerose (MS), die Kollagen-induzierte Arthritis als Tiermodell der rheumatoiden Arthritis (RA) und chronisch entzündliche Darmerkrankungen wurden als Folgen einer unkontrollierten TH1-Antwort identifiziert. In diesen Erkrankungen unterstützen TH17-Zellen, die im gesunden Organismus über die Stimulation neutrophiler Granulozyten an der Abwehr extrazellulärer Bakterien und Pilze beteiligt sind, wesentlich die inflammatorische Autoimmunreaktion. TH17-Zellen sind außerdem mit systemischem Lupus eryth-

ematodes (SLE) (Wahren-Herlenius und Dörner 2013), Psoriasis und Kontaktdermatitis assoziiert (Chen und O'Shea 2008; Fouser et al. 2008; van Beelen et al. 2007). TH2-Lymphozyten spielen dagegen eine entscheidende Rolle in Hypersensitivitätsreaktionen (Cosmi et al. 2011). Die von den TH2-Zellen synthetisierten Zytokine IL-4 und IL-13 stimulieren die allergenspezifische Synthese von IgE sowie das Wachstum von Mastzellen, IL-5 rekrutiert Eosinophile und IL-4, IL-9 und IL-13 können eine Mukushypersekretion induzieren (Cosmi et al. 2014). IgE fördert die Mastzelldegranulation (Abbas et al. 1996).

Der genaue Pathomechanismus der Entstehung von Autoimmunität in jedem Einzelfall ist noch nicht abschließend verstanden, jedoch gibt es Hinweise darauf, dass die autoreaktiven T-Zellen initial durch den Kontakt von auf MHC-Molekülen präsentierten Selbstantigenen stimuliert werden. Je nach MHC-Haplotyp besteht die Neigung zu unterschiedlichen Autoimmunerkrankungen. So wurden im Menschen Allele der *HLA-DR*- und *HLA-DQ*-Gene als das Erkrankungsrisiko für Diabetes mellitus Typ 1 bestimmend identifiziert. Colitis ulcerosa, eine chronisch entzündliche Darmerkrankung, wurde dagegen mit den MHC-Klasse-II Risikoallelen *HLA-DRB1*0103* und *HLA-DRB1*1502* assoziiert (Fernando et al. 2008). Die MHC-Moleküle eines Haplotyps scheinen die entsprechenden Selbstantigene besonders effektiv zu präsentieren und autoreaktive T-Lymphozyten zu stimulieren (Wucherpfennig und Strominger 1995).

1.3 Lymphopenie erhöht die Neigung zur Autoimmunität

Autoimmunerkrankungen sind Folge einer Fehlreaktion der Immunzellen gegen körpereigene Strukturen. Häufig beobachtet man bei Patienten mit SLE und anderen Autoimmunerkrankungen eine Zytopenie. Im Blutbild von Patienten mit MS und RA fällt häufig eine T-Zell-Lymphopenie auf, die einerseits Folge, andererseits Ursache der Autoimmunität sein kann (Zheng et al. 2013). Während einer Autoimmunreaktion kann es vorkommen, dass Plasmazellen hämolytisch wirkende Autoantikörper gegen Strukturen der Zelloberfläche produzieren (Ortega-Hernandez et al. 2009; Wang und Cunningham-Rundles 2005). Außerdem können Methotrexat und Glukokortikoide wie Prednisolon, die zur Immunsuppression

in der Therapie der Autoimmunerkrankungen zum Einsatz kommen, zu einer Zytopenie führen (Berthelot et al. 1994; Gispén et al. 1987; Sondermann et al. 2015).

Im Gegensatz dazu gibt es die Hypothese, dass Zytopenie eine der Ursachen für die Entstehung von Autoimmunität ist. Neutropenie senkt die Infekttoleranz und durch Entzündungen und molekulare Mimikry zwischen Erregern und körpereigenen Strukturen kann es zu Exazerbationen einer bestehenden Autoimmunerkrankung kommen (Elde und Malik 2009; Rolston 2004). Des Weiteren löst Lymphopenie einen kompensatorischen Mechanismus zur Normalisierung der T-Lymphozyten-Zahl, die Lymphopenie-induzierte Proliferation (LiP), aus (Goldrath und Bevan 1999a; Marleau und Sarvetnick 2005). Dieser Prozess beschreibt die Proliferation von CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen in peripheren lymphatischen Organen als Reaktion auf einen Verlust von T-Zellen. Dabei benötigen die T-Zellen auf MHC-Molekülen präsentierte Selbstantigene als Stimulus zur Proliferation (Goldrath und Bevan 1999b; Surh und Sprent 2000). Es ist denkbar, dass während der homöostatischen Proliferation einige TCR-Subtypen effektiver proliferieren als andere und sich dadurch in lymphopener Umgebung ein verändertes TCR-Spektrum ausbildet. Neben der Zellzahl erhöht sich durch die Proliferation nach Interaktion des TCR mit Selbstantigenen auch die relative Bereitschaft zur Autoimmunität (Kieper et al. 2005; Le Campion et al. 2009). Durch LiP expandierte T-Zell-Klone haben zudem Eigenschaften von Gedächtnis-T-Zellen und sind damit leichter aktivierbar als naive T-Zellen (Goldrath et al. 2000). Die LiP wird beispielsweise als potenzielle Ursache von autoimmunem Typ 1 Diabetes mellitus in *Diabetes-prone BioBreeding* (DP-BB) Ratten gesehen. In DP-BB-Ratten, in denen autoreaktive T-Zellen in einer lymphopenen Umgebung eine Autoimmunreaktion gegen die Inselzellen des Pankreas induzieren, ist das TCR-Repertoire in peripheren lymphatischen Organen im Vergleich zum Wildtyp verändert. Da sich in den DP-BB-Tieren lediglich das TCR-Repertoire peripherer T-Zellen, nicht aber das Repertoire der einzeln positiven Thymozyten vom Repertoire des Wildtyps unterscheidet, wird das veränderte TCR-Repertoire in den peripheren lymphatischen Organen eher einer homöostatischen T-Zell-Proliferation in Folge der Lymphopenie als einer gestörten negativen Selektion im Thymus zugeschrieben (van den Brandt et al. 2010).

1.4 **Gimap5-Defizienz als Ursache für Lymphopenie und Autoimmunität**

Die beschriebene Lymphopenie als Ursache für die Entwicklung eines autoimmunen Diabetes in *BioBreeding* (BB) Ratten ist durch die Defizienz der antiapoptotisch wirkenden Guanosintriphosphatase (GTPase) Gimap5 begründet. BB-Ratten, die nach 60-120 Tagen spontan einen autoimmunen Diabetes mellitus entwickeln (Ramanathan und Poussier 2001), tragen die Deletion einer Base im *lyp* (*Gimap5*, *Iddm2*) Gen auf Chromosom 4. Die Mutation verursacht eine Leserahsterverschiebung, die durch die Entstehung eines verfrühten Stopcodons zu einem verkürzten Protein führt (MacMurray et al. 2002). Die durch das *lyp* Gen kodierte GTPase der immun-assoziierten Proteine (*Gimap*, *GTPase of immunity-associated protein*) 5 gehört zu einer Familie von 8 GTPasen. In der Ratte werden 7 von ihnen exprimiert. Sie spielen mit gegensätzlichen Funktionen eine wichtige Rolle in der T-Zell-Reifung und Selektion im Thymus, in der Apoptose und T-Zell-Homöostase in peripheren lymphatischen Organen sowie für das Überleben nach TCR-Stimulation aktivierter T-Zellen (Moralejo et al. 2011; Nitta und Takahama 2007). Die auch als immun-assoziierte Nukleotid-bindende Proteine (IANs) bezeichneten GTPasen sind eng mit den pro- und anti-apoptotischen Enzymen der B-cell lymphoma (*Bcl*)-2-Familie verknüpft. Deren Fehlregulation kann ebenfalls zu T-Lymphopenie, Leukämie oder Autoimmunität führen.

Gimaps finden sich nur in Vertebraten und höheren Pflanzen, sie tendieren in vielen Spezies zur Clusterbildung im Genom und werden beispielsweise bei Ratte und Mensch auf nur einem kurzen Abschnitt eines Chromosoms codiert. Es wird angenommen, dass die Gimaps Transkriptionsziele TCR-Stimulus-vermittelter Signalkaskaden sind. Die Entschlüsselung der genauen Reaktionswege ist Gegenstand aktueller Forschung. Gimap5 als anti-apoptotisch wirkende GTPase wird mäßig während der positiven T-Zell-Selektion und stärker in präselektierten doppelt-positiven CD4⁺CD8⁺-Thymozyten exprimiert.

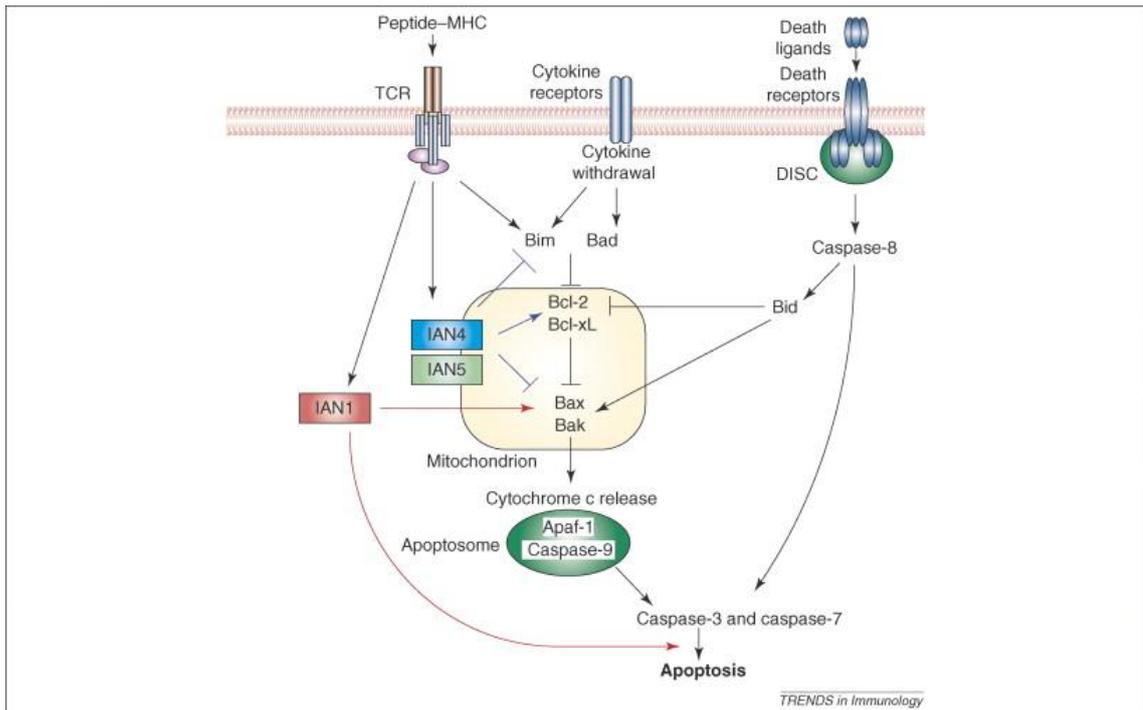


Abbildung 1: Signalkaskaden der Apoptose in Lymphozyten.

Es sind der von der Bcl-2-Familie vermittelte mitochondriale (links) und der Todesrezeptor-vermittelte Signalweg (rechts) dargestellt. Über TCR- und Zytokinrezeptor-Stimulation werden die pro-apoptotischen Proteine Bim und Bad aktiviert. Diese binden an Bcl-2 und Bcl-xL und verhindern dadurch, dass diese die pro-apoptotischen mitochondrialen Proteine Bax und Bak hemmen. Bax erfährt eine Apoptose-assoziierte Translokation in die Mitochondrien. Bax und Bak induzieren die Cytochrom C-Ausschüttung aus den Mitochondrien ins Zytosol, die zu einer Aktivierung der Caspase-9 führt. Anschließend werden die Effektorcaspasen 3 und 7 aktiviert, sodass es schließlich zum Zelltod kommt. Die an intrazellulären Membranen (endoplasmisches Retikulum, Golgi-Apparat und äußere Mitochondrienmembran) lokalisierten IAN4 und 5 (Gimap4/5) inhibieren nach Aktivierung durch ein TCR-Signal die pro-apoptotischen Proteine der Bcl-2-Familie und aktivieren die anti-apoptotischen Proteine Bcl-2 und Bcl-xL. Das im Zytosol exprimierte IAN1 fördert dagegen die Apoptose durch Aktivierung von Bax und Bak sowie Induktion der Apoptose stromabwärts der Effektorcaspasen. Der durch Todesrezeptoren vermittelte Signalweg beginnt mit der Bindung eines Todes-Liganden an einen Todesrezeptor (z.B. Fas, TNF-Rezeptor1). Es wird der „Death inducing signaling complex“ (DISC) gebildet, der die Caspase 8 stimuliert, die dann direkt die Effektorcaspasen 3 und 7 aktiviert und außerdem indirekt in den mitochondrialen Signalweg eingreift, indem Caspase 8 Bid aktiviert, welches Bcl-2 und Bcl-xL hemmt sowie Bax und Bak aktiviert (Nitta und Takahama 2007). Abbildung mit freundlicher Genehmigung des Verlags übernommen aus Nitta und Takahama 2007.

Die Entscheidung zwischen Überleben und Tod einer T-Zelle nach einem TCR-Signal ist von großer Bedeutung für die Funktionalität des Immunsystems. Eine Aktivierung der T-Zelle über dieses Signal führt zu einer Immunantwort gegen

das entsprechende Antigen. Die Einleitung der Apoptose nach T-Zell Signal bei fehlender Costimulation schützt den Organismus dagegen vor Aktivierung der Zelle in Abwesenheit eines potenziell gefährlichen Antigens und verhindert so die Entstehung von Autoimmunität (Opferman und Korsmeyer 2003; Radvanyi et al. 1996). Es ist bisher nicht abschließend geklärt, wie es nach einem TCR-Signal zu der Entscheidung zwischen Überleben oder Apoptose der T-Zelle kommt. Die Stimulation des TCRs über unterschiedliche Strukturen initiiert verschiedene intrazelluläre Signale, die zur Transkription oder zur posttranskriptionalen Aktivierung passender T-Zell-Überleben-Regulatorproteinen führen. Zu diesen Regulatorproteinen zählen neben den Gimaps die besser bekannte B-cell lymphoma (Bcl)-2-Familie mit ihren anti- (Bcl-2, Bcl-xL) und pro-apoptotischen (Bax, Bak, Bim) Mitgliedern. In Abbildung 1 ist ihre Rolle im mitochondrialen Apoptose-Signalweg dargestellt. Eine T-Zell-Stimulation bei Nichtvorhandensein eines costimulatorischen Signals aktiviert die pro-apoptotischen Proteine Bim und Bad. Diese binden an der Mitochondrienmembran an die anti-apoptotischen Enzyme Bcl-2 und Bcl-xL und inaktivieren sie. Dadurch wird die Hemmung der pro-apoptotischen Mitglieder Bax, das eine Apoptose-assoziierte Translokation aus dem Zytosol in die Mitochondrien erfährt, und Bak aufgehoben, sodass diese eine Cytochrom C Ausschüttung aus den Mitochondrien ins Zytosol provozieren. Cytochrom C stimuliert die Caspase 9, die anschließend die Effektorcaspasen 3 und 7 aktiviert. Durch Spaltung von Substratproteinen lösen diese den programmierten Zelltod aus. Gimaps greifen in diese Signalkaskade unterschiedlich ein. Die an der äußeren Mitochondrienmembran lokalisierten Gimap4 und 5 (IAN4 und 5) aktivieren nach TCR-Stimulation die anti-apoptotischen Faktoren Bcl-2 und Bcl-xL und inhibieren die pro-apoptotischen Faktoren Bax und Bak. IAN1 antagonisiert IAN4 und 5 indem es Bax aktiviert und zusätzlich stromabwärts der Effektorcaspasen 3 und 7 Apoptose induziert (Nitta und Takahama 2007).

In den Gimap5-defizienten DP-BB-Ratten zeigte sich neben einer die CD4⁺ und die CD8⁺ betreffenden Lymphopenie eine verminderte Zahl einzeln positiver Thymozyten sowie eine erhöhte Apoptoserate reifer einzeln-positiver Thymozyten und peripherer T-Zellen in Zellkultur (Hernández-Hoyos et al. 1999; MacMurray et al. 2002). Diese Effekte unterstützen das oben beschriebene Modell zur Rolle von Gimap5 in Apoptose und Selektion von T-Zellen. Über Markierung der T-Zellen aus BB-Ratten, die kürzlich den Thymus verlassen hatten (RTE, *recent*

thymic emigrants) konnte gezeigt werden, dass sie in der Peripherie nicht länger als eine Woche überleben (Zadeh et al. 1996). Trotz der hohen Apoptoserate ist dabei der gesamte Anteil apoptotischer T-Zellen weitgehend normal. Auch bleibt die Gesamtzahl der peripheren rezirkulierenden T-Zellen über das ganze Leben hinweg stabil, obwohl in den BB-Ratten eine physiologische Involution des Thymus beobachtet wurde (Ramanathan et al. 1998). Die Stabilität der Gesamtzahl wird dabei durch eine 15- bis 20-fache Erhöhung der mitotischen Aktivität peripherer T-Zellen in den BB-Ratten erreicht. In Experimenten wurde nachgewiesen, dass T-Zellen Gimap5-defizienter Tiere durch TCR-Stimulation *in vitro* von spontaner Apoptose gerettet werden können (Ramanathan et al. 1998). Außerdem exprimierten die T-Zellen in der Peripherie einige mit einer Aktivierung assoziierte Oberflächenmarker (Lang et al. 2004). Es wird daher vermutet, dass ein Verlust von Gimap5 zu einem unbalancierten T-Zell-Überleben führt. Durch die verkürzte Überlebenszeit kommt es zu einem T-Zellverlust. Die verbleibenden T-Zellen werden in der lymphopenen Umgebung zur LiP angeregt, in deren Rahmen, wie oben beschrieben, potenziell autoreaktive T-Zellen durch TCR-vermittelte Aktivierung vor dem Tod gerettet werden und expandieren (King et al. 2004). Im Menschen konnte Gimap5 ebenfalls als potenzieller Mediator immunologischer Dysregulation identifiziert werden. Einzelne genetische Varianten von Gimap5 wurden dabei mit der Entstehung von Asthma bronchiale und Allergien assoziiert (Heinonen et al. 2015). Andere Untersuchungen konnten den häufigsten Gimap5-Haplotyp mit einem erhöhten Risiko für die Entstehung von SLE in Verbindung bringen (Hellquist et al. 2007).

1.5 In PVG-Ratten führt eine Gimap5-Defizienz zu einer spontanen eosinophilen Gastroenteritis

Wie oben beschrieben ist die Entwicklung von Autoimmunerkrankungen unter anderem abhängig von genetischen Faktoren des Organismus. Um den Einfluss des MHC-Haplotyps und der Gimap5-Defizienz auf die Entwicklung von Lymphopenie und Autoimmunität auf einem anderen genetischen Hintergrund als dem der BB-Ratten zu untersuchen, transferierten Cousins et al. den RT1u MHC-Klasse-II-Haplotyp und den *lyp*-Gendefekt durch Kreuzung auf PVG-Ratten (Cousins et al. 2006). Überraschenderweise entwickelten diese Ratten keinen

Diabetes, sondern eine spontane progressive entzündliche Darmerkrankung. Dabei trat die Erkrankung bei allen Tieren mit homozygoter *lyp*-Mutation, im Mittel mit 36 Lebenswochen, auf. Erkrankte Ratten zeigten eine Splenomegalie und massiv geschwollene mesenteriale Lymphknoten. In der Histologie fanden sich eosinophile Infiltrate in der Submukosa und Muskularis, wohingegen die Zotten ausgespart wurden. Der Serum-IgE-Spiegel war stark erhöht. Aktivierte *lyp/lyp* CD4⁺-T-Zellen produzierten *in vitro* erhöhte Mengen des TH2-assoziierten Zytokins IL-4, und auch in der quantitativen Echtzeit PCR (qPCR) zeigten sie erhöhte Expressionen der TH2-typischen Zytokine IL-5 und IL-13. Außerdem fanden sich in der Darmwand aller Ratten Autoantikörper gegen eine nicht-leukozytäre Zelle (Cousins et al. 2006). In humanen Patienten ist die eosinophile Gastroenteritis eine seltene Erkrankung noch unbekannter Ursache. Es wurden ca. 300 Fälle der Erkrankung beschrieben. Da viele dieser Patienten saisonale Allergien, Nahrungsunverträglichkeiten, Ekzeme, Asthma, Atopien und erhöhte Serum-IgE-Titer in der Krankengeschichte aufweisen, geht man von einer Hypersensitivitätsreaktion in der Pathogenese aus. Dabei scheinen eosinophile Granulozyten, TH2-Zytokine (IL-3, IL-5 und IL-13) sowie Chemokine wie das Eosinophilen-selektive Chemokin Eotaxin entscheidende Faktoren in der Pathogenese der Erkrankung zu sein. Diese kann alle Wandschichten des Darms einbeziehen und befällt am häufigsten die Mukosa (25-100 %). Klinisch äußert sie sich über fäkalen Blutverlust, eine Anämie und sekundären Gewichtsverlust durch Malabsorption oder Proteinverlust-Enteropathie. Ist die Muskularis mitbetroffen, kann es zu Obstruktionen kommen, ein Befall der Subserosa führt zu eosinophilem Aszites, außerdem sind extraintestinale Manifestationen (Cystitis, Splenitis, Hepatitis) beschrieben. Therapeutisch werden Glukokortikoide zur Entzündungshemmung eingesetzt (Baig et al. 2006). Auf Grund der Ähnlichkeit des Phänotyps der Gimap5-defizienten PVG Ratte mit der noch schlecht verstandenen humanen eosinophilen Gastroenteritis könnte dies ein vielversprechendes Tiermodell hierfür darstellen.

In den durch eine Gimap5-Defizienz ausgelösten verschiedenen Phänotypen in BB- und PVG-Ratten zeigt sich ein hoher Einfluss des genetischen Hintergrundes auf die Ausprägung der Autoimmunität.

1.6 Die Darmflora hat einen regulatorischen Effekt auf das Immunsystem

Im menschlichen Darm leben ca. 10^{14} Bakterien (Eppinga et al. 2014) von ca. 500 bis 1000 Spezies. Bacteroidetes und Firmicutes sind mit einem Anteil von 90 % die am häufigsten vorkommenden Mikroorganismen (Maranduba et al. 2015). Sie übernehmen als nützliche Bakterien (Kommensalen) wichtige Funktionen, wie den Abbau unverdaulicher Pflanzenbestandteile und die Synthese einiger Nährstoffe (z.B. Vitamin K), und dienen als Schutzschicht vor der Invasion pathogener Mikroorganismen (Kosiewicz et al. 2014). Das Immunsystem des Darms muss zwischen einer großen Vielfalt unterschiedlichster Antigene differenzieren, um einerseits Toleranz gegenüber Nahrungsbestandteilen und Kommensalen und andererseits Immunreaktionen zur Elimination potenziell schädlicher Keime zu vermitteln (Brucklacher-Waldert et al. 2014). Diese Ansprüche erfüllt das Darm-assoziierte lymphatische Gewebe (GALT, *gut associated lymphoid tissue*), ein komplex organisiertes System immunologischer Strukturen, das entlang des gesamten Gastrointestinaltraktes (GI-Traktes) angeordnet ist (Randall und Mebius 2014). Zum GALT zählen unter anderem die mesenterialen Lymphknoten (MLN), die Peyer-Plaques, isolierte lymphoide Follikel, das Fett-assoziierte lymphatische Gewebe und loses Gewebe der Lamina propria (Brucklacher-Waldert et al. 2014). Im Epithel sitzende Microfold (M-) Zellen endozytieren Antigene des Darmlumens und transzytieren sie zu der basolateralen Seite. Hier kommunizieren sie mit Phagozyten, B- und T-Lymphozyten (Mabbott et al. 2013). Zellen des angeborenen Immunsystems erkennen Pathogene an konservierten charakteristischen Oberflächenmolekülen, den Pathogen-assoziierten molekularen Mustern (*pathogen-associated molecular patterns*, PAMPs). Die PAMPs werden von *Pattern recognition receptors* gebunden, zu denen die Toll-like Rezeptoren sowie NOD1 und 2 (*nucleotide-binding oligomerization domain-containing proteins 1 und 2*) gehören. Diese leiten über den NFκB-Signalweg eine Hochregulation co-stimulatorischer Moleküle auf APCs und die Zytokinproduktion ein. Die DCs können durch die Produktion unterschiedlicher Zytokine entzündliche (TH1/TH17), humorale (TH2) oder regulatorische T-Zellantworten induzieren und damit entweder Toleranz gegenüber einem Antigen (z.B. Nahrungsbestandteilen oder Kommensalen) oder eine auf das Antigen abgestimmte Immunreaktion zu dessen Elimination erwirken. Aktivierte T-Zellen wandern in die MLN und regen dort

u.a. B-Zellen zur IgA-Produktion an. CD8⁺-Effektor-T-Zellen können in das Epithel der Zottenspitzen einwandern und dort als intraepitheliale Lymphozyten direkt ihre Antigene bekämpfen (Purchiaroni et al. 2013). Die physiologische Interaktion zwischen der Darmflora und dem Immunsystem beruht auf den Kommensalen, die eine anti-entzündliche Umgebung begünstigen. In einem symbiotischen Verhältnis stimulieren die PAMPs der Kommensalen kontinuierlich die intestinalen Epithelzellen. Diese produzieren daraufhin Mediatoren wie *transforming growth factor* (TGF-) β , IL-33 und IL-25, die eine Entwicklung tolerogener (IL-10-produzierender) Makrophagen und DCs fördern. Tolerogene DCs produzieren TGF- β und Retinsäure, die eine Differenzierung von Tregs stimulieren. Zusammen erwirken und erhalten diese Zellen ein anti-inflammatorisches Milieu (Maranduba et al. 2015).

Diät, Alter, Medikamente, Krankheiten und Stress beeinflussen die Zusammensetzung der Darmflora ebenso wie Antibiotikatherapien. Studien haben ergeben, dass die intestinale Flora essenziell für die Entwicklung und Funktion des mukösen Immunsystems in der frühen Kindheit ist und daher auch in der allgemeinen Immunität in Erwachsenen. Keimfrei gehaltene Tiere zeigten Defekte im GALT und der Antikörperproduktion. Sie entwickelten weniger Peyer-Plaques, weniger Immunzellen in der Lamina propria und weniger Plasmazellen in den Keimzentren mesenterialer Lymphknoten (Purchiaroni et al. 2013). In Studien führte eine Antibiotika-Dauertherapie zu einer signifikanten Reduktion der Tregs in MLN und Peyer-Plaques nach der Behandlung. Die Treg-Proliferation war in diesen lokalen Geweben, nicht aber in Milz und peripheren Lymphknoten reduziert. Die Proliferation konventioneller CD4⁺-T-Zellen war dagegen in allen untersuchten Geweben vermindert. Die Autoren schlossen daraus, dass mikrobielle Stimuli die Treg-Population lokal, die konventionellen CD4⁺-T-Zellen dagegen systemisch beeinflussen (Cording et al. 2013). Die Balance zwischen der komplexen Gemeinschaft aus Darmbakterien, Nahrungsmitteln, dem Darmepithel und anderen Darm-assoziierten Molekülen wird immer mehr als Träger der menschlichen Gesundheit verstanden. Ein Ungleichgewicht (Dysbiose) zwischen Darmbakterien mit pathogenem Potenzial (Pathobionten) und Symbionten kann eine Rolle in der Pathogenese verschiedener Erkrankungen spielen. In einer Dysbiose kann die Anwesenheit der Pathogene die durch tolerogene Makrophagen, DCs und Tregs regulierte anti-inflammatorische Umgebung unterbrechen. Eine erhöhte Anzahl

pathogener Keime führt zu einer größeren Exposition von PAMPs, die IECs, aktivierte DCs und Makrophagen zur Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine wie IL-1 β , IL-6, IL-12 und IL-23 induzieren. Die Zytokine fördern die Entwicklung von Effektor-TH-Zellen (TH1 und TH17), deren Aktivität in einer chronischen Entzündungsreaktion mündet (Maranduba et al. 2015). Die Konsequenzen der Dysbiose äußern sich nicht ausschließlich lokal, sondern spiegeln sich auch systemisch wider. Der Verlust der Homöostase kann zu einer Invasion immunogener Moleküle aus der Zellwand gramnegativer Bakterien in den Blutstrom führen (Endotoxämie), die dort eine milde aber kontinuierliche Stimulation pro-inflammatorischer Mediatoren bewirken. Erkrankungen wie chronisch entzündliche Darmerkrankungen, Diabetes Typ 1 und 2 sowie die RA sind mit einer Dysbiose assoziiert. Die veränderte Darmflora scheint hier ein Bestandteil der multifaktoriellen Genese zu sein.

Es gab bereits erste Hinweise, dass die Darmflora auch eine Rolle in immunologisch verursachten Erkrankungen des zentralen Nervensystems (ZNS) wie der MS spielt. So zeigen keimfrei gehaltene SJL/J Mäuse beispielsweise eine Resistenz gegenüber der Entwicklung einer EAE nach Immunisierung mit Myelin Oligodendrozyten Glykoprotein (MOG) (Collins et al. 2012; Maranduba et al. 2015).

1.7 Multiple Sklerose

Die MS ist eine chronisch entzündliche Autoimmunerkrankung des Gehirns und des Rückenmarks (Dendrou et al. 2015). Sie tritt in Deutschland mit einer Prävalenz von 100-120/100.000 Einwohnern auf und betrifft zwei- bis dreimal häufiger Frauen als Männer. Die Erkrankung manifestiert sich in zwei Dritteln der Fälle zwischen dem 20. und 40. Lebensjahr (Masuhr et al. 2013). Klinisch äußert sich die MS zu Beginn häufig mit den Symptomen Schwäche, Sensibilitätsstörungen, einseitigem Sehverlust, Sehen von Doppelbildern, Gangunsicherheit und Ataxie. Im Verlauf kann es zu Blasenfunktionsstörungen, Fatigue und kognitiven Defiziten kommen (Hauser und Oksenberg 2006). Es besteht eine hohe Komorbidität von MS mit Depression von bis zu 50 %. Die Depression ist dabei entweder eine Manifestation der zerebralen Entzündung, wahrscheinlicher jedoch eine Reaktion auf die fortschreitende chronische Erkrankung (Compston und Coles 2008). Die Ätiologie der MS ist noch nicht vollständig verstanden. Es handelt sich um ein

multifaktorielles Geschehen aus genetischer Disposition und verschiedenen Umweltfaktoren (Marrie 2004). Unterschiedliche MHC-Haplotypen, dabei insbesondere das MHC-Klasse-II Gen *HLA-DRB1*, wurden mit der Entwicklung der Erkrankung assoziiert (Fernando et al. 2008). Der Verlauf der MS kann schubförmig (RR-MS; 60 %), sekundär progredient (SP-MS; 30 %), oder primär chronisch progredient (PP-MS; 10 %) sein (Masuhr et al. 2013). Als Auslöser der Entzündungsreaktion werden in der Theorie zwei verschiedene Modelle diskutiert. Im extrinsischen (peripheren) Model werden autoreaktive T-Zellen in der Peripherie, möglicherweise über molekulares Mimikry, Bystander-Aktivierung, oder Ko-Expression von TCR unterschiedlicher Spezifikationen, aktiviert (Harkiolaki et al. 2009; Ji et al. 2010; Münz et al. 2009; Olson et al. 2001). Unter einer Bystander-Aktivierung versteht man dabei eine Aktivierung autoreaktiver T-Zellen durch Entzündungsmediatoren und kostimulatorische Signale, die während einer Immunantwort auf eine Infektion durch aktivierte APCs und Lymphozyten anfallen. Die autoreaktiven Zellen sind dabei als „Bystander“-Zellen selber nicht spezifisch gegen das eigentliche Antigen der Infektion (Murphy und Weaver 2016). Die aktivierten autoreaktiven T-Zellen migrieren anschließend zum ZNS und durchwandern, begleitet von aktivierten B-Zellen und Monozyten, die Blut-Hirn-Schranke (BHS). Im normalerweise immunprivilegierten ZNS treffen die Immunzellen auf ihre spezifischen, jedoch bis dahin unbekanntenen Autoantigene und lösen in der Folge eine Autoimmunreaktion aus. Alternativ werden ZNS-intrinsische Mechanismen als Auslöser der Erkrankung diskutiert. Dabei käme beispielsweise eine überschießende Reaktion auf eine Infektion des ZNS in Betracht, die erst sekundär zu einer Infiltration autoreaktiver Zellen führe (Dendrou et al. 2015). Im Rahmen einer überschießenden Immunreaktion schütten die das ZNS infiltrierenden Zellen proinflammatorische Zytokine aus, die naive Mikroglia-Zellen und Astrozyten stimulieren sowie weitere Entzündungszellen rekrutieren (Masuhr et al. 2013; Minagar et al. 2002). Insbesondere TH1- und TH17-Zellen scheinen maßgeblich am Entzündungsprozess in frühen Stadien der MS beteiligt zu sein (Cao et al. 2015; Watanabe et al. 2016). Die T-, Mikroglia-Zellen und Astrozyten führen über direkte Zellkontakte sowie lösliche inflammatorische und neurotoxische Mediatoren zu Demyelinisierung und neuroaxonaler Schädigung und Verletzung der Oligodendrozyten (Minagar et al. 2002). Zu den neurotoxischen Mediatoren zählen reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies. Sie schädigen die Mitochondrien und

führen damit zu metabolischem Stress und Energieverlust der Nervenzelle (Haider et al. 2011). CD8⁺-T-Zellen kommen zahlreich in den perivaskulären Infiltraten der demyelinisierten Läsionen vor. Ihre Menge korreliert dabei mit dem axonalen Schaden (Frischer et al. 2009). Aktuelle Therapiestrategien versuchen einerseits über immunmodulatorische Therapien (IFN β , Glatirameracetat, Dimethylfumarat) die T-Zell-Antwort in Richtung entzündungshemmendes TH2-Milieu zu verschieben, andererseits über die Gabe von Antikörpern gegen Oberflächenmoleküle der verschiedenen Immunzellen (Haghikia et al. 2013; Hauser et al. 2008; Kozovska et al. 1999; Miller et al. 1998; Ruck et al. 2015) (Natalizumab, Alemtuzumab, Rituximab) deren Infiltration in das ZNS zu verhindern. Alemtuzumab und Rituximab dezimieren dabei insbesondere die Anzahl ihrer Zielzellen (Haghikia et al. 2013; Hauser et al. 2008; Kozovska et al. 1999; Miller et al. 1998; Ruck et al. 2015; Zoghi et al. 2011). Bislang kann mit der Therapie zwar das Auftreten erneuter MS-Schübe vermindert werden, allerdings kommt es langfristig häufig zu einem Übergang in den kontinuierlich progredienten Krankheitsverlauf (Feinstein et al. 2015). Die Neurodegeneration schreitet dann trotz nachlassender Infiltration peripherer Autoimmunzellen fort. Eine Theorie lautet, dass die chronische Entzündung des ZNS von sekundär dort angesiedelten Autoimmunzellen sowie ZNS-intrinsischen aktivierten Mikrogliazellen und Astrozyten ausgelöst wird (Dendrou et al. 2015; Friese et al. 2014). Zukünftige Therapiestrategien sollten daher auch die intrinsische Entzündungsaktivität des ZNS einbeziehen, beispielsweise über die Hemmung der von Astrozyten synthetisierten pro-inflammatorischen Mediatoren (Dendrou et al. 2015).

1.8 Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis als Tiermodell der Multiplen Sklerose

Die MS ist eine sehr heterogene Erkrankung, deren Ursache und Pathogenese noch immer nicht vollständig verstanden sind. Es ist auf Grund der begrenzten Möglichkeiten der *Ex-vivo*-Studien an MS-Patienten unabdingbar, anhand eines der Erkrankung ähnelnden Tiermodells an ihrer Pathophysiologie zu forschen. Mit Hilfe der EAE wurden bereits wichtige Zusammenhänge der T-Zell-vermittelten Demyelinisierung im ZNS, der Rolle des angeborenen Immunsystems sowie der humoralen Immunantwort in der Pathogenese der Erkrankung verstanden. Die daraus gewonnenen Erkenntnisse halfen unter anderem bei der Entwicklung

neuer Antikörper-Therapiemöglichkeiten für bestimmte Verläufe der MS (Gold et al. 2006). Die Vorgeschichte der EAE begann mit der Beobachtung zahlreicher Zwischenfälle nach Tollwutschutzimpfungen (postvakzinale Enzephalitiden), zu deren Aufklärung Koritschoner und Schweinburg 1927 Experimente an Kaninchen machten, in denen sie Entzündungen des Rückenmarks der Tiere nach parenteraler Gabe menschlicher Hirnemulsionen auslösen konnten (Erhardt et al. 1965; Gold et al. 2006). Freund trug maßgeblich zum Fortschritt bei, als er 1942 die Adjuvanstechnik entwickelte und es später schaffte, über eine einzige intracutane Applikation die Encephalomyelitis zu erzeugen (Anderson 1955; Erhardt et al. 1965; Freund und McDermott 1942). In weiteren Experimenten an Nagetieren und Primaten konnte nach und nach die sowohl klinische, pathophysiologische als auch immunologische Ähnlichkeit zur MS gezeigt werden (Gold et al. 2006). Die EAE wird heute in den meisten Fällen durch subcutane Applikation eines immunstimulierenden Agens (Adjuvans) zusammen mit einem Antigen aus dem ZNS ausgelöst. Als enzephalitogene Antigene werden unter anderem Bestandteile des Myelins, beispielsweise *myelin basic protein* (MBP), *proteolipid protein*, MOG oder das astrogliale S-100 β Protein benutzt (Hohlfeld und Wekerle 2004; Wekerle et al. 1994). Als Adjuvans wird meist das *Complete Freund's Adjuvans* (CFA) verwendet, das eine Emulsion aus Hitze-getöteten Mykobakterien (*M. tuberculosis* oder *M. butyricum*), einem Tensid und einem nicht verstoffwechselbaren Öl (Mineralöl) ist (Freund und McDermott 1942; Jennings 1995). Durch die subkutane Injektion wird eine lokale Immunreaktion gegen das ZNS-spezifische Antigen (z.B. MBP) ausgelöst. Dabei wird die immunologische Toleranz gegen körpereigene Antigene durch die das Immunsystem aktivierenden Mykobakterienbestandteile des Adjuvans durchbrochen. Die aktivierten Myelin-spezifischen CD4⁺-T-Zellen (Stromnes und Goverman 2006a) migrieren aus der Peripherie in Richtung ZNS, passieren die BHS und werden anschließend von lokalen und infiltrierenden APCs reaktiviert. Es wird eine T-Zell-vermittelte Autoimmunreaktion gegen die Myelinscheiden ausgelöst, deren entzündliche Prozesse zu Demyelinisierung und dadurch zu Axonschädigung führen (Fletcher et al. 2010). Eine Besonderheit der EAE ist, dass sie in naive Tiere transferiert werden kann, indem man enzephalitogene CD4⁺- (Zamvil und Steinman 1990) oder CD8⁺-T-Zellen (Sun et al. 2001) aus erkrankten Tieren in naive Tiere überträgt. In den häufigsten „klassischen“ EAE-Modellen für Nagetiere manifestiert sich die

Erkrankung in einer aufsteigenden schlaffen Paralyse, die an der Schwanzspitze beginnt und über Hinter- und Vorderpfoten fortschreitet. In Übereinstimmung hiermit findet die Entzündungsreaktion im „klassischen“ Modell überwiegend im Rückenmark der Tiere statt (Stromnes und Goverman 2006b). Um möglichst umfassend die komplexen klinischen und pathophysiologischen Facetten der MS erforschen zu können, wurden zahlreiche EAE-Modelle entwickelt, wobei die Symptomatik mit den Lokalisationen der Infiltrate korreliert (Stromnes und Goverman 2006a). Je nach genetischem Hintergrund der Tiere, dem Immunisierungsprotokoll und dem spezifischen Antigen, zeigen sich neben dem monophasischen EAE-Verlauf chronisch progrediente oder schubförmige Verläufe (Fletcher et al. 2010; Stromnes und Goverman 2006a). In früheren Studien wurde gezeigt, dass die Manipulation immunassoziierter Gene zu einem veränderten EAE-Verlauf führen kann (Gold et al. 2006). Für unsere Experimente wählten wir Lewis-Ratten, die nach Immunisierung mit MBP aus dem Meerschweinchen (gpMBP) und CFA einen monophasischen „klassischen“ EAE-Verlauf zeigen.

1.9 Zielsetzung

Autoimmunerkrankungen nehmen seit Jahren in der westlichen Bevölkerung an Häufigkeit zu. Trotz intensiver Forschung an der MS bleiben die Ätiologie und Pathogenese der Erkrankung teilweise ungeklärt. Es ist bekannt, dass T-Zellen eine wichtige Rolle in der Pathogenese spielen und dass Lymphopenie ein genereller Risikofaktor für Autoimmunität ist. Außerdem wird über den Einfluss der Darmflora auf das Immunsystem und die Entwicklung von Autoimmunität diskutiert. Ziele der Arbeit waren daher:

- zu erforschen, wie sich eine Gimap5-Defizienz phänotypisch in Lewis-Ratten äußert. Hierzu sollte geprüft werden, ob in diesem Rattenstamm in solch einer Situation eine Lymphopenie entsteht, wie sich diese eventuell auf Proliferation und Aktivierung der TH-Zellen auswirkt und ob es möglicherweise zur Dominanz einer TH-Subgruppe kommt.
- die Einflüsse des MHC-Haplotyps und der Gimap5-Defizienz auf den Verlauf und die Pathogenese der in Lewis-Ratten induzierbaren EAE zu untersuchen.
- die Folgen einer durch Antibiotikagabe veränderten Darmflora auf die Entwicklung von Autoimmunität und auf den Verlauf der EAE zu klären.

2 Material und Methoden

Falls nicht anders angegeben, befinden sich alle Orte in Deutschland.

2.1 Allgemeine Hilfsmittel

Tabelle 1: Allgemeine Hilfsmittel

7500 Real Time PCR System	Applied Biosystems, Foster City, USA
accu-jet® pro Pipettierhelfer	Brand GmbH, Wertheim
Agarose Gelelektrophorese Systeme	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Arium® 611 Reinstwasser System	Sartorius AG, Göttingen
BD FACSCanto II	BD Biosciences, Heidelberg
Centrifuge 5417R für Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
Centrifuge 5804 für FACS-Röhrchen	Eppendorf, Hamburg
Centrifuge multifuge 4 KR für Zentrifugenröhrchen	Heraeus, Hanau
Chemilux Gel Imager	INTAS Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen
Electrophoresis power supply 301	Amersham Biosciences, Freiburg
Filter Mate Harvester	Perkin Elmer, Waltham, USA
Inkubator, HERACell 240	Heraeus, Hanau
Mikroskop Primo Star	Zeiss, Jena
Mikrowelle	Sharp, Hamburg
Nanodrop ND-1000 Spectrophotometer	ThermoScientific, Wilmington, USA
Neubauer Improved Haemocytometer	Henneberg-Sander GmbH, Gießen
Pipette 1 µl	Eppendorf, Hamburg
Pipetten 2 µl, 20 µl, 200 µl, 1000 µl	Gilson, Middleton, Wisconsin, USA
Sicherheitswerkbank, HERASafe	Heraeus, Hanau
Thermomixer	Eppendorf, Hamburg

Tiefkühlschrank Hera freeze -80 °C	Heraeus, Hanau
Tiefkühlschrank Liebherr Comfort -20 °C	Liebherr-International Deutschland GmbH, Biberach an der Riß
Vortex Genie-2	Scientific Industries, Bohemia, New York, USA
Zentrifuge Sigma 2-5 für 96-Well Platten	SIGMA Laborzentrifugen GmbH, Osterode am Harz

2.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien

96-well Optical Reaktionsplatten	Applied Biosystems, Foster City, USA
96-well Opti-Platte	Perkin Elmer, Waltham, USA
96-well Suspension Kulturplatte, flacher Boden	Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen
96-well Suspension Kulturplatten, U-förmiger Boden	Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen
96-well Tissue Kulturplatte 96-well V-förmiger Boden	Sarstedt, Nümbrecht
Adhesive Sealing Film	Perkin Elmer, Waltham, USA
CryoTube™ Röhrchen	Nunc, Roskilde, Dänemark
FACS-Röhrchen	BD Biosciences, Heidelberg
Falcon™ Rundboden Polypropylen-Röhrchen	Fisher Scientific, Schwerte
Greiner CELLSTAR® multiwell Kulturplatten, 6, 12, 24, 48 Wells	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Kanülen 24G 1", 20G 1 1/2", 27G 3/4", 25G 1", 20G 2 3/4"	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Optical Adhesive Covers	Applied Biosystems, Foster City, USA
Pipettenspitzen 10 µl, 200 µl, 1000 µl	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen

Reagiergefäße 0,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Reagiergefäße 1,5 ml, 2 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Serologische Pipetten, 5 ml, 10 ml, 25 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Spritzen 1 ml	Henke Sass Wolf, Tuttlingen
Spritzen 2 ml, 5 ml, 10 ml	BD Biosciences, Heidelberg
Spritzen 60 ml	BD Biosciences, Heidelberg
Zellkulturschalen 3,5 cm, 6 cm, 10 cm	Sarstedt, Nümbrecht
Zellsieb 40 µm	BD Biosciences, Heidelberg
Zentrifugenröhrchen 15 ml, 50 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen

2.3 Chemikalien und Pufferzusätze

Tabelle 3: Chemikalien und Zusätze

10 % Stripped Fetal Calf Serum (FCS)	Invitrogen, Paisley, UK
Agarose UltraPure	Invitrogen, Paisley, UK
BSA	Carl Roth, Karlsruhe
CaCl ₂ * 2 H ₂ O	Merck, Darmstadt
D-Glucose	Merck, Darmstadt
DNA Leiter 1kb	Serva, Heidelberg
dNTPs (dATPNa ₄ *3 H ₂ O, dCTPNa ₄ *3 H ₂ O, dGTPNa ₄ *3 H ₂ O, dTTPNa ₄ *3 H ₂ O)	Genaxxon bioscience, Ulm
EDTA	Carl Roth, Karlsruhe
Ethanol	Carl Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	HyClon, Perbio Science, Bonn
GeneRuler 1kb DNA Leiter	Fermentas
GIBCO® Penicillin/Streptomycin	Merck, Darmstadt

HCl	Carl Roth, Karlsruhe
HEPES	Merck, Darmstadt
KCl	Merck, Darmstadt
KH ₂ PO ₄	Merck, Darmstadt
MgCl ₂ * 6 H ₂ O	Merck, Darmstadt
MgSO ₄ * 7 H ₂ O	Merck, Darmstadt
Na ₂ CO ₃	Merck, Darmstadt
Na ₂ HPO ₄	Merck, Darmstadt
Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇	Carl Roth, Karlsruhe
NaCl	Carl Roth, Karlsruhe
NaHCO ₃	Merck, Darmstadt
NaN ₃	Carl Roth, Karlsruhe
NH ₄ Cl	Merck, Darmstadt
Orange DNA Loading Dye (6X)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Paraformaldehyd, 4 % (PFA), in PBS pH 7,2	Morphisto GmbH, Frankfurt
Phenol Red	SIGMA-Aldrich, Taufkirchen
Tris	Carl Roth, Karlsruhe
Zitronensäure	Merck, Darmstadt

2.4 Oligonukleotide

Tabelle 4: Primer für die qrt-PCR

Zielgen	Sequenz (5' → 3')
Zyklin B1	vorwärts: CTGGGTCGTGAAGTCACTGG rückwärts: AACTGTCCTGCATGAACCGA
Zyklin E1	vorwärts: TGGTTCCATTCGCCATGGTT rückwärts: TTGGGCTTTGTCCAGCAAGT

β-Actin	vorwärts: AGCTCCTCCGTCGCCGGTC rückwärts: CCACCATCACACCCTGGTGCCT
---------	--

2.5 Medien und Lösungen

2.5.1 Zellkultur

Alle Medien, Puffer und Lösungen wurden bei 4 °C aufbewahrt. Puffer und Lösungen wurden bei 125 °C für 30 min autoklaviert.

Tabelle 5: Zellkulturmedien und -lösungen

Bezeichnungen	Zusammensetzung
BSS	11 % BSS I, 11 % BSS II
BSS I	50 mM Glucose, 4,4 mM KH ₂ PO ₄ , 13,4 mM Na ₂ HPO ₄ , 0,1 % Phenol Red
BSS II	12,65 mM CaCl ₂ * 2 H ₂ O, 53,6 mM KCl, 1,37 M NaCl, 9,8 mM MgCl ₂ * 6 H ₂ O, 8,1 mM MgSO ₄ * 7 H ₂ O
Coating Buffer	45,3 mM NaHCO ₃ , 18,2 mM Na ₂ CO ₃
PBS (pH 7,4)	137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 μM Na ₂ HPO ₄ , 2,0 mM KH ₂ PO ₄
RPMI++	+ 10 % FCS, + 1 % Penicillin/Streptomycin

GIBCO® RPMI 1640+GlutaMAX™-I, Invitrogen, Paisley, Großbritannien

2.5.2 MACS® T-Zell-Isolation

Tabelle 6: MACS-Puffer

Bezeichnungen	Zusammensetzung
MACS Laufpuffer	PBS pH 7,2,

	+ 2,0 mM EDTA + 0,5 % BSA
MACS Spülpuffer	PBS pH 7,2 + 2,0 mM EDTA

2.5.3 Durchflusszytometrie

Tabelle 7: Puffer und Medien für die Durchflusszytometrie

Bezeichnungen	Zusammensetzung
Alsevers	27 mM NaCl, 125 mM D-Glucose, 3 mM Zitronensäure, 30 mM Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇
Annexin-V-Bindepuffer	10 mM HEPES/NaOH, pH 7,4, 140 mM NaCl, 2,5 mM CaCl ₂ , in ddH ₂ O
FACS-Puffer	PBS pH 7,2, + 0,1 % BSA, + 0,01 % NaN ₃
TAC Puffer	20 mM Tris/HCl pH 7,2, 155 mM NH ₄ Cl

OptiLyse® B Lysing Solution, Beckman Coulter, Krefeld

2.6 Antikörper und Reagenzien

2.6.1 Durchflusszytometrie: Antikörper und Färbungen

AnnexinV-Cy5, BD Biosciences, Heidelberg

7-AAD, BD Biosciences, Heidelberg

Tabelle 8: Antikörper für die Durchflusszytometrie

Epitop	Klon	Verdünnung für 1 x 10 ⁶ Lymphozyten	Fluorochrom
CD4	Ox38	1:10000 1:2000	fitc PE

	W3/25 Ox35	1:5000 1:1000 1:500	Alexa-647 PE-Cy7 APC
CD8 α	Ox8	1:1000 1:500 1:500	fitc PE PerCp
CD8 β	341	1:1000	fitc
CD11a/LFA-1	WT.1	1:500 1:250	PE fitc
CD25	Ox39	1:500 1:1000	PE bio
CD45	Ox1	1:3000	Alexa-647
CD45RA	Ox33	1:2000	PE
CD134	Ox40	1:500	Alexa-647
CD161a	NKR-P1A	1:1000	PE
$\alpha\beta$ TCR	R73	1:500 1:500 1:1000	PE PerCp Alexa-647
Thy1	Ox7	1:500	PerCp
V β 3.3	CA11	1:1000	bio
V β 8.2	R78	1:1000	Alexa-647
V β 8.5	B73	1:500	Gam-FITC
V β 10	G101	1:1000	fitc
V β 13	18B1	1:2000	bio
V β 16	His42	1:1000	Gam-FITC
Sekundärer Antikörper	SA	1:1000	APC-Cy7
Intrazelluläre Proteine:			

FoxP3		1:500	PE
IFN γ		1:500	PE
IL-17		1:500	PE

Die FACS-Antikörper wurden von BD Biosciences, eBioscience oder BioLegend erworben.

2.6.2 MACS[®] CD4⁺ Isolation

Tabelle 9: MACS[®] technology microbeads

Epitop	Klon
CD4	Ox38

Die MACS beads wurden von Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach bezogen. Für 1×10^7 Lymphozyten wurden 20 μ l beads verwendet.

2.6.3 Reagenzien für die T-Zell-Aktivierung

Coating Antikörper: Sheep anti-Mouse Ig polyklonaler Antikörper, Roche, Basel, Schweiz

Stimulation:

JJ319: mouse-anti-ratCD28 monoklonaler Antikörper, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Hünig, Institut für Virologie und Immunbiologie, Universität Würzburg

JJ316: mouse-anti-ratCD28 monoklonaler Antikörper, Superagonist, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Hünig, Institut für Virologie und Immunbiologie, Universität Würzburg

R37: mouse-anti-ratTCR β monoklonaler Antikörper, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Hünig, Institut für Virologie und Immunbiologie, Universität Würzburg

2.7 Enzyme und Kits

BD Cytotfix/Cytoperm™ Kit, BD Biosciences, Heidelberg

eBioscience IC staining: Fixation/Permeabilization concentrate and diluent, 10X Permeabilization buffer, eBioscience, San Diego, Kalifornien, USA

IgE Rat ELISA Kit, abcam, Cambridge, Großbritannien

IgG Rat ELISA Kit, abcam, Cambridge, Großbritannien

iScript™ cDNA Synthesis Kit, BioRad, München

Power SYBR® green, Applied Biosystems, Foster City, USA

Proteinase K, Promega, Fitchburg, USA

Quick-RNA™ MiniPrep, Zymo Research Corp., Irvine, USA

Taq-CR Master Mix Kit, Qiagen, Hilden

2.8 Antibiotikum

Enrofloxacin 2,5 %, Bayer, Leverkusen

2.9 Anästhesie

2.9.1 Inhalationsanästhesie

Für eine kurzzeitige Anästhesie wurde den Ratten 4 % Sevofluran® bei 5 % Sauerstoff in der Atmosphäre über einen Verdampfer zugeführt.

2.10 Software

7500 System SDS Software Version 1.4.0.25, Applied Biosystems, Foster City, USA

Adobe® Illustrator® Adobe Systems, San José, USA

BD FACS Diva™ Software Version 6.1.2, BD Biosciences, Heidelberg

FlowJo Version 8.8.6, Tree Star, Inc., Ashland, Oregon, USA

GelPro Analyzer, Media Cybernetics, Rockville, USA

Prism for Windows, Version 5, GraphPad Software, Inc., San Diego, Kalifornien, USA

2.11 Tiere

Die im Rahmen des Forschungsprojektes verwendeten Ratten waren alle vom Lewis-Stamm und wurden im Tierstall der Universitätsmedizin Göttingen gezüchtet. Alle Experimente wurden vorschriftsmäßig nach den Regelungen des Niedersächsischen Landesamtes für Lebensmittelsicherheit und Verbraucherschutz durchgeführt. Die Ratten wurden unter keimarmen Bedingungen (SPF-Tierhaltung in IVC-Käfigen) in einem 12-stündigen hell-dunkel Zyklus gehalten.

Lewis: wildtypische (WT) Lewis-Ratten wurden von Charles River erworben oder in unseren eigenen Tiereinrichtungen gezüchtet

Gimap5-defiziente Lewis-Ratten: Die Gimap5-Defizienz in Lewis-Ratten wurde durch Rückkreuzung der Gimap5-Punktmutation aus BB-Ratten mittels Speed Congenics erhalten (Fischer et al. 2016).

enhanced Green Fluorescent Protein (eGFP)-transgene Lewis-Ratten: eGFP-transgene Lewis-Ratten waren mittels eines lentiviralen Vektors generiert worden (van den Brandt et al. 2004).

2.12 Tierexperimente

2.12.1 Aktive Induktion der EAE

Unter Isofluran-Narkose wurde den Ratten subcutan 100 µl Impfpaste bestehend zu gleichen Teilen aus dem Adjuvans CFA und dem Antigen gpMBP oberhalb der Hinterpfoten injiziert (50 µl pro Pfote). Die abgetöteten Mykobakterien im Adjuvans hatten eine Konzentration von 2 mg/ml.

2.12.2 Bewertung der Krankheitssymptome

Nach aktiver EAE-Induktion wurden die Tiere täglich gewogen und die Lähmungssymptomatik anhand der in Tabelle 1 verzeichneten Kriterien verschiedenen Krankheitsstadien (Scores) zugeordnet.

Tabelle 10 Klassifikation der Krankheitsstadien

Score	Klinischer Verlauf
0	Gesund
1	Schwanzspitze hängend, Tonusminderung im Schwanz
2	Schlaffe Schwanzlähmung
3	Fehlende Gangausgleichbewegung
4	Gangataxie
5	Leichte, schlaffe Parese der Hinterläufe
6	Deutliche Parese beider Hinterläufe oder eines Beins
7	Plegie beider Hinterläufe
8	Tetraparese mit leichter Parese der Vorderläufe
9	Moribund mit erhöhter Atemfrequenz
10	Verstorben

Tiere mit einem Score ≥ 7 wurden aus tierschutzrechtlichen Gründen getötet und für die Statistik mit einem Score von 10 weitergeführt.

2.12.3 Antibiotikabehandlung

Die Ratten wurden in einzelventilierten Käfigen (IVC-Käfige, Scanbur, Karlslunde, Dänemark) gehalten, um den Kontakt mit Mikroorganismen aus der Umgebung möglichst zu minimieren. Sie wurden nach dem Absetzen und vor Entwicklung der Durchfallssymptomatik über einen Zeitraum von 6 Wochen mit dem Antibiotikum Enrofloxacin (Bayer, Leverkusen, Germany) behandelt. Das Antibiotikum wird ausschließlich in der Tiermedizin eingesetzt. Es hat die Vorteile eines breiten Wirkspektrums im grampositiven und gramnegativen Bereich bei gleichzeitig geringer Toxizität gegenüber dem Wirtsorganismus (López-Cadenas et al. 2013).

2.13 Organentnahmen

Die Ratten wurden in CO₂-reicher Umgebungsluft getötet.

Zur Blutabnahme aus dem Herzen wurde zeitnah das Abdomen mit einer Schere, anschließend der Thorax über einen Schnitt in das Zwerchfell eröffnet. Mit einer Spritze wurde Blut aus der linken Herzkammer abgenommen.

Zur Entnahme von MLN und der Milz wurden diese nach Eröffnung des Abdomens freipräpariert und mit einer spitzen Pinzette entnommen. Beim Präparieren der MLN wurde sich am Verlauf der Arteria mesenterica superior orientiert.

Zur Entnahme des Rückenmarks wurde das Blutgefäßsystem der Tiere mit 60 ml PBS-Puffer perfundiert. Dazu wurde nach Eröffnung des Thorax ein Entlastungsschnitt in die rechte Herzkammer gemacht und der PBS-Puffer über eine Kanüle langsam über die linke Kammer in den großen Kreislauf injiziert. Anschließend wurde von dorsal das Rückenmark frei präpariert und entnommen.

Bis zur weiteren Verarbeitung wurden die Organe in PBS-Puffer auf Eis aufbewahrt.

2.14 Zelluläre Methoden

2.14.1 Serumgewinnung

Um aus dem Blut das Serum abzutrennen, wurden die Blutproben nach der oben beschriebenen Gewinnung aus dem Herzen 15 min bei 3500 x g zentrifugiert. Das als Überstand von den anderen Blutbestandteilen abgrenzbare Serum wurde abgenommen.

2.14.2 Lymphozytenisolation

2.14.2.1 Lymphozytenisolation aus Lymphknoten

Die Lymphknoten wurden nach Entnahme steril mit PBS/BSA-Puffer durch ein Nylon-Sieb (Porengröße: 40 µm) passiert. Die Suspension wurde zentrifugiert (300 x g, 6 min), der Überstand abgegossen und das Pellet in PBS-Puffer resuspendiert. Die Zellkonzentration wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt.

2.14.2.2 Lymphozytenisolation aus der Milz

Die Milz wurde steril mit PBS-Puffer/BSA durch ein 40 µm-Nylon-Sieb passiert. Die Suspension wurde zentrifugiert (300 x g, 6 min) und das Zellpellet nach dem Abgießen des Überstandes in 1 ml PBS-Puffer resuspendiert. 12 ml TAC Lösung wurden hinzugegeben. Es folgte eine Inkubationszeit von 12 min bei Raumtemperatur (RT) im Dunkeln. Anschließend wurden die Proben mit 16 ml PBS/BSA-Puffer aufgefüllt und zentrifugiert (300 x g, 6 min). Die Splenozyten wurden in PBS-Puffer resuspendiert und die Zellkonzentration mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt.

2.14.2.3 Lymphozytenisolation aus dem Rückenmark

Das Rückenmark wurde mit PBS durch ein grobes Metall-Sieb gedrückt und die Suspension auf ein 40 µm Nylon-Sieb gegeben. Der Durchfluss wurde zentrifugiert (350 x g, 7 min) und das Pellet in 6 ml 30 % PerColl resuspendiert.

In einem zweiten Schritt wurde ein Gradient erstellt. Dazu wurden in einem 15 ml Falcon-Röhrchen 4 ml 45 % PerColl vorgelegt, 2 ml 70 % PerColl mit einer Kanüle darunter und anschließend die in 6 ml 30 % PerColl resuspendierten Zellen auf die Phasen geschichtet. Die Falcon-Röhrchen wurden zentrifugiert (1700 x g, 20 min, reduzierte Beschleunigung, abgeschaltete Bremse).

Die oberste Schicht, überwiegend bestehend aus Myelin, wurde verworfen. Die zwei Zellschichten zwischen den Phasen wurden abgenommen und in einem 15 ml-Falcon-Röhrchen vermischt. Die Zellsuspension wurden mit PBS-Puffer versetzt, zentrifugiert (350 x g, 7 min) und der Überstand abgegossen. Das Pellet wurde im Rest resuspendiert. Die Zellkonzentration wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt.

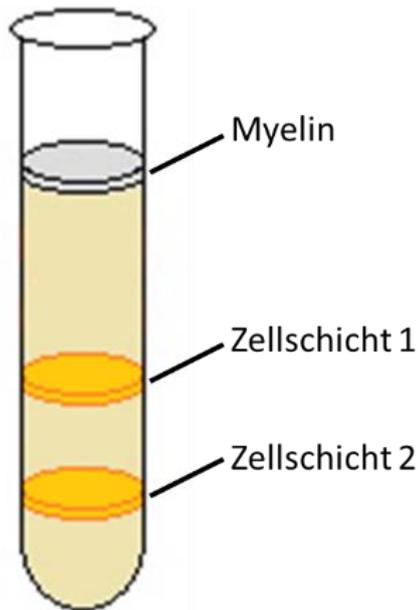


Abbildung 2: Gradient nach Zentrifugation

Ein Gradient wurde mit in 30 % PerColl resuspendierten Zellen sowie 45 % PerColl und 70 % PerColl in einem Falcon-Röhrchen geschichtet. Die Proben wurden zentrifugiert, wodurch sich die Bestandteile des Gradienten nach ihrer Dichte verteilten. Dadurch ergab sich die hier gezeigte Verteilung, bestehend aus einer oberflächlichen Myelinfraktion und zwei von den PerColl-Verdünnungen abgrenzbaren Zellschichten. Letztere wurden vorsichtig abgenommen.

2.14.3 T-Zell-Isolation

2.14.3.1 T-Zell-Isolation mittels MACS®-Technologie

Für die Abtrennung der CD4⁺-T-Zellen aus der Lymphozytensuspension wurde eine positive Selektion unter Verwendung von anti-CD4 Microbeads nach Protokoll des Herstellers (Miltenyi Biotech) durchgeführt. Die Beads und die in MACS-Puffer resuspendierten Zellen wurden in einem Verhältnis von 1:4 (v/v) vermengt, wobei 20 µl Beads pro 1×10^7 Zellen verwendet wurden. Nach einer Inkubationszeit (20 min, 4 °C, Dunkelheit) wurden 8 ml MACS-Puffer hinzugefügt und die Zellen pelletiert (300 x g, 6 min). Die Lymphozyten wurden in MACS-Puffer resuspendiert und auf einen *pre-separation* Filter pipettiert. Anschließend wurden die CD4⁺-T-Zellen mit dem Verfahren zur positiven Selektion (*possel*) des auto-MACS isoliert.

2.14.3.2 T-Zell-Aktivierung

Die T-Zellen wurden mit den Antikörpern R73 (anti-TCRβ) und JJ319 (anti-CD28) costimuliert. Die Vertiefungen einer 24-Wellplatte wurden für die Aktivierung vorbereitet, indem sie mit 1 ml Coating Buffer und 3 µl Sheep anti-Mouse Ig (866 µg/ml, Endkonzentration: 2,6 µg/ml) befüllt und über Nacht inkubiert (4 °C, dunkel) worden waren. Das Medium wurde verworfen, und die Vertiefungen wurden mit 1 ml BSS und anschließend zweimal mit PBS-Puffer gewaschen. Die

Antikörper R73 und JJ319 wurden in einer Konzentration von je 4 µg/ml in 0,5 ml PBS/BSA-Puffer in die Vertiefungen pipettiert und 3 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Das Medium wurde verworfen, die Vertiefungen wurden einmal mit PBS-Puffer gewaschen und im Anschluss mit 1 ml RPMI++-Medium befüllt. Pro Ansatz wurden 10^6 T-Zellen hinzugegeben. Die Aktivierung fand über 24, 28 oder 72 h unter Inkubation im Brutschrank statt.

2.14.4 T-Zell-Transfer

T-Zellen wurden aus den Lymphknoten eGFP-transgener Lewis-Ratten isoliert. 5×10^7 dieser „Wildtyp“-Lymphozyten wurden in die Schwanzvene von Gimap5-defizienten Ratten im Alter von 10 Wochen injiziert. Nach 12 Wochen wurde der Anteil der GFP⁺-Zellen an allen T-Zellen der Gimap5-defizienten Ratten im Blut und der Anteil der Lymphozyten an den Leukozyten des Blutes mittels Durchflusszytometrie gemessen.

2.14.5 Durchflusszytometrie

Moleküle auf der Zelloberfläche, im Zytosol oder im Zellkern wurden mit Hilfe der Durchflusszytometrie analysiert. Dazu mussten diese spezifisch mittels Fluorochrom-konjugierter monoklonaler Antikörper oder anderer Proteine angefärbt werden. Zuerst wurden extrazelluläre Strukturen gefärbt. Sollten zusätzlich intrazelluläre Proteine dargestellt werden, wurden diese im Anschluss nach einem Protokoll von BD Biosciences oder oder eBioscience gefärbt.

2.14.5.1 Extrazelluläre Färbung

Die Zellen wurden in FACS-Puffer resuspendiert. Zuerst wurden entweder ein Fluorochrom- oder Biotin-gekoppelter Antikörper hinzugefügt und 20 min bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Wurde im ersten Schritt ein Biotin-gekoppelter Antikörper verwendet, so wurde dieser im zweiten Schritt durch Zugabe von Fluorochrom-gekoppeltem Streptavidin (SA-APC-Cy7) detektiert und hierzu 15 min bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Nach jedem Schritt der Färbung wurden die FACS-Röhrchen mit 4 ml FACS-Puffer aufgefüllt, zentrifugiert (400 x g, 5 min) und der Überstand abgegossen.

2.14.5.2 Intrazelluläre Färbung

2.14.5.2.1 BD-Protokoll

Das BD-Protokoll wurde zur Darstellung von Proteinen im Zytosol verwendet. Nach dem letzten Schritt der extrazellulären Färbung wurden die Zellen mit 4 ml FACS-Puffer gewaschen (400 x g, 5 min). 100 µl Cytofix/Cytoperm-Puffer wurden hinzugefügt, die Zellen inkubiert (20 min, 4 °C) und anschließend zweimal mit 2 ml Perm/Wash-Puffer gewaschen. Antikörper zur Markierung der intrazellulären Strukturen die im Durchflusszytometer sichtbar gemacht werden sollten wurde zu den Zellen zugegeben und 30 min bei 4 °C inkubiert. Zuletzt wurden die Proben einmal mit 2 ml Perm/Wash-Puffer und ein weiteres Mal mit 2 ml FACS-Puffer gewaschen.

2.14.5.2.2 eBioscience-Protokoll

Das eBioscience-Protokoll wurde zur Färbung nukleärer Transkriptionsfaktoren angewandt. Dazu wurden die Proben nach dem letzten Schritt der extrazellulären Färbung mit 4 ml FACS-Puffer gewaschen (400 x g, 5 min) und mit 100 µl Fix/Perm-Puffer (bestehend aus 75 µl Diluent und 25 µl Konzentrat) für 30 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 2 ml PBS-Puffer und ein zweites Mal mit 2 ml Perm/Wash-Puffer gewaschen. Antikörper gegen die darzustellenden Transkriptionsfaktoren wurden hinzugegeben und inkubiert (30 min, 4 °C). Vor der durchflusszytometrischen Messung wurden die Proben mit 2 ml Perm/Wash-Puffer gewaschen.

2.14.5.3 Apoptose-Analyse

Die Lymphozyten wurden nach der extrazellulären Färbung mit 4 ml FACS-Puffer gewaschen (400 x g, 5 min). Nach Verwerfen des Überstandes wurden die Proben mit 100 µl Annexin-V-Bindpuffer, 1 µl AnnexinV-Cy5 und 7 µl 7-AAD 15 min bei 4 °C inkubiert und im Anschluss ohne einen weiteren Waschvorgang analysiert.

2.14.5.4 FACS-Analyse von Blutproben

In mit Alsevers gefüllte FACS-Röhrchen wurden ca. 50 µl Blut aus der punktierten Schwanzvene der Ratten gegeben. Die Proben wurden zentrifugiert (400 x g, 5 min) und der Überstand verworfen. Die Zellen wurden mit Antikörpern nach Art

der oben beschriebenen extrazellulären Färbung markiert. Nach dem letzten Schritt der Färbung wurden die Proben mit 4 ml FACS-Puffer gewaschen. Das Zellpellet wurde durch sorgfältiges Mischen resuspendiert, dann wurden 100 μ l OptiLyse hinzugefügt und inkubiert (12 min, RT, Dunkelheit). Im Anschluss wurde 1 ml H₂O auf die Proben gegeben und 1,5 h bei RT im Dunkeln inkubiert. Die Suspension wurde mit 3 ml FACS-Puffer gewaschen.

2.15 Molekulare Methoden

2.15.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Eine PCR wurde eingesetzt, um zu kontrollieren, dass die Herstellung von cDNA aus RNA-Proben erfolgreich war. Dazu wurde 1 μ l der cDNA vorgelegt und 2,5 μ l Mg-Puffer (10x), 1 μ l dNTPs, 0,5 μ l Primermix (5 μ M Vorwärts- und 5 μ M Rückwärts-Primer β -Actin), 0,2 μ l Taq Polymerase und 19,8 μ l H₂O hinzugegeben.

Tabelle 11: PCR-Protokoll

Schritt	Temperatur	Zeit	
initiale Denaturierung	95 °C	2 min	
Denaturierung	95 °C	15 sec	} in 35 Zyklen
Primerhybridisierung	60 °C	30 sec	
Elongation	72 °C	30 sec	
finale Elongation	72 °C	10 min	

2.15.2 Gelelektrophorese

Zur Sichtbarmachung der PCR-Produkte wurden die Proben nach Ablauf der Reaktion mit Orange DNA Loading Dye gefärbt und auf ein 1 %-Agarose-Gel aufgetragen. Die Elektrophorese lief 35 min bei 130 Volt und 280 mAmpere

2.15.3 RNA-Isolation

Die RNA wurde aus $1-5 \times 10^6$ Lymphozyten isoliert. Dazu wurde dem Protokoll aus dem Quick-RNA™ MiniPrep-Kit gefolgt. Die Lymphozyten wurden zuerst pelletiert (500 g, 8 min) und in 300 μ l RNA Lysis Buffer resuspendiert. Um die Proben von genomischer DNA zu reinigen, wurden sie bei $\geq 10.000 \times g$ für eine Minute zentrifugiert und der Überstand auf einen Spin-Away™ Filter in einem Collection Tube übertragen und bei $\geq 10.000 \times g$ für eine Minute zentrifugiert. Die weiteren Zentrifugationsschritte wurden alle mit einer Drehgeschwindigkeit von 10.000-16.000 $\times g$ vollzogen. Der Durchfluss der letzten Zentrifugation wurde zur RNA-Reinigung mit einem Volumen von 300 μ l Ethanol (99,8 %) gemischt, auf eine Zymo-Spin™ IIICG Column in einem Collection Tube gegeben und für 30 Sekunden zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen. Als nächstes wurden 400 μ l RNA Prep Buffer auf die Säule gegeben und für 30 Sekunden zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen. Anschließend folgten zwei Waschschritte mit 700 und 400 μ l Wash Buffer, in denen für 30 Sekunden beziehungsweise 2 min zentrifugiert sowie erneut die Durchflüsse verworfen wurden. Danach wurden die Säulen in RNase-freie Mikroreaktionsgefäße gesetzt und 30 μ l DNase/RNase-Free Water direkt auf die Säulen-Matrix pipettiert. Die Proben wurden für 30 Sekunden bei $21.000 \times g$ zentrifugiert. Die isolierte RNA wurde bei $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ eingefroren.

2.15.3.1 Qualitative und quantitative Analyse von RNA

Nach erfolgter Isolierung wurde die Konzentration der RNA mit Hilfe des Nano-Drops photometrisch bestimmt. Dazu wurde die RNA-Konzentration in 1 μ l der Probe bei einer Wellenlänge 260 nm gemessen. Zur Überprüfung der Reinheit wurde das Verhältnis 260/230 nm (Aussage über Lösemittel im Eluat) sowie 260/280 nm (Aussage über Proteinkontamination im Eluat) ermittelt. Die Qualität der RNA wurde mittels Gelelektrophorese mit einem 1%igen Agarosegel kontrolliert.

2.15.4 cDNA-Synthese

Zur Herstellung von cDNA aus RNA wurden 500 ng RNA in 15,75 μ l H₂O in Mikroreaktionsgefäße übertragen. Die Konzentration der RNA in der Probe

wurde mit dem Programm „Nano-Drop 2000“ ermittelt. 0,25 µl reverse Transkriptase und 4 µl iScript-Puffer (5x) wurden hinzugefügt. Die Gefäße wurden in einem Thermomixer für 5 min bei 25 °C, danach für 30 min bei 42 °C und zuletzt für 5 min bei 85 °C inkubiert.

2.15.5 quantitative Echtzeit-PCR (qrtPCR)

Zum Quantifizieren der Genexpression in Lymphozyten wurde nach Isolation der RNA und deren reversen Transkription in cDNA die Menge der Transkriptionsprodukte mit Hilfe der quantitativen Echtzeit-PCR bestimmt. Dazu wurde 1 µl cDNA in ein „96-well Optical Reaction Plate“ vorgelegt und 12,5 µl SYBR Green Power Mix, 11 µl H₂O sowie 0,5 µl Primer (10 µM Vorwärts- und Rückwärts-Primer) hinzugegeben. Die Primer wurden so gewählt, dass es nach ihrem Anlagern an die cDNA zum Ablesen des in seiner Expression zu quantifizierenden Gens kommen sollte.

Tabelle 12: qrtPCR-Protokoll

Schritt	Temperatur	Zeit	
Enzymaktivierung	50 °C	2 min	
initiale Denaturierung	95 °C	10 min	
Denaturierung	95 °C	15 sec	} in 40 Zyklen
Primerhybridisierung/Elongation	60 °C	1 min	
Dissoziation	95 °C	15 sec	
	60 °C	20 sec	
Aufzeichnung der Dissoziationskurve	Schrittweise Temperaturerhöhung auf 95 °C	20 sec	

2.15.6 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Zur Analyse der Konzentration der IgE und IgG Antikörper-Isotypen im Serum der Ratten wurden ELISAs nach dem jeweiligen Protokoll des Herstellers für das jeweilige Kit durchgeführt.

2.15.6.1 IgE-ELISA

Im ersten Schritt wurden 30 µl der Serumproben der Versuchstiere 1:10 mit 270 µl 1x Diluent verdünnt. Die 6 Standards wurden über eine Verdünnungsreihe angesetzt, indem im ersten Mikroreaktionsgefäß 8 µl IgE Calibrator (Konzentration 3,192 µg/ml) zu 790 µl 1x Diluent gegeben (Standard #1) und 300 µl dieses Standards in ein weiteres Mikroreaktionsgefäß zu 300 µl 1x Diluent überführt wurden (Standard #2). Die Standards #3-6 wurden durch wiederholten Transfer von 300 µl des zuletzt präparierten Standards zu 300 µl 1x Diluent hergestellt. 1x Diluent diente als Null-Standard (0 ng/ml).

Tabelle 13: Standards IgE-ELISA

Standard #	1	2	3	4	5	6
Konzentration des Calibrators (ng/ml)	32	16	8	4	2	1

Die im Kit beinhalteten, mit dem Primary Capture Antibody beschichteten 96-Well-Platten-Streifen wurden mit 100 µl der Standards und den verdünnten Serumproben befüllt. Die Platte wurde mit Parafilm bedeckt für 60 min bei RT auf dem Schüttler inkubiert. Anschließend wurden die Flüssigkeit der Vertiefungen gut abgeschüttet und auf Papier abgeklopft, daraufhin verdünnte (20x Wash Buffer Concentrate 1:20 mit destilliertem Wasser) Wash Solution zugegeben, die wiederum abgeschüttet wurde. Dieser Waschvorgang wurde 3x wiederholt um insgesamt 4 Waschschritte durchzuführen. Danach wurden zu jeder Vertiefung 100 µl verdünntes (1:100 mit 1x Diluent (pro Teststreifen 10 µl Conjugate + 990 µl 1x Diluent)) Enzyme-Antibody Conjugate zugefügt und die Proben mit Parafilm bedeckt 60 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Danach wurden abermals die oben beschriebenen 4 Waschgänge durchgeführt. 100 µl TMB Substrate Solution wurden in jede Vertiefung pipettiert und die Proben mit Parafilm bedeckt 10 min bei

RT im Dunkeln inkubiert. Die Reaktion wurde mit dem Pipettieren von 100 μ l Stop Solution in jede Vertiefung beendet.

Die Absorption der einzelnen Proben wurde im Photometer bei 450 bzw. 570 nm gemessen. Aus den log-Werten der Absorption der Standards konnte eine Geradengleichung ermittelt und über diese die IgE-Konzentration in den Serum-Proben berechnet werden.

2.15.6.2 IgG-ELISA

Zu Beginn wurden die Serumproben der Versuchstiere 1:80.000 mit 1x Diluent verdünnt. Dazu wurden im ersten Schritt 2 μ l der Seren zu 798 μ l 1x Diluent gegeben und von dieser Mischung anschließend 5 μ l mit 995 μ l 1x Diluent gemischt.

Die Standards wurden mit einer Verdünnungsreihe angesetzt. Zuerst wurden 5 μ l des Calibrators (11,52 mg/ml) mit 495 μ l 1x Diluent vermischt (Standard #1). Davon wurden 5 μ l in ein zweites mit 715 μ l 1x Diluent gefülltes Mikroreaktionsgefäß überführt (Standard #2). Die Standards #3-7 wurden hergestellt, indem je 300 μ l des zuletzt pipettierten Standards mit 300 μ l des 1x Diluents gemischt wurden. 1x Diluent diente als Null-Standard (0 ng/ml).

Tabelle 14: Standards IgG-ELISA

Standard #	1	2	3	4	5	6	7
Konzentration des Calibrators (ng/ml)	115.200	800	400	200	100	50	25

100 μ l der Standards und der verdünnten Serumproben wurden in die im Kit beinhalteten, mit dem Primary Capture Antibody beschichteten 96-Well-Plattenstreifen pipettiert und die Proben mit Parafilm bedeckt 60 min bei RT auf dem Schüttler inkubiert. Anschließend wurde die Flüssigkeit in den Vertiefungen abgeschüttet, auf einem Handtuch abgeklopft und verdünnte Wash Solution zugegeben. Diese wurde erneut abgeschüttet und anschließend wurden 3 weitere Waschgänge in gleichem Ablauf durchgeführt. Nach dem letzten Abschütten wurden 100 μ l des verdünnten Enzym-Antikörper Konjugats in die Vertiefungen pipettiert und die Proben mit Parafilm bedeckt für 30 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Danach wurde die Platte wie oben beschrieben gewaschen und nach dem

letzten Abschütten wurden 100 µl TMB Substrate Solution in jede Vertiefung gegeben. Anschließend folgte eine 10-minütige Inkubation bei RT im Dunkeln, nach der 100 µl Stop Solution in jede Vertiefung gegeben wurden.

Die Absorption der einzelnen Proben wurde im Photometer bei 450 bzw. 570 nm gemessen. Aus den log-Werten der Standard-Absorption konnte eine Standard-Geradengleichung ermittelt und über diese die IgE-Konzentration in den Serum-Proben berechnet werden.

2.15.7 Cytometric Bead Array (CBA)

Der CBA wurde nach dem Protokoll des Herstellers (BD Biosciences) aus dem *BD CBA Mouse/Rat Soluble Protein Master Buffer Kit* durchgeführt.

Um die Standards herzustellen, wurden von jedem zu testenden *BD CBA Rat Soluble Protein Flex Set* ein gefriergetrocknetes Standard-Kügelchen in einem 15 ml Rundboden-Polypropylenröhrchen gepoolt und als „Top Standard“ mit 4 ml Assay Diluent rekonstituiert, 15 min bei RT äquilibriert und vorsichtig durch Pipettieren gemischt. Für die weiteren 8 Standards wurde eine Verdünnungsreihe angelegt, indem in jedem Röhrchen 500 µl Assay Diluent vorgelegt wurden und anschließend 500 µl des zuletzt pipettierten Standards (beginnend mit dem Top Standard) hinzugefügt und durch Pipettieren gemischt wurden. Ein Röhrchen mit Assay Diluent diente als Negativkontrolle (0 pg/ml).

Tabelle 15 Standards Cytometric Bead Array

Rat Soluble Protein Flex Set	Top Standard	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256
Protein (pg/ml)	10.000	5.000	2.500	1.250	625	312,5	156	80	40

Als nächstes wurden *die Rat Soluble Protein Flex Capture Beads* gemischt. Pro Probe wurden 0,5 µl der Beads aus jedem verwendeten *BD CBA Rat Soluble Protein Flex Set* eingesetzt und nach gutem Mischen der *Capture Bead Stocks* vereint. Die vereinten Beads wurden mit dem *Capture Bead Diluent* so verdünnt, dass pro Probe insgesamt 20 µl verdünnte Beads zur Verfügung standen (bei 4

verschiedenen Beads 0,5 µl x 4 und 18 µl Diluent pro Probe). Die gemischten *Capture Beads* wurden direkt ohne Lagerung verwendet.

In einer Flachboden-96-Well-Platte wurden die der Proben und Standardanzahl entsprechend benötigten Vertiefungen mit 30 µl Wash Buffer gefüllt. 20 µl der Standard-Verdünnungen wurden in die ersten 10 Vertiefungen von der geringsten (Negativkontrolle) bis zur höchsten (Top Standard) Verdünnung pipettiert. Danach wurden die gemischten *Capture Beads* für mindestens 5 Sekunden gemischt, 20 µl der Beads in jede Vertiefung gegeben und durch Pipettieren vermischt. 20 µl jeder zu untersuchenden Probe wurden in die vorbereiteten Vertiefungen gefügt. Die Platte wurde eine Stunde lang bei RT im Dunkeln inkubiert.

Während der Inkubationszeit wurden die *PE Detection Reagents* verdünnt. Dies erfolgte nach dem gleichen Prinzip wie das Mischen der *Capture Beads* (bei 4 verschiedenen *PE Detection Reagents* 0,5 µl x 4 und 18 µl Diluent pro Probe).

20 µl der zubereiteten *PE Detection Reagents* wurden durch Pipettieren in die Vertiefungen gemischt und 2 Stunden bei RT im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden 150 µl Wash Buffer in jede Vertiefung zugefügt und die Platten zentrifugiert (350 x g, 3 min). Die Platten wurden abgeschüttet und auf einem Handtuch abgeklopft. Danach wurden 50 µl Wash Buffer in jedes Well gegeben und die Lösungen einzeln aus den Vertiefungen in FACS-Röhrchen überführt.

2.16 Statistik

Die statistischen Analysen der Messdaten wurden mit Hilfe der Prism Software durchgeführt. Es wurde stets der ungepaarte t-Test angewandt. Alle Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm Standardfehler (SEM) aufgeführt. Signifikanzniveaus: n.s. = nicht signifikant: $p > 0,05$; *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$.

3 Ergebnisse

3.1 Gimap5-defiziente Ratten zeigen eine schwere T-Zell-Lymphopenie

Bereits in BB- und PVG-Ratten wurde nach Verlust der anti-apoptotisch wirkenden GTPase Gimap5 durch eine *loss-of-function*-Mutation im *lyp*-Gen eine T-Zell-Lymphopenie beobachtet (Cousins et al. 2006; MacMurray et al. 2002). Um zu überprüfen, ob ein ähnlicher Effekt durch die *loss-of-function*-Mutation in Lewis-

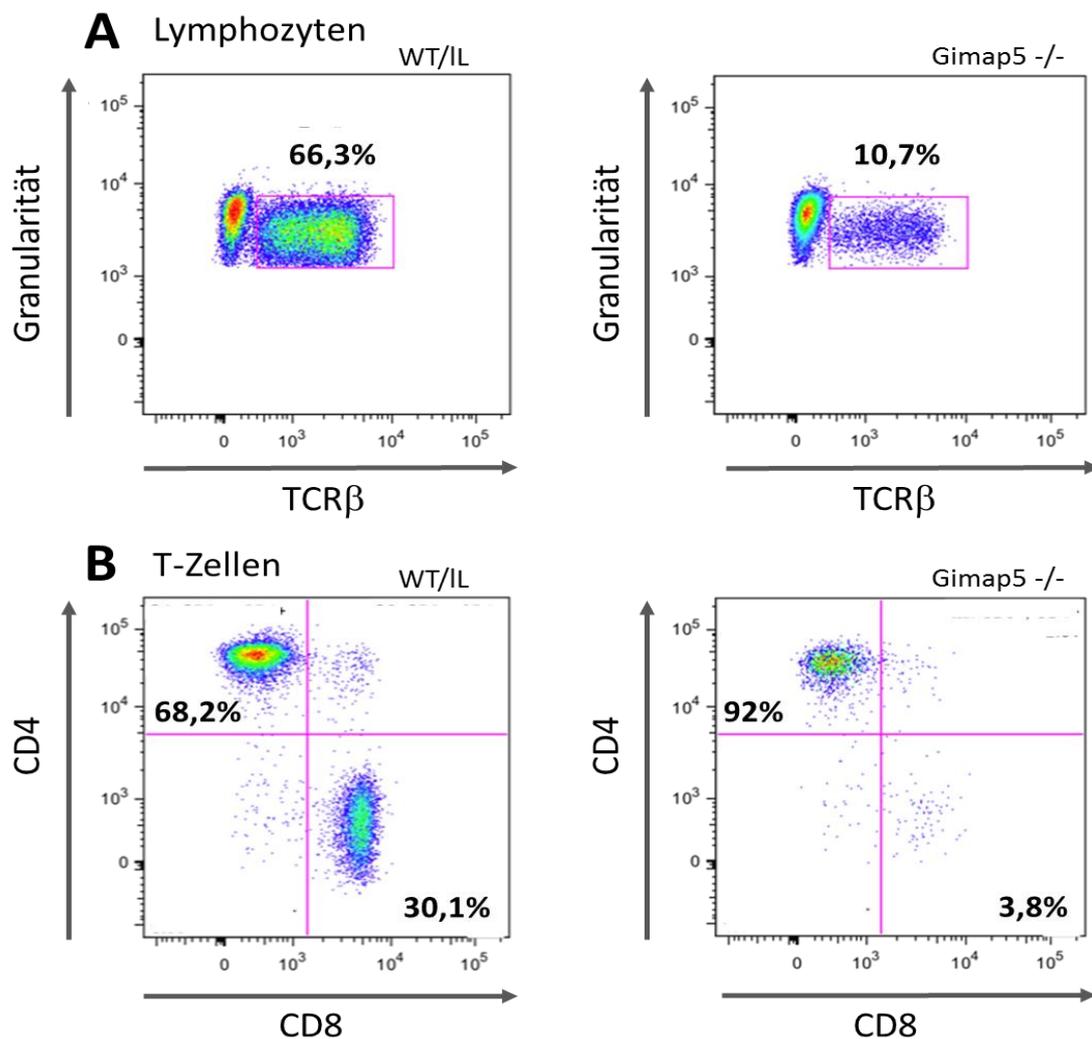


Abbildung 3: Gimap5-defiziente Ratten zeigen eine T-Zell-Lymphopenie sowie einen relativen Mangel an CD8⁺-T-Zellen im Blut.

Aus Blut isolierte Lymphozyten wurden auf gesamte T-Zellen (anti-TCRβ) sowie CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen analysiert. Die T-Zellen wurde nach Granularität und TCRβ-Expression eingegrenzt (A) und anschließend auf Basis der Expression von CD4 und CD8 in ihre Untergruppen unterteilt (B). Es sind die Daten einer repräsentativen Ratte jedes Genotyps dargestellt.

Ratten auftritt, untersuchten wir Blut und Lymphknoten von *Gimap5*-defizienten Ratten auf diesem genetischen Hintergrund mittels Durchflusszytometrie. Hierzu färbten wir die Proben mit Fluoreszenz-markierten Antikörpern gegen den T-Zell-Rezeptor (anti-TCR β) sowie gegen CD4 und CD8. Eine *Gimap5*-Defizienz führte sowohl zu einer Reduktion der absoluten Zahl der Lymphozyten und ihren Untergruppen (Daten nicht gezeigt) als auch, wie in Abbildung 3 exemplarisch dargestellt, zu einer Verschiebung des relativen Anteils der gesamten T-Zellen an den aus den Lymphknoten isolierten Zellen sowie des Verhältnisses der CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen zueinander. Der Verlust eines Allels des *lyp*-Gens war für das Auftreten des Phänotyps nicht ausreichend. Heterozygote Tiere (IL) und wildtypische Tiere (WT) wurden daher in den folgenden Experimenten gleichermaßen als Kontrollen für *Gimap5*-defiziente Ratten (*Gimap5* -/-) verwendet.

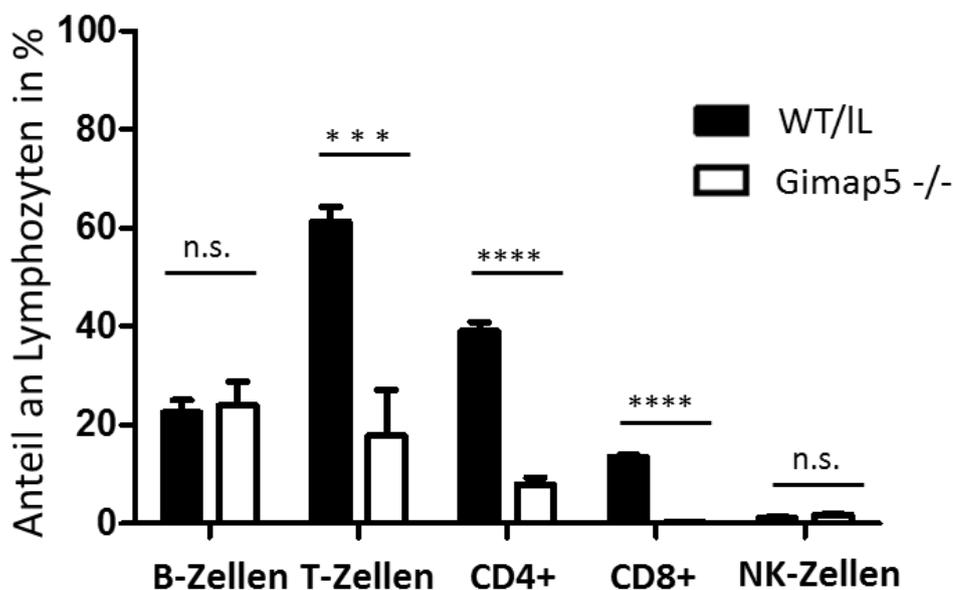


Abbildung 4: *Gimap5*-defiziente Tiere weisen in den Lymphknoten eine T-Zell-Lymphopenie auf.

Analyse der relativen Anteile der B-, T- und NK-Zellen sowie der CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen an den isolierten Lymphozyten aus Lymphknoten. Die Messdaten sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt; als statistische Analyse wurde der ungepaarte t-Test angewandt (****: $p < 0,0001$, ***: $p < 0,001$, n.s.: nicht signifikant). Für eine genaue Aufschlüsselung der jeweiligen Tierzahlen siehe Tabelle A1 im Anhang.

Eine detaillierte statistische Analyse der Veränderungen in der Lymphozytenzusammensetzung in den Lymphknoten von Gimap5-defizienten Ratten zeigte eine signifikante Reduktion sowohl des Anteils der gesamten T-Zellen als auch der einzelnen CD4⁺- und CD8⁺-Fraktionen (Abbildung 4). Die Anteile der B- und NK-Zellen waren dagegen weitgehend unverändert.

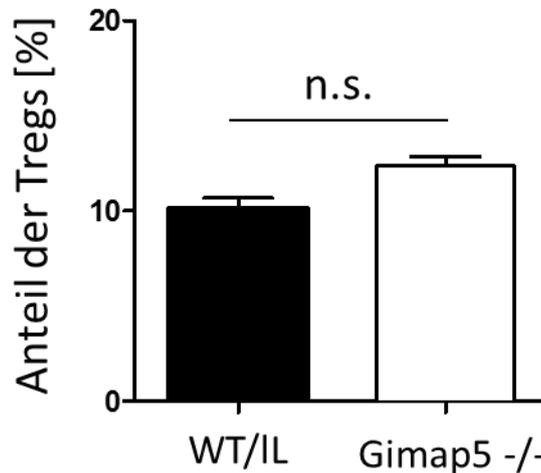


Abbildung 5: Gimap5-defiziente Ratten besitzen einen normalen Anteil regulatorischer T-Zellen.

Lymphknoten-Zellen wurden von 9 WT/IL und 6 Gimap5 -/- Ratten isoliert und mit Antikörpern gegen die Oberflächenantigene TCR β , CD4, CD8 und CD25 gefärbt. Zusätzlich wurde der Treg-spezifische Transkriptionsfaktor FoxP3 intrazellulär gefärbt. Die Expression wurde mittels Durchflusszytometrie gemessen. In der Auswertung wurde zuerst ein Lymphozyten-Gate basierend auf der Zellgröße (FSC) und der Granularität (SSC) der Zellen erstellt. Im Histogramm wurden die TCR β ⁺-T-Zellen eingegrenzt und anschließend nach CD4 und CD8 Expression eingeteilt. Unter den CD4⁺-T-Zellen wurden im letzten Schritt die für CD25 und FoxP3 doppelt-positiven Tregs eingegrenzt. Die Messdaten sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt. Für die statistische Analyse wurde der un gepaarte t-Test angewandt (n.s.: nicht signifikant).

Frühere Untersuchungen zur Auswirkung einer Gimap5-Defizienz hatten auf eine wichtige Rolle regulatorischer T-Zellen (Tregs) hingewiesen (Lundsgaard et al. 2005; Poussier et al. 2005). Zur näheren Untersuchung dieser Subpopulation wurde daher deren Anteil an den CD4⁺-T-Zellen in Gimap5-defizienten Ratten und Kontrolltieren miteinander verglichen. Diese wurde mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Wie Abbildung 5 zeigt, gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Genotypen.

3.2 Folgen der Gimap5-Defizienz für Proliferation, Überleben und das TCR-Repertoire der T-Zellen

3.2.1 Gimap5-defiziente T-Zellen zeigen eine erhöhte Apoptoserate

Gimap5 erfüllt eine anti-apoptotische Funktion in Lymphozyten (Nitta und Takahama 2007). Aus diesem Grund sollte die Folge des Gimap5-Verlustes auf das Apoptoseverhalten der T-Zellen in Lewis-Ratten untersucht werden. Hierzu wurden diese aus den Lymphknoten von Gimap5-defizienten Tieren sowie Kontrolltieren isoliert und anschließend über 24 h kultiviert. Mittels Durchflusszytometrie wurde der Anteil lebender Zellen zu Beginn und nach der Kultur ermittelt. Als Apoptosemarker wurden AnnexinV und 7-AAD verwendet.

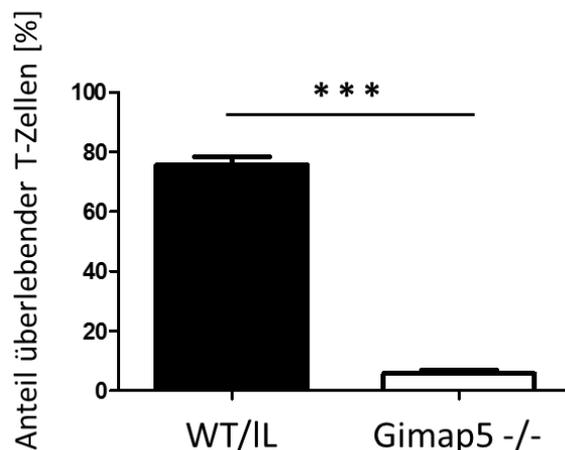


Abbildung 6: Gimap5-defiziente T-Zellen zeigen eine stark erhöhte Spontan-Apoptoserate.

Lymphknoten von Gimap5-defizienten Ratten und Kontrolltieren wurden über 24 h kultiviert. Die Überlebensrate der T-Zellen wurde mittels der Apoptosemarker AnnexinV und 7-AAD im Durchflusszytometer gemessen. Die Messdaten sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt; als statistische Analyse wurde der ungepaarte t-Test angewandt (***: $p < 0,001$). $n = 10$ (WT/IL), $n = 2$ (Gimap5 -/-).

Abbildung 6 zeigt, dass 75,7 % der T-Zellen am Ende der Kulturzeit überlebt hatten, während dies nur bei 5,8 % der Gimap5-defizienten T-Zellen der Fall war. Dies belegt, dass die Spontanapoptose von T-Zellen durch den Verlust von Gimap5 signifikant stark erhöht ist.

3.2.2 Naive Gimap5-defiziente CD4⁺-T-Zellen durchlaufen einen beschleunigten Zellzyklus

Es ist bekannt, dass die in den peripheren lymphatischen Organen befindlichen Lymphozyten in einer lymphopenen Umgebung zur Proliferation angeregt werden, um den dortigen Immunzellmangel auszugleichen (Goldrath und Bevan 1999a; Marleau und Sarvetnick 2005).

Nachdem wir in den Gimap5-defizienten Tieren eine Lymphopenie nachweisen konnten, erforschten wir, ob sich die Gimap5-defizienten T-Lymphozyten in der Zellzyklusgeschwindigkeit von Kontrollzellen unterschieden. Dazu wurde die Expression der an den Zellzyklus-Kontrollpunkten beteiligten Zykline E und B mittels Real-Time PCR bei CD4⁺-T-Zellen bestimmt. Diese wurden entweder unmittelbar nach ihrer Entnahme analysiert (d0) oder nach Costimulation mit den Antikörpern R73 (anti-TCR β) und JJ319 (anti-CD28) über 24 h (d1) bzw. 48 h (d2). Die Menge der Zyklin-Transkripte wurde relativ zu den als *Housekeeping*-Gen verwendeten β -Aktin-Transkripten berechnet.

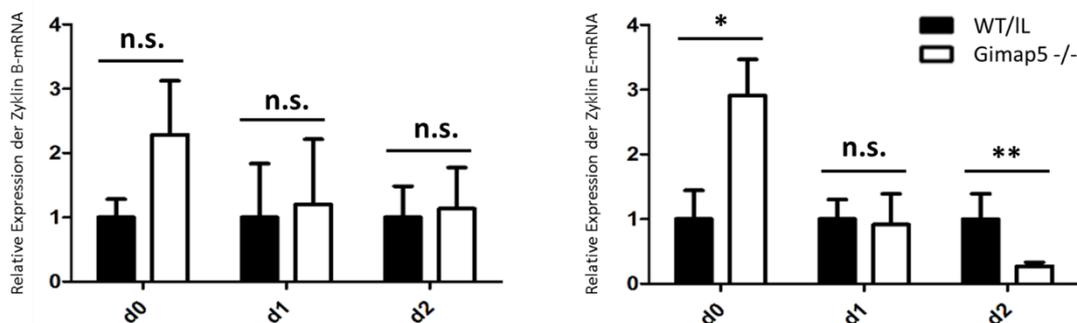


Abbildung 7: Naive T-Zellen Gimap5-defizienter Ratten zeigen eine erhöhte Expression von Kontrollproteinen des Zellzyklus.

RNA wurde von naiven (d0) sowie von über 24 h (d1) oder 48 h (d2) costimulierten CD4⁺-Zellen aus Lymphknoten von Gimap5-defizienten Ratten und Kontrolltieren isoliert. Die Expression von Zyklin B und E wurde mittels qPCR gemessen. Für Zyklin B wurden 8/6 (d0), 6/7 (d1) und 7/8 (d2) Kontrollratten/Gimap5-defiziente Ratten untersucht, für Zyklin E waren es 8/8 (d0), 7/7 (d1) und 6/7 (d2) Tiere. Die Messdaten sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt; als statistische Analyse wurde der ungepaarte t-Test angewandt (**: $p < 0,01$, *: $p < 0,05$, n.s.: nicht signifikant).

Abbildung 7 zeigt, dass sowohl die Genexpression von Zyklin E als auch B in frisch aus den Lymphknoten Gimap5-defizienter Tiere isolierter T-Zellen im Ver-

gleich zu den Kontrollen erhöht war. Bei Zyklin E ergab sich ein signifikanter Unterschied, bei Zyklin B dagegen lediglich eine Tendenz. Unstimuliert durchlaufen die T-Zellen der Gimap5-defizienten Tiere den Zellzyklus folglich schneller und proliferieren stärker als die Kontroll-T-Zellen. Bei Costimulation gab es nach 24 h keinen signifikanten Unterschied, nach 48 h wurde in den Kontroll-T-Zellen eine im Vergleich zu den Gimap5-defizienten Zellen signifikant höhere Expression von Zyklin E gemessen. Die Unterschiede in der Zyklin B Expression waren nicht signifikant. Zum Ausgleich der durch die erhöhte Apoptoserate entstandenen Lymphopenie teilen sich die naiven Gimap5-defizienten T-Zellen offensichtlich häufiger als die Kontrollzellen.

3.2.3 Gimap5-defiziente T-Zellen zeigen ein verändertes V β -Spektrum

Nachdem in den Gimap5-defizienten Tieren eine erhöhte Proliferationsrate peripherer T-Zellen nachgewiesen werden konnte, wurde untersucht, ob dies das Repertoire der T-Zellen beeinflusst. Die als Reaktion auf eine lymphopene Umgebung erhöhte Zellteilungsrate der T-Zellen in der Peripherie beruht häufig auf

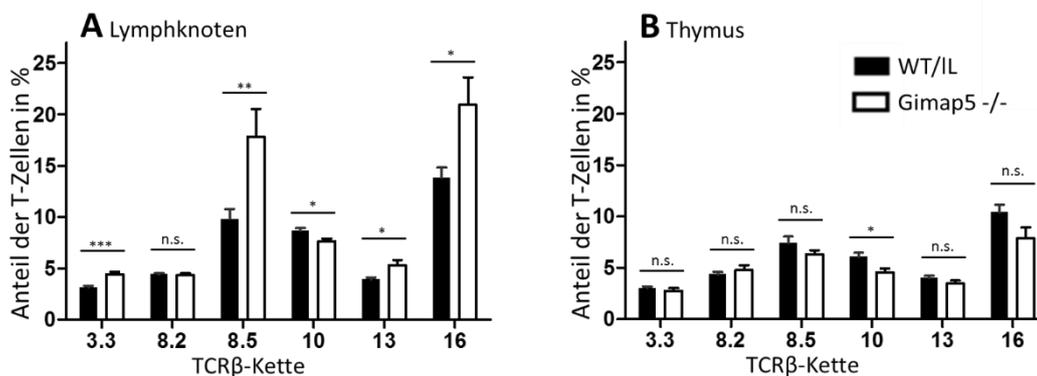


Abbildung 14: Gimap5-defiziente T-Zellen zeigen ein verändertes V β -Spektrum in den Lymphknoten, aber nicht im Thymus.

Lymphozyten wurden aus den Lymphknoten (A) und dem Thymus (B) von 7 bzw. 8 Gimap5^{-/-} Ratten und 12 bzw. 11 Kontrollratten (WT/IL) isoliert. Der TCR sowie die V β -Ketten 3.3, 8.2, 8.5, 10, 13 und 16 wurden mit Antikörpern markiert und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die T-Zellen wurden nach Granularität (SSC) und TCR β -Expression eingegrenzt. Anschließend wurden die T-Zellen auf die Expression der einzelnen V β -Ketten analysiert. Die Messdaten sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt; als statistische Analyse wurde der ungepaarte t-Test angewandt (**: $p < 0,01$, *: $p < 0,05$, n.s.: nicht signifikant).

dem Mechanismus der LiP, bei der einzelne T-Zell-Klone stärker proliferieren als andere (vgl. 1.3 Lymphopenie erhöht die Neigung zur Autoimmunität). Dies wiederum hängt unter anderem mit der unterschiedlichen Affinität des TCR auf umliegende Antigene zusammen. Als Maß für das TCR-Repertoire der T-Zellen wurde das Spektrum der V β -Ketten auf den T-Zellen in den Lymphknoten und im Thymus von Gimap5-defizienten Ratten und Kontrolltieren analysiert. Die relativen Anteile der CD4⁺ Zellen, die eine der 6 untersuchten V β -Ketten exprimierten sind in Abbildung 8 dargestellt. Es wurde die Expression der V β -Ketten 3.3, 8.2, 8.5, 10, 13 und 16 untersucht. In den Lymphknoten war das V β -Spektrum der Gimap5-defizienten Zellen teilweise verändert. So unterschied sich die Expression von V β 3.3, V β 8.5, V β 10 und V β 16 in Abwesenheit von Gimap5 signifikant von der auf Kontrollzellen beobachteten Expression (Abbildung 8A). Im Thymus hingegen war das V β -Spektrum von Gimap5-defizienten Zellen unverändert (Abbildung 8B). Diese Ergebnisse sprechen für eine Proliferation der reifen T-Zellen in der Peripherie bedingt durch den Zustand der Lymphopenie und gegen einen Defekt der Selektionsmechanismen im Thymus, da die V β -Kettenverteilungen zwischen Gimap5-defizienten Tieren und Kontrollen hier nahezu gleich waren.

3.2.4 Anreicherung aktivierter T-Zellen in der Peripherie

Zuletzt wurde untersucht, ob neben dem V β -Spektrum auch das Aktivierungsniveau der peripheren T-Zellen durch die LiP verändert war. Dazu wurde die Expression zweier Oberflächenmarker und die intrazelluläre Expression von Interferon- γ (IFN γ) analysiert. CD134 ist ein zur Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor Familie gehörender Oberflächenmarker, der überwiegend von aktivierten CD4⁺-T-Zellen exprimiert wird. IFN γ ist ein Zytokin, das von TH1-Zellen und CD8⁺-Effektor-T-Zellen nach deren Kontakt mit einer APC ausgeschüttet wird und Makrophagen aktiviert. Das Lymphozyten-Funktion-assoziierte Antigen-1 (LFA-1) spielt eine Rolle bei der interzellulären Adhäsion aktivierter Lymphozyten (Ali et al. 2004; Murphy und Weaver 2016).

Aus Abbildung 9 geht hervor, dass die Expression der Aktivierungsmarker CD134 und IFN γ bei den Gesamt-T-Zellen sowie den CD4⁺ und CD8⁺ T-Zell-Subpopulationen im Thymus von Gimap5-defizienten Ratten und Kontrolltieren gleich war. In den Lymphknoten und in der Milz exprimierten die T-Zellen Gimap5-defizienter Tiere hingegen CD134, IFN γ und LFA-1 zu einem höheren Anteil als Kontroll-T-

Zellen dies tun. In der Messung von CD134 spiegelte sich dieser Unterschied am deutlichsten bei den CD4⁺-T-Zellen wider. IFN γ hingegen wurde signifikant häufiger von den CD8⁺-T-Zellen der Gimap5-defizienten Ratten im Vergleich mit den CD8⁺-T-Zellen der Kontroll-Ratten exprimiert.

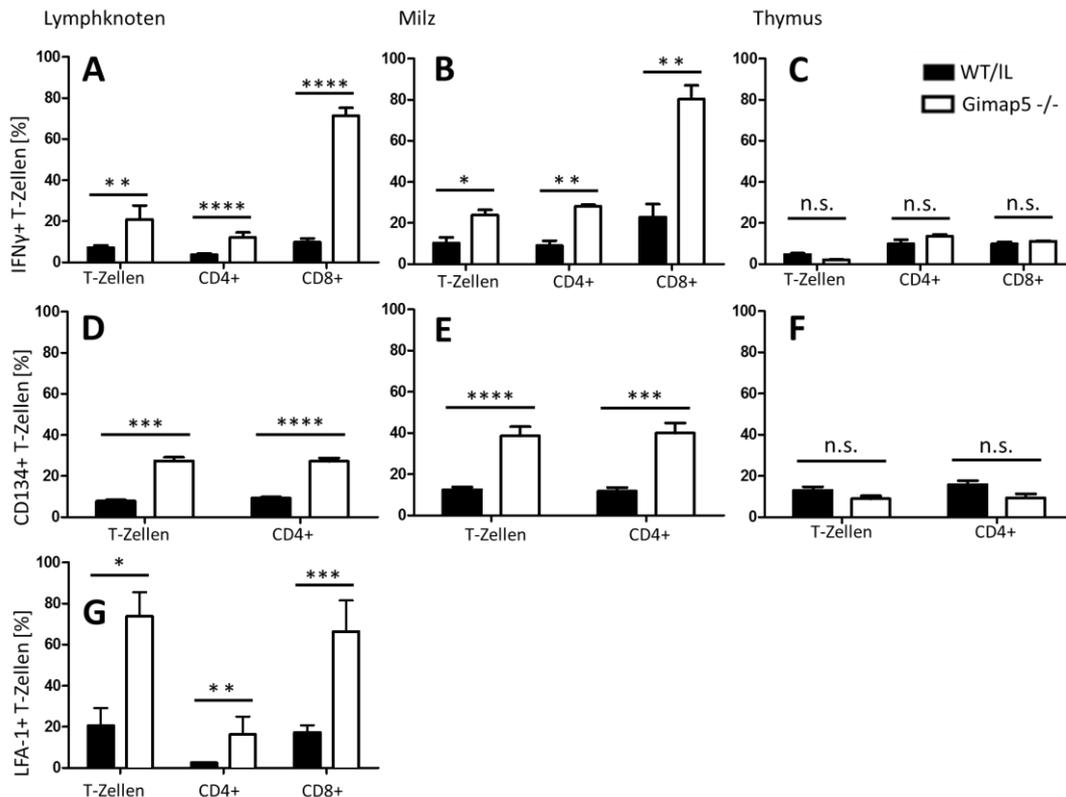


Abbildung 9: Gimap5-defiziente T-Lymphozyten weisen in den peripheren lymphatischen Organen einen aktivierten Phänotyp auf.

Lymphozyten aus Lymphknoten (A, D, G), Milz (B, E) und Thymus (C, F) wurden von Kontrolltieren (WT/IL) und Gimap5^{-/-} Ratten isoliert. Die Zellen wurden mit Antikörpern gegen IFN γ (intrazellulär) sowie CD134 und LFA1 (extrazellulär) gefärbt. Anschließend wurde die Expression mittels Durchflusszytometrie gemessen. Die Messdaten sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt; als statistische Analyse wurde der ungepaarte t-Test angewandt (****: $p < 0,0001$, ***: $p < 0,001$, **: $p < 0,01$, *: $p < 0,05$, n.s.: nicht signifikant). Für die genaue Aufschlüsselung der Fallzahlen siehe Tabelle A2 im Anhang.

Die Ergebnisse bestätigen die Hypothese, dass sich die Folgen der Gimap5-Defizienz in T-Zellen erst nach Verlassen des Thymus phänotypisch ausprägen.

3.3 Phänotypische Auswirkungen einer Gimap5-Defizienz auf den Magen-Darm-Trakt

3.3.1 Gimap5-defiziente Ratten entwickeln spontan massiven Durchfall und morphologische Störungen im Gastrointestinaltrakt

Die Gimap5-defizienten Ratten litten spontan unter starken Durchfällen. Um die Ursache und Pathogenese der Durchfälle zu untersuchen, wurden Magen, Dünndarm und Dickdarm der Gimap5-defizienten Ratten makroskopisch sowie histologisch mit denen der Wildtypen verglichen.

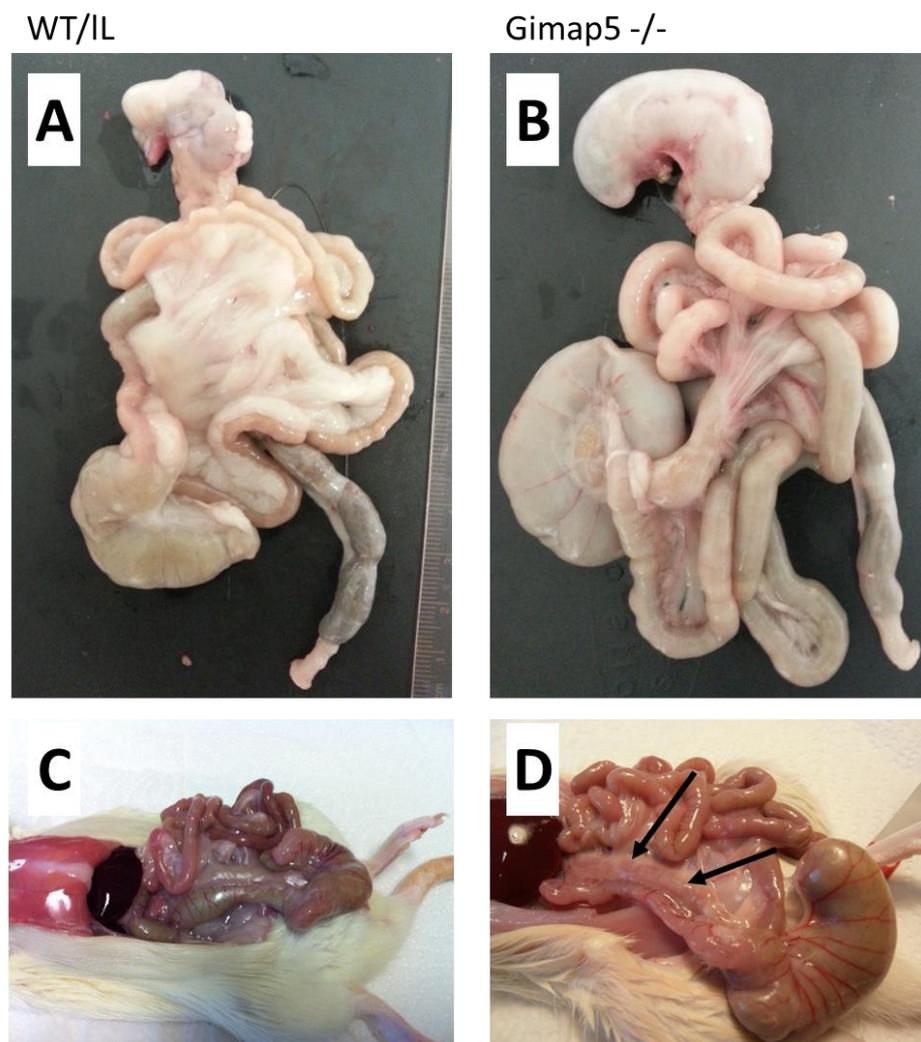


Abbildung 10: Gimap5-defiziente Ratten entwickeln spontan eine Gastroenteritis. Morphologie des Gastrointestinaltrakts und der mesenterialen Lymphknoten von wildtypischen (WT/IL) Kontrollratten (A, C) und Gimap5-defizienten (Gimap5 -/-) Ratten (B, D). Die Gimap5-defizienten Ratten hatten einen geschwollenen Darm (B) und vergrößerte mesenteriale Lymphknoten (D, die Lymphknoten sind mit Pfeilen markiert). Ein repräsentatives Beispiel jedes Genotyps ist gezeigt.

Abbildung 10 zeigt den makroskopischen Vergleich von nach Tötung der Ratten entnommener Därme. Hierbei fielen die Organe der *Gimap5*-defizienten Ratten durch einen geschwollenen Dün- und Dickdarm auf. Die mesenterialen Lymphknoten der *Gimap5*-defizienten Tiere waren vergrößert.

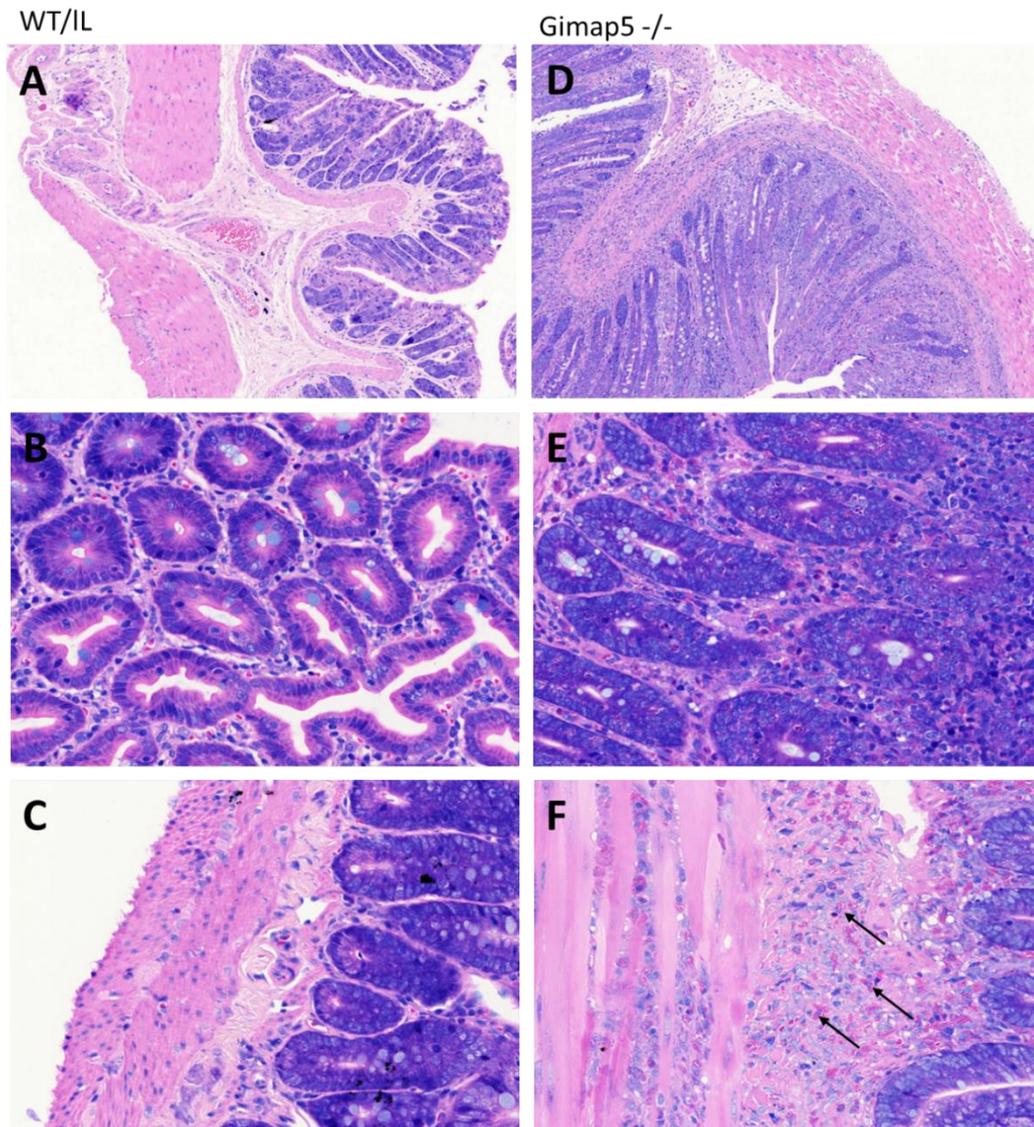


Abbildung 11: Die Darmwand *Gimap5*-defizienter Tiere zeigt histologisch eine massive Infiltration eosinophiler Granulozyten.

Repräsentative Beispiele histologischer Schnitte aus der Darmwand von wildtypischen (*WT/IL*) Ratten (A-C) und *Gimap5*-defizienten (*Gimap5* *-/-*) Tieren (D-F) nach Giemsa-Färbung. A/D: Colon, 10x vergrößert, B/E: Mukosa des Caecums, 40x vergrößert, C/F: Submukosa und Muskularis des Jejunums, 40x vergrößert.

Die Organe des Magen-Darm-Trakts wurde aus zuvor mit CO₂ euthanasierten Ratten entnommen, mit PBS gespült und in 4 % PFA fixiert.

Abbildung 11 zeigt repräsentative Beispiele der Histologie unterschiedlicher Darmschichten. Alle in dieser Arbeit gezeigten histologischen Färbungen der von Gimap5-defizienten Tieren und Kontrollratten entnommenen Dünn- und Dickdarm-Biopsien wurden am Deutsches Krebsforschungszentrum Heidelberg in der Abteilung von Prof. Dr. Hermann-Josef Gröne angefertigt. Bilder A und D zeigen eine Übersicht der Darmwand des Colons mit ihren drei Schichten Mukosa, Submukosa und Muskularis, Bilder B und E zeigen die Mukosa des Caecums mit quer angeschnittenem Zottenepithel und dem umgebenden Bindegewebe der Lamina propria mucosae, Bilder C und F zeigen Teile der Submukosa und der Muskularis aus der Wand des Jejunums. In der Auswertung fiel auf den histologischen Schnitten der Gimap5-defizienten Ratten eine massive Infiltration eosinophiler Granulozyten auf (beispielhafte Kennzeichnung durch Pfeile in F). Diese fanden sich in allen Darmschichten und führten im Epithel zu einer Störung der Zottenstruktur (E).

3.3.2 Eine Gimap5-Defizienz in Lewis-Ratten führt zu erhöhten Serum-Antikörper-Titern von IgE, aber nicht IgG

In den histologischen Präparaten des Darms Gimap5-defizienter Ratten waren massive eosinophile Infiltrate zu sehen. Das Auftreten eosinophiler Granulozyten geht häufig mit erhöhten Serum-Titern von IgE-Antikörpern einher (Coyle et al. 1996). Aus diesem Grund wurde mittels eines ELISA die Konzentration von IgE-Antikörpern im Serum von Gimap5-defizienten Ratten und wildtypischen Kontrolltieren gemessen. Aus Abbildung 12A geht hervor, dass sich die IgE-Serum-Titer der Gimap5-defizienten Tiere signifikant ($p < 0.0001$) von denen in den Kontrollen unterschieden. Weiterhin zeigte sich ein altersabhängiger Anstieg des IgE-Titers bei den Gimap5-defizienten Tieren. Dieser erreichte nach ca. 3 Monaten mit etwa 200 ng/ml seinen Höhepunkt und blieb dann weitgehend konstant. Dagegen war die IgE-Serum-Konzentration in den Kontrolltieren altersunabhängig annähernd konstant niedrig bei etwa 5 ng/ml. Um zu überprüfen, ob neben der Erhöhung des Serum-IgE-Spiegels auch die Menge anderer Immunglobuline in den Gimap5-defizienten Tieren verändert war, testeten wir mittels ELISA die Konzentrationen von IgG-Antikörpern im Serum. Wie in Abbildung 12D dargestellt, zeigte sich in beiden Genotypen ein mit dem Alter der Ratten ansteigendes IgG-

Niveau im Serum. Dabei unterschieden sich die Konzentrationen aber nicht signifikant zwischen Gimap5-defizienten Ratten und Wildtyp-Kontrollen (Abbildung 12C).

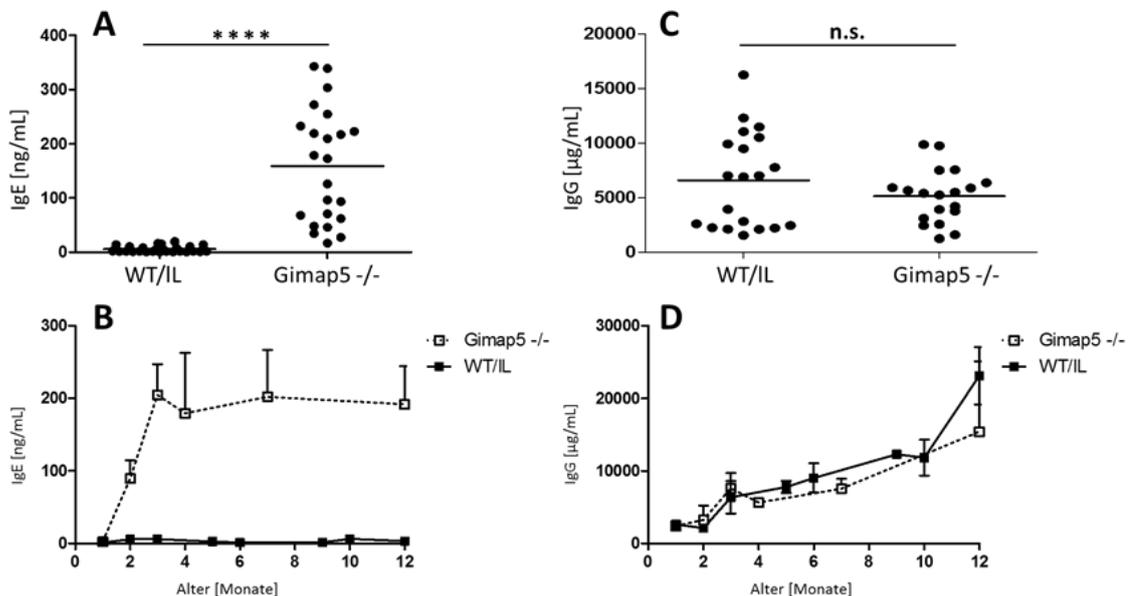


Abbildung 12: Gimap5-defiziente Ratten weisen altersabhängig erhöhte IgE-, aber nicht IgG-Antikörper-Titer im Serum auf.

Blut wurde aus der Schwanzspitze oder nach Euthanasie kardial von wildtypischen (WT/IL) oder Gimap5-defizienten (Gimap5^{-/-}) Ratten abgenommen und das Serum gewonnen. Die Antikörper-Titer von IgE und IgG wurden mittels ELISA bestimmt. A und C zeigen die zusammengefassten Messwerte aller wildtypischen bzw. Gimap5-defizienten Tiere. B und D zeigen die IgE- und IgG-Serum-Niveaus in Wildtyp und Gimap5-defizienten Ratten zu verschiedenen Zeitpunkten innerhalb der ersten 12 Lebensmonate. Die Messwerte sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt. Als statistische Analyse wurde in allen Auswertungen der ungepaarte t-Test angewandt (****: $p < 0,0001$, n.s.: nicht signifikant). Für die genaue Aufschlüsselung der Fallzahlen siehe Tabelle A3 im Anhang.

3.3.3 Gimap5-defiziente Ratten sind durch ein TH2-Zytokin-Milieu gekennzeichnet

Da die vorangegangenen Experimente in Gimap5-defizienten Ratten einen durch eosinophile Infiltrate charakterisierten Darmphänotyp und erhöhte Serum-IgE-Spiegel gezeigt hatten, analysierten wir im Folgenden die Polarisierung der TH-Zellen zu entweder einem TH1 oder TH2 Phänotyp, die über die Synthese unterschiedlicher Zytokine die Immunantwort modulieren. Dazu untersuchten wir mittels eines CBA die Überstände von mit den Antikörpern R73 (anti-TCR β) und JJ319 (anti-CD28) costimulierten CD4⁺-T-Zellen nach 24 h (d1) und 48 h (d2).

Unser Fokus lag auf den für TH2-Zellen typischen Zytokinen IL-10 und IL-4, sowie auf den für TH1-Zellen typischen Zytokinen IFN γ und TNF α .

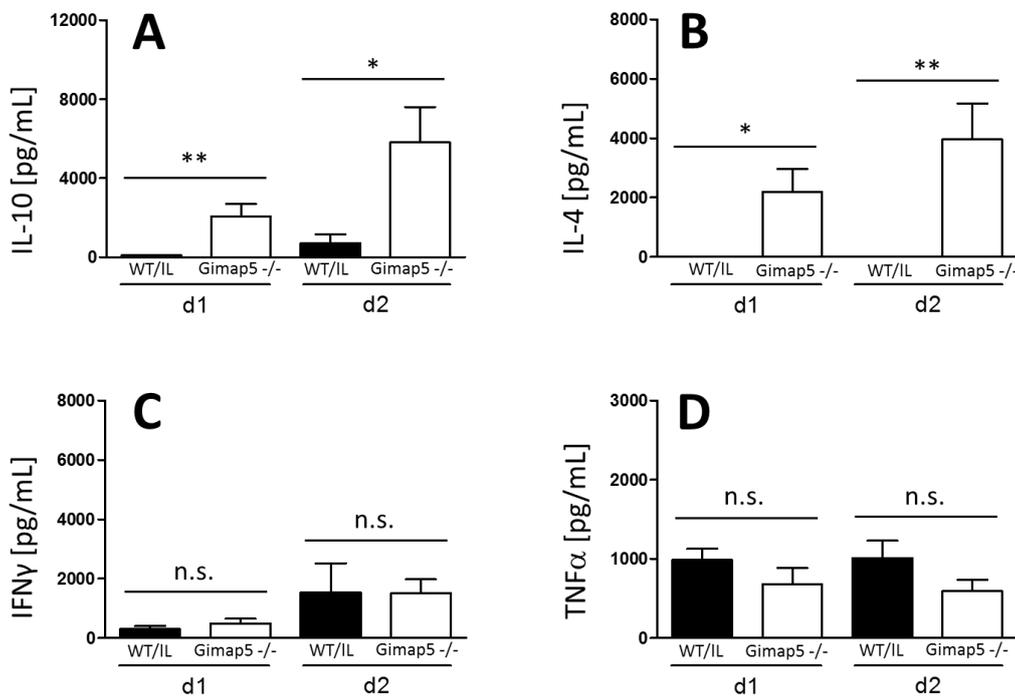


Abbildung 25: *In vitro* costimulierte Gimap5-defiziente CD4⁺-T-Zellen weisen eine TH2-Polarisation auf.

Aus Lymphknoten von jeweils 9-10 wildtypischen (WT/IL) und Gimap5-defizienten (Gimap5^{-/-}) Ratten isolierte CD4⁺-T-Zellen wurden über 24 h (d1) und 48 h (d2) costimuliert. Die Konzentration von IL-10, IL-4, IFN γ und TNF α in den Überständen wurde mittels CBA gemessen. Die Messdaten sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt; als statistische Analyse wurde der ungepaarte t-Test angewandt (**: $p < 0,01$, *: $p < 0,05$, n.s.: nicht signifikant).

Abbildung 13 ist zu entnehmen, dass die Überstände der Gimap5-defizienten CD4⁺-T-Zellen nach Costimulation sowohl an Tag 1 als auch Tag 2 signifikant höhere Konzentrationen an IL-10 (A) und IL-4 (B) enthielten als die der Kontrollzellen. Die Konzentrationen von IFN γ (C) und TNF α (D) in den Überständen unterschieden sich dagegen bei Gimap5-defizienten CD4⁺-T-Zellen und Kontrollzellen nicht. Die erhöhten Konzentrationen von IL-4 und IL-10 sprechen deutlich für eine TH2-Polarisation der T-Zellen in den Gimap5-defizienten Tieren. Dies könnte die in den Ratten erhöhte Produktion von IgE-Antikörpern und die Infiltration eosinophiler Granulozyten in die Darmwand erklären und somit maßgeblich an der Entwicklung des Phänotyps der mutanten Ratten beteiligt sein.

3.4 Eine Antibiotikabehandlung mit Enrofloxacin mildert den Darmphänotyp Gimap5-defizienter Ratten

3.4.1 Die Enrofloxacin-Behandlung vermindert die Infiltration von Eosinophilen in die Darmschleimhaut

Um die Rolle der Darmflora bei der Entwicklung des gastrointestinalen Phänotyps Gimap5-defizienter Tiere zu untersuchen, behandelten wir diese vor Manifestation des Phänotyps für 6 Wochen mit dem Antibiotikum Enrofloxacin.

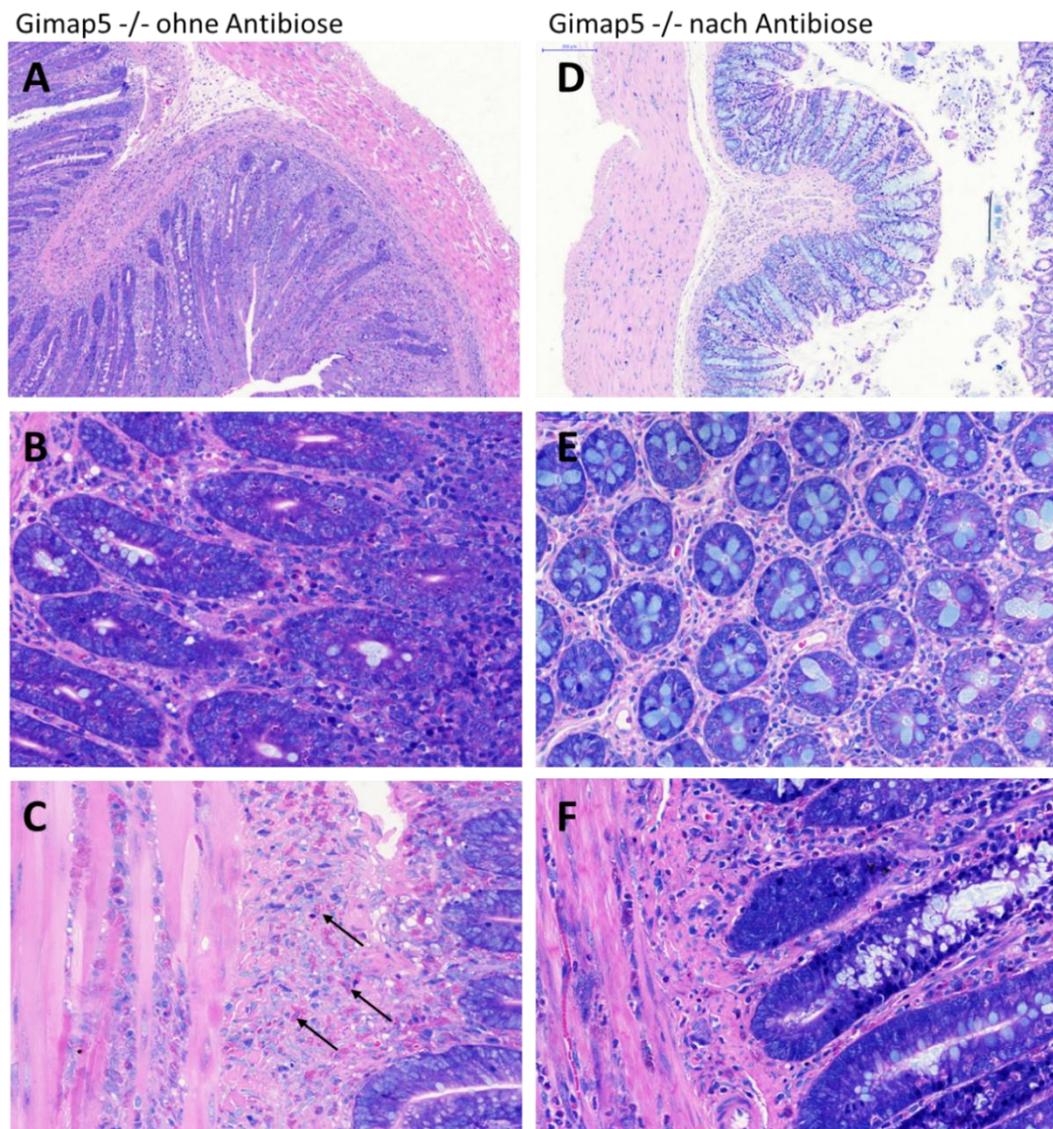


Abbildung 14: Eine Antibiotikabehandlung mildert die Infiltration eosinophiler Granulozyten in die Darmwand Gimap5-defizienter Tiere.

Repräsentative Beispiele histologischer Schnitte der Darmwand Gimap5-defizienter (Gimap5^{-/-}) Tiere vor (A-C) und nach (D-F) sechswöchiger Behandlung mit Enrofloxacin. Gezeigt ist eine Giemsa-Färbung. A/D: Colon, 10x vergrößert, B/E: Mukosa des Caecums, 40x vergrößert, C/F: Submukosa und Muskularis des Jejunums, 40x vergrößert.

In der Folge stellten wir eine gemilderte gastrointestinale Symptomatik fest. Insgesamt wirkten der Dünn- und Dickdarm sowie die mesenterialen Lymphknoten weniger geschwollen. Die histologische Analyse zeigte einen nach Antibiose abgeschwächten Phänotyp der *Gimap5*-defizienten Ratten, bei dem die Eosinophilen zwar alle Wandschichten infiltrierten (Abbildung 14), das Zottenepithel jedoch größtenteils intakt blieb (Abbildung 14B, E). Die Darmsymptomatik wurde durch die Antibiotikabehandlung folglich zwar gemildert, jedoch nicht vollständig normalisiert. Am beobachteten Darmphänotyp scheint somit sowohl die durch die *Gimap5*-Defizienz verursachte Lymphopenie als insbesondere auch die Darmflora maßgeblich beteiligt zu sein. Insgesamt ist von einer autoimmunen Genese der Symptomatik auszugehen, da die Wildtyptiere trotz identischer Tierhaltungsbedingungen keine Symptome zeigten.

3.4.2 Eine Antibiotikabehandlung verhindert den starken Anstieg der IgE-Serum-Titer in *Gimap5*-defizienten Tieren

Um zu überprüfen, ob neben dem Darmphänotyp auch die IgE-Titer durch die sechswöchige Antibiotikabehandlung mit Enrofloxacin beeinflusst werden, wurden die Konzentrationen von IgE im Serum *Gimap5*-defizienter Ratten nach der Antibiose mittels eines ELISA gemessen. Die Testergebnisse wurden mit denen aus gleichaltrigen unbehandelten *Gimap5*-defizienten Ratten verglichen.

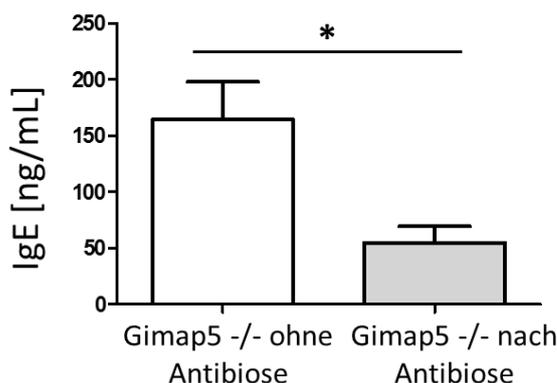


Abbildung 15: Eine Antibiotikabehandlung senkt die IgE-Titer in *Gimap5*-defizienten Tieren.

Der IgE-Serum-Titer wurde bei 9 *Gimap5*-defizienten Ratten ohne Antibiose und bei 5 Tieren nach sechswöchiger Antibiotikabehandlung mit Enrofloxacin im Alter von 8-16 Wochen bestimmt. Die Messwerte sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt. Als statistische Analyse wurde der ungepaarte t-Test angewandt (*: $p < 0,05$).

Aus Abbildung 15 geht hervor, dass sich die IgE-Serumkonzentration der *Gimap5*-defizienten Tiere nach Antibiotika-Therapie signifikant von der nicht mit Antibiotika behandelten Tieren unterschied.

3.5 Der Einfluss der Gimap5-Defizienz auf die EAE

3.5.1 Die Gimap5-Defizienz in Lewis-Ratten führt zu einem schwereren Krankheitsverlauf einer aktiv mit gpMBP induzierten EAE

Am Beispiel der EAE wurde untersucht, welchen Effekt eine Gimap5-Defizienz und die hierdurch verursachte Lymphopenie auf den Verlauf einer ZNS-Autoimmunerkrankung haben. Der in Lewis-Ratten typische monophasische Krankheitsverlauf wurde in den Tieren mittels einer subcutanen Injektion von gpMBP in CFA oberhalb der Hinterpfoten induziert. Anschließend wurden die Tiere täglich gewogen und die Schwere der Erkrankung bzw. der Lähmungserscheinungen anhand eines Punktesystems (Scores) von 0 (keine Lähmungen) bis 10 (tot) klassifiziert. Tiere mit einem Score ≥ 7 wurden aus Tierschutz-rechtlichen Gründen getötet und für die Statistik mit einem Score von 10 weitergeführt. In diesem Ansatz zeigte sich, dass Gimap5-defiziente Ratten einen im Vergleich zu wildtypischen Kontrolltieren schwereren Krankheitsverlauf zeigten (Abbildung 16A).

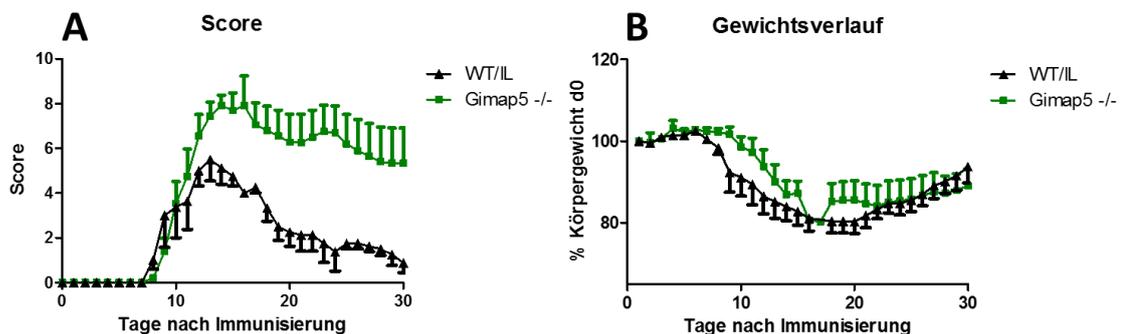


Abbildung 16: Gimap5-defiziente Ratten entwickeln eine schwerere EAE als Kontrolltiere.

In 4 WT/IL und 10 Gimap5^{-/-} Ratten wurde eine EAE mittels Immunisierung mit gpMBP in CFA induziert (d0). Anschließend wurden täglich die klinischen Symptome anhand einer Skala von 0-10 (A) sowie das Körpergewicht der Tiere im Vergleich zu ihrem Ausgangsgewicht (B) bestimmt.

Außerdem erfolgte der Rückgang der Lähmungssymptomatik weniger deutlich. Mit zunehmender EAE-Symptomatik verloren die Tiere beider Gruppen an Gewicht, ein Rückgang der Symptomatik ging wiederum mit einer Gewichtszunahme einher (Abbildung 16B).

3.5.2 Charakterisierung der das Rückenmark infiltrierenden Lymphozyten

Nachdem in den Experimenten zur EAE Unterschiede im Krankheitsverlauf zwischen Gimap5-defizienten Tieren und den Kontrollen beobachtet wurden, untersuchten wir, ob sich dieser Effekt in vermehrten Zahlen der während der EAE das Rückenmark infiltrierenden Lymphozyten widerspiegelte. Dazu wurde am Höhepunkt der EAE von Tieren beiderlei Genotyps das Rückenmark entnommen und die absoluten Zellzahlen der Infiltrate bestimmt (Abbildung 17).

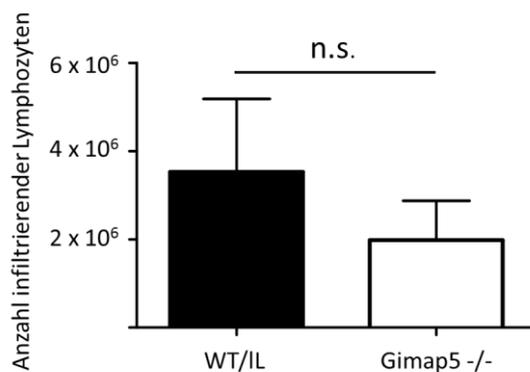


Abbildung 17: Analyse der das Rückenmark am Höhepunkt der EAE infiltrierenden Lymphozyten.

Eine EAE wurde mittels gpMBP in CFA in 3 Kontrollratten (WT/IL) und 3 Gimap5 -/- Ratten induziert. Lymphozyten wurden aus dem Rückenmark am Peak der Erkrankung (Score 7) isoliert und gezählt. Die Messwerte sind als Mittelwerte ± SEM dargestellt; als statistische Analyse wurde der ungepaarte t-Test angewandt (n.s.: nicht signifikant).

Das Ergebnis zeigt, dass sich die Anzahl der das Rückenmark infiltrierenden Lymphozyten nicht signifikant zwischen Gimap5-defizienten Tieren und Kontrollratten unterschied, obgleich Gimap5-defiziente Tiere eine Lymphopenie aufweisen.

3.6 Der Verlauf der EAE in Gimap5-defizienten Ratten wird durch eine antibiotische Behandlung nicht beeinflusst

In vorherigen Versuchen hatte sich gezeigt, dass die Ausprägung des Darmphänotyps und die Serum-IgE-Titer von der Darmflora abhängig waren und durch eine Antibiotikabehandlung abgeschwächt werden konnten. Um herauszufinden, ob auch die Schwere des EAE-Verlaufs durch die Darmflora beeinflusst wird, induzierten wir die Erkrankung in Gimap5-defizienten Tieren, die zuvor eine sechswöchige Antibiotikabehandlung mit Enrofloxacin erhalten hatten.

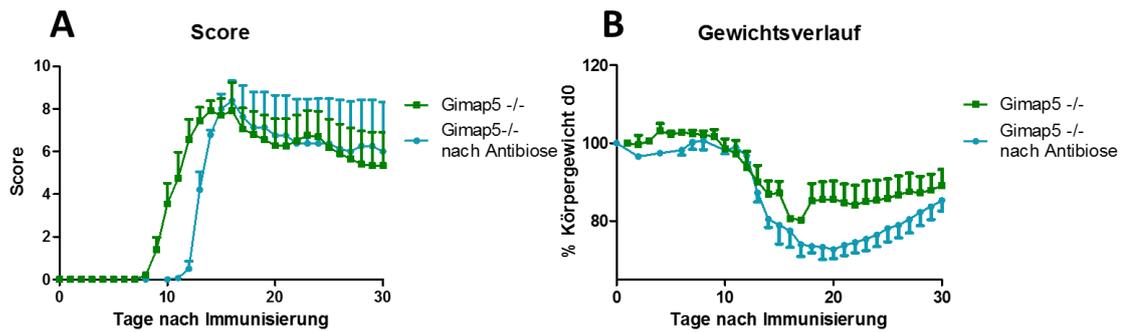


Abbildung 36: Der EAE-Verlauf bei Gimap5-defizienten Ratten wird von einer Antibiotikabehandlung nicht beeinflusst.

Eine EAE wurde in 10 Gimap5^{-/-} Ratten ohne und 7 Gimap5^{-/-} Ratten nach einer sechs-wöchigen Antibiotikabehandlung mit Enrofloxacin mittels Immunisierung mit gpMBP in CFA induziert (d0). Anschließend wurden täglich die klinischen Symptome anhand einer Skala von 0-10 (A) sowie das Körpergewicht der Tiere im Vergleich zu ihrem Ausgangsgewicht (B) bestimmt.

Die Tiere entwickelten nach Antibiose einen ebenso schweren EAE-Verlauf wie ohne Therapie (Abbildung 18). Die Symptome setzten allerdings mit einer dreitägigen Verzögerung ein. Im Vergleich zum Darmphänotyp scheint der EAE-Verlauf jedoch kaum durch die veränderte Darmflora nach antibiotischer Behandlung beeinflusst zu werden.

3.7 Der Transfer von wildtypischen T-Zellen in Gimap5-defiziente Lewis-Ratten mildert den EAE-Verlauf

Nachdem gezeigt worden war, dass eine Gimap5-Defizienz eine Lymphopenie induziert, die eine Verschiebung des TCR-Repertoires und die Aktivierung peripherer T-Zellen auslöst sowie zu einer schwereren EAE führt, wurde im folgenden Experiment untersucht, inwiefern ein Transfer wildtypischer T-Zellen in Gimap5-defizienten Tiere den schwereren EAE-Verlauf möglicherweise auszugleichen vermag. Aus eGFP-transgenen Lewis-Ratten wurden Lymphozyten isoliert, die aufgrund ihrer Fluoreszenzmarkierung eine Identifikation im Empfänger-tier erlauben. 50 mio dieser Lymphozyten wurden in die Schwanzvene Gimap5-defizienter Ratten im Alter von 10 Wochen injiziert. 12 Wochen später wurde der Anteil der Lymphozyten an allen Leukozyten aus dem Blut sowie der Anteil der GFP-positiven wildtypischen Zellen unter allen T-Zellen der Gimap5-defizienten

Ratten mittels Durchflusszytometrie gemessen (Abbildung 19). Wie Abbildung 19A zeigt, führte der T-Zell-Transfer zu einem signifikant höheren Anteil von Lymphozyten an allen Leukozyten des Blutes im Vergleich zu unbehandelten Gimap5-defizienten Tieren und damit zu Minderung der Lymphopenie. Der Anteil GFP⁺-T-Zellen an allen T-Zellen betrug dabei im Mittel $61,4 \pm 2,9$ % (Mittelwert \pm SEM) (B).

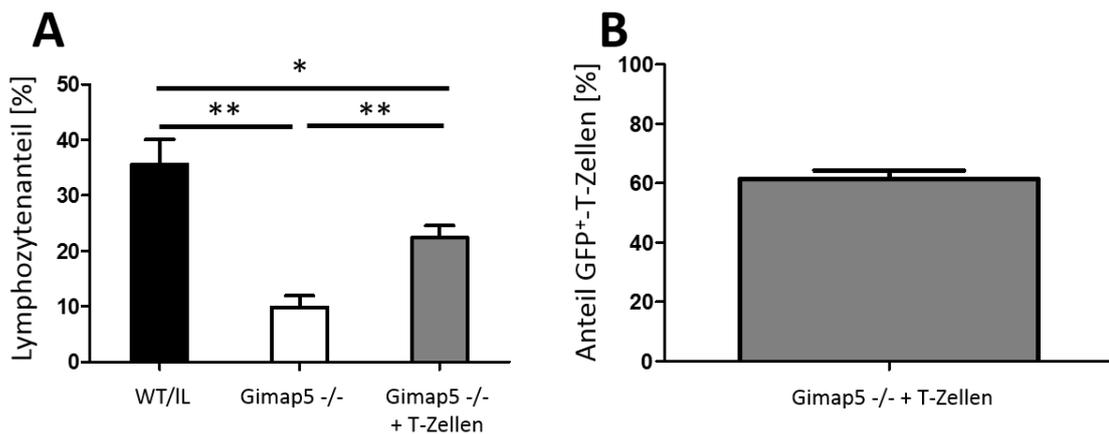


Abbildung 19: Ein adoptiver Transfer von GFP⁺-wildtypischen T-Zellen in Gimap5-defiziente Ratten reduziert die Lymphopenie.

12 Wochen nach Injektion von 5×10^7 aus den Lymphknoten wildtypischer eGFP-transgener Lewis-Ratten isolierter T-Zellen in die Schwanzvene von Gimap5^{-/-} Ratten wurde deren Blut auf den Erfolg des Transfers hin untersucht. Hierzu wurden die T-Zellen mittels Durchflusszytometrie gemessen. Zuerst wurden die Lymphozyten nach Granularität (SSC) und Größe (FSC) eingegrenzt. Anschließend wurden die T-Zellen mittels Histogramm für die Expression des TCR β ausgewählt und unter ihnen der Anteil GFP⁺-Zellen bestimmt. (A) Anteile von Lymphozyten an den Leukozyten im Blut der Gimap5-defizienten Tiere vor und nach Transfer sowie die der Wildtyp-Kontrollen. (B) Anteil der GFP⁺-Zellen unter allen T-Zellen in Gimap5-defizienten Ratten nach Transfer. Die Messdaten sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt; als statistische Analyse wurde der ungepaarte t-Test angewandt (**: $p < 0,01$, *: $p < 0,05$).

Die EAE wurde in Tieren der drei experimentellen Gruppen durch Immunisierung mit gpMBP in CFA induziert: Gimap5-defiziente Ratten mit und ohne T-Zell-Transfer und wildtypische Kontrolltiere zum Vergleich. Anschließend wurden die Tiere täglich gewogen und die Schwere des Schubes anhand einer Skala (0-10) bestimmt.

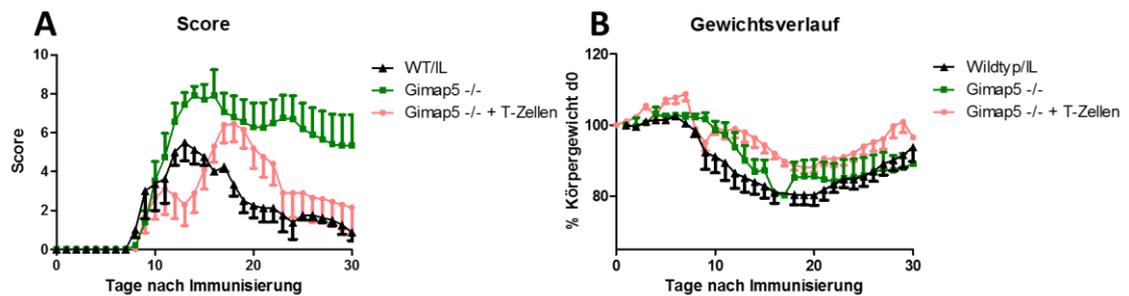


Abbildung 20: Ein T-Zell-Transfer in Gimap5-defiziente Ratten führt zu einem milderen EAE-Verlauf.

Eine EAE wurde in 4 WT/IL, 10 Gimap5 -/- Ratten sowie 10 Gimap5 -/- Ratten nach T-Zell-Transfer durch Immunisierung mit gpMBP in CFA induziert (d0). Anschließend wurden täglich die klinischen Symptome anhand einer Skala von 0-10 (A) sowie das Körpergewicht der Tiere im Vergleich zu ihrem Ausgangsgewicht (B) bestimmt.

Aus Abbildung 20 ist zu entnehmen, dass die Krankheit nach T-Zell-Transfer in Gimap5-defiziente Tiere deutlich milder verlief als ohne, auch wenn das vergleichsweise niedrige Niveau der klinischen Symptome in den wildtypischen Kontrollen nicht erreicht wurde. Die in den transferierten Tieren schwächer ausgeprägte T-Zell-Lymphopenie, verglichen mit Gimap5-defizienten Tieren ohne Transfer, scheint somit die Krankheitssymptome zu lindern.

4 Diskussion

Die MS ist die häufigste entzündliche Erkrankung des ZNS bei jungen Erwachsenen. Sie verläuft chronisch und führt in betroffenen Patienten teilweise zu starken körperlichen oder kognitiven Behinderungen (Dendrou et al. 2015; Masuhr et al. 2013). Trotz intensiver Forschung ist die Ätiologie und Pathogenese der Erkrankung noch nicht vollständig verstanden. Die Entdeckung wichtiger Eckpunkte in der Entstehung der MS, wie beispielsweise die Rolle autoreaktiver T-Zellen, führte in jüngster Vergangenheit zu der Entwicklung neuer Therapiemöglichkeiten. Bislang kann mit der Therapie zwar die Häufigkeit erneuter MS-Schübe reduziert werden, allerdings kommt es langfristig meist zu einem Übergang in den chronisch progredienten Krankheitsverlauf (Dendrou et al. 2015). Um die Therapie an MS Patienten zu verbessern, ist die Erforschung von Tiermodellen für die MS, beispielsweise der EAE, essenziell. In dieser Arbeit induzierten wir eine EAE in Lewis-Ratten mittels gpMBP in einer Emulsion mit CFA und provozierten damit einen monophasischen EAE-Verlauf (Fletcher et al. 2010; Stromnes und Goverman 2006a). Der Einfluss einer Lymphopenie auf den Krankheitsverlauf ist von besonderem Interesse, weil sie mit der Entwicklung von Autoimmunität assoziiert ist (Zheng et al. 2013). Die *loss-of-function*-Mutation im *lyp*-Gen führte in DP-BB-Ratten zu einer Lymphopenie und zur Entwicklung eines spontanen Diabetes mellitus (Moralejo et al. 2011; Ramanathan und Poussier 2001). Auf einem anderen genetischen Hintergrund, den PVG-Ratten, führte die gleiche Mutation ebenfalls zu einer Lymphopenie, hier jedoch mit einer ausgeprägten Darmsymptomatik (Cousins et al. 2006). Durch die Verwendung Gimap5-defizienter Lewis-Ratten konnten wir den Effekt eines Gimap5 Funktionsverlusts auf einem bisher unerforschten genetischen Hintergrund sowie dessen Einfluss auf den EAE-Verlauf in Lewis-Ratten untersuchen. Verschiedene Studien belegen zusätzlich eine Rolle der Darmflora in der Entwicklung und Polarisation des adaptiven Immunsystems. So konnte gezeigt werden, dass zu den Risiken autoimmuner entzündlicher Darmerkrankungen neben genetischen Ursachen auch Veränderungen in der Darmflora zählen (Collins et al. 2012; Maranduba et al. 2015). Durch eine Antibiose mit Enrofloxacin konnten wir mögliche Veränderungen der T-Zellen und des EAE-Verlaufs als Reaktion auf eine veränderte Darmbesiedelung untersuchen.

4.1 Die Auswirkungen einer Gimap5-Defizienz auf den Immunstatus

Die GTPase Gimap5 ist ein anti-apoptotisches Protein, das überwiegend in Lymphozyten nach deren Stimulation über den TCR aktiviert wird. Sie unterstützt die Aktivierung und Proliferation der T-Zellen, indem sie ihr Überleben fördert. Eine Punktmutation in dem für Gimap5 kodierenden *lyp*-Gen verursacht eine Leserasterverschiebung, die durch die Entstehung eines verfrühten Stopcodons zu einem verkürzten Protein führt (MacMurray et al. 2002; Moralejo et al. 2011; Nitta und Takahama 2007). In verschiedenen Experimenten wurde eine erhöhte Apoptoseneigung der T-Zellen beobachtet, die zu einer Lymphopenie führt und mit einer Enthemmung des Apoptosesignalwegs durch den Gimap5-Verlust assoziiert ist (Nitta und Takahama 2007). Reaktiv findet eine homöostatische Lymphopenie-induzierte Proliferation (LiP) einzelner T-Zell-Klone in der Peripherie statt, um die verminderte Lymphozytenzahl auszugleichen (King et al. 2004). Die proliferierenden Zellen reagieren dabei häufig auf körpereigene MHC-Moleküle, weshalb viele Studien die LiP als Ursache einer erhöhten Empfänglichkeit des Organismus für Autoimmunität deklarieren (Kieper et al. 2005; Le Campion et al. 2009; Surh und Sprent 2000). Zusätzlich exprimieren T-Zellen in lymphopener Umgebung verstärkt Aktivierungsmarker auf ihrer Oberfläche (Lang et al. 2004). Folge der LiP ist außerdem ein verändertes TCR-Spektrum in peripheren lymphatischen Organen, weil einzelne Rezeptoren besser durch vorhandene MHC-Moleküle zur Proliferation angeregt werden als andere (van den Brandt et al. 2010). In unseren Experimenten untersuchten wir die Anteile verschiedener Lymphozyten-Subpopulationen. Die Ergebnisse zeigen, dass der Verlust von Gimap5 in Lewis-Ratten zu einer starken Lymphopenie führt, verbunden mit signifikant reduzierten Anteilen von CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen in den Lymphknoten und im Blut. In der Analyse der Überlebensraten der T-Zellen, die mittels Durchflusszytometrie bei 24 h kultivierten Zellen bestimmt wurden, zeigte sich ein hochsignifikant verkürztes Überleben der Gimap5-defizienten Zellen gegenüber denen des Wildtyps. Zur Erforschung der Proliferation als Kompensation für das verkürzte Überleben der T-Zellen bestimmten wir die Expression der an den Kontrollpunkten des Zellzyklus exprimierten Zykline B und E. In naiven T-Zellen der Gimap5-defizienten Tiere war eine signifikant erhöhte Expression des Zyklin E zu erkennen. Wir deuteten den offensichtlich beschleunigten Zellzyklus als Zeichen einer

stattfindenden LiP und analysierten weitergehend das TCR-Repertoire der T-Zellen, indem wir die Expression unterschiedlicher TCR β -Ketten auf der Zelloberfläche naiver T-Zellen mittels spezifischer Antikörper im Durchflusszytometer bestimmten. Während sich das Spektrum der aus dem Thymus isolierten T-Zellen nicht zwischen den Genotypen unterschied, fanden sich auf den Oberflächen der aus den Lymphknoten isolierten T-Zellen deutliche Unterschiede in fünf der sechs untersuchten TCR β -Ketten. Die T-Zellen scheinen zum Ausgleich der lymphopenen Umgebung in der Peripherie zu expandieren, wobei einige T-Zellklone stärker proliferieren als andere mit der Folge eines veränderten T-Zell-Repertoires. Das normale TCR-Spektrum auf den Thymozyten deutet auf eine intakte T-Zell-Entwicklung und Selektion im Thymus hin. Der Verlust der anti-apoptotischen GTPase scheint jedoch zu bewirken, dass die Gimap5-defizienten Lymphozyten nach Verlassen des Thymus schnell in Apoptose gehen, wie es die verringerten Überlebensraten der naiven Lymphozyten aus peripheren lymphatischen Organen in unseren Experimenten andeuten. Physiologischerweise treffen die meisten T-Zellen in der Peripherie nicht sofort auf ihr spezifisches Antigen. Um in dem Fall einer Infektion mit einem Erreger der dieses Antigen exprimiert den Organismus verteidigen zu können, ist es jedoch essenziell, die T-Zelle am Leben zu halten. Dies geschieht in der Peripherie über Kontakt des TCRs mit körpereigenen MHC-Molekülen. Hat die Bindung die richtige Stärke, löst sie in der Zelle ein Überlebenssignal aus (Goldrath und Bevan 1999b). Da Gimap5 in diesem Signalweg eine Rolle zu spielen scheint, brauchen defiziente Zellen vermutlich einen stärkeren Reiz von körpereigenen Zellen um überleben zu können. Ein stärkeres Signal über den TCR verstärkt aber auch die Expression von Aktivierungsmarkern auf der Zelloberfläche der überlebenden Zellen, die nach Bindung an Zytokine und Rezeptoren das Überlebenssignal wiederum verstärken und die Zellen zur Proliferation anregen. Um diese Hypothese zu überprüfen, analysierten wir die Expression verschiedener Aktivierungsmarker auf bzw. in aus Thymus, Lymphknoten und Milz isolierten Lymphozyten mittels Durchflusszytometrie. Wir wählten die Oberflächenmarker CD134 und LFA-1 sowie das Zytokin IFN γ . Die Ergebnisse zeigen eine signifikant erhöhte Expression aller Aktivierungsmarker bei Gimap5-defizienten T-Zellen und ihren CD4 $^+$ und CD8 $^+$ Sub-

spezies in Lymphknoten und Milz. Auf isolierten Thymozyten fanden sich dagegen keine Unterschiede im Vergleich der Gimap5-defizienten Zellen mit den Wildtypkontrollen.

Insgesamt ließ sich auf zellulärer Ebene ein durch die Gimap5-Defizienz entstandener Phänotyp beobachten. Unsere Ergebnisse der *In-vitro*- und *Ex-vivo*-Experimente zum immunologischen Status der Gimap5-defizienten Lewis-Ratten konnten dabei die oben genannten Thesen aus der aktuellen Literatur unterstützen. Es lag eine T-Zell-Lymphopenie in peripheren lymphatischen Organen vor, die am ehesten auf einer erhöhten Apoptoserate durch Enthemmung des Apoptosesignalwegs nach Gimap5-Verlust beruhte. Die überlebenden T-Zellen hatten dabei eine im Vergleich zu Wildtyp T-Zellen erhöhte Zellzyklus-Rate, ein verändertes TCR β -Spektrum und eine erhöhte Expression von Aktivierungsmarkern. Dies ist vereinbar mit der reaktiv stattfindenden LiP einiger T-Zell-Klone in der Peripherie, mit dem Ziel, die verminderte Lymphozytenzahl auszugleichen.

4.2 Der genetische Hintergrund bestimmt über den Phänotyp der Autoimmunerkrankung

In mehreren Studien wurden verschiedene genetische Hintergründe mit Autoimmunerkrankungen assoziiert. So wurden im Menschen Risikoallele der *HLA-DR* und *HLA-DQ* Gene mit der Entstehung von Diabetes mellitus Typ 1, die Risikoallele *HLA-DRB1*0103* und *HLA-DRB1*1502* dagegen mit der chronisch entzündlichen Darmerkrankung Colitis ulcerosa in Verbindung gebracht (Fernando et al. 2008). Die Struktur der variablen Domäne bestimmt, welche Antigene bevorzugt auf den MHC-Molekülen präsentiert werden und wie stark spezifische T-Zellen stimuliert werden. Ein bestimmter MHC-Haplotyp kann daher den Organismus für eine bestimmte Autoimmunreaktion empfänglicher machen aber gleichzeitig auch vor einer anderen Erkrankung schützen (Fernando et al. 2008; Wucherpfennig und Strominger 1995).

Die unterschiedlichen Phänotypen der Gimap5-defizienten DP-BB- und PVG-Ratten zeigen im Tiermodell, dass die Struktur des zu einer Autoimmunreaktion führenden Selbstantigens durch genetische Faktoren beeinflusst wird. In DP-BB-Ratten mit dem MHC Haplotyp RT1u entsteht nach Gimap5-Verlust ein spontaner autoimmuner Diabetes mellitus Typ 1. PVG-Ratten mit den Haplotypen RT1u

oder RT1c haben dagegen einen der eosinophilen Gastroenteritis ähnelnden Symptomkomplex mit Durchfällen, eine TH2-dominierte Immunreaktion, eine massive eosinophile Infiltration der Darmwand und erhöhtes Serum-IgE (Cousins et al. 2006). Auf dem genetischen Hintergrund der für unsere Experimente verwendeten Lewis Ratte mit dem MHC-Haplotyp RT1I führte eine Gimap5-Defizienz, ähnlich wie in den PVG-Ratten, zu einer Durchfallerkrankung.

Die Gimap5-defizienten Lewis-Ratten entwickelten starken Durchfall, makroskopisch zeigten sich die Därme gebläht, die mesenterialen Lymphknoten waren geschwollen. Die Histologie von Jejunum, Coecum und Colon ließ massive eosinophile Infiltrationen erkennen. Die Eosinophilie war erwartungsgemäß mit einer Erhöhung der IgE-Antikörper-Titer verknüpft, die mit dem Alter der Gimap5-defizienten Tiere kontinuierlich anstiegen. Sie erreichten ihren Höhepunkt in drei Monate alten Ratten und hielten sich anschließend auf einem ähnlich hohen Plateau. Im Vergleich dazu blieben die IgE-Titer der Wildtyp-Ratten konstant niedrig. Es handelte sich hierbei um ein IgE-spezifisches Phänomen, da bei der IgG-Serumkonzentration kein signifikanter Unterschied zwischen Gimap5-defizienten Tieren und Wildtyp-Kontrollen festgestellt werden konnte. In beiden Genotypen zeigte sich ein mit dem Alter stetig steigendes IgG-Niveau. Eosinophilie und IgE-Produktion beruhen typischerweise auf einer TH2-dominierten Immunreaktion. Die von den TH2-Zellen synthetisierten Zytokine IL-4 und IL-13 und das überwiegend durch Makrophagen synthetisierte IL-10 stimulieren die Antigen-spezifische Synthese von IgE sowie das Wachstum von Mastzellen, IL-5 rekrutiert Eosinophile, und IL-4, IL-9 und IL-13 können eine Mukushypersekretion induzieren (Cosmi et al. 2014; Polukort et al. 2016). Häufig werden bei Patienten mit eosinophiler Gastroenteritis zusätzliche auf einem TH2-Milieu basierende Allergien oder Hypersensitivitätsreaktionen beobachtet (Baig et al. 2006). Es war daher von großem Interesse, in welche Richtung die T-Zellen in Gimap5-defizienten Lewis-Ratten differenziert sind. Wir bestimmten dazu die Konzentrationen der typischerweise durch TH1-Zellen synthetisierten Zytokine INF γ und TNF α sowie die der überwiegend im Rahmen von TH2-Antworten produzierten Zytokine IL-4 und IL-10 in Überständen von *in vitro* costimulierten T-Zellen. Die Messungen ergaben signifikante Unterschiede in den Konzentrationen der TH2-typischen Zytokine, während die TH1-Zytokinkonzentrationen dagegen in beiden Genotypen ähnlich hoch waren. Ähnlich wie auf dem genetischen Hintergrund der PVG-Ratten scheint eine

Gimap5-Defizienz in Lewis-Ratten eine TH2 dominierte eosinophile Darmerkrankung zu bewirken.

In mehreren Studien mit DP-BB-Ratten wurden Fehlfunktionen und einer verringerten Anzahl der Tregs wichtige Rollen in der Pathogenese des Diabetes mellitus zugeschrieben (Lundsgaard et al. 2005; Poussier et al. 2005). Van den Brandt und Kollegen (van den Brandt et al. 2010) widerlegten diese Theorie jedoch, indem sie funktionelle Tregs in DP-BB-Ratten nachwiesen. Unsere Ergebnisse sprechen für eine erhaltene Treg-Population auch in den Gimap5-defizienten Lewis-Ratten, da sie keine signifikanten Unterschiede in den Zellzahlen der Tregs zwischen Wildtypen-Kontrollen und den Gimap5-defizienten Tieren zeigen. Weitere Untersuchungen zur Funktionalität dieser Zellpopulation, beispielsweise mittels eines Suppressions-Tests *in vitro*, könnten zur Aufklärung der Treg-Funktionalität in Gimap5-defizienten Lewis-Ratten beitragen.

4.3 Die Gimap5-Defizienz verstärkt den EAE-Verlauf

Lewis-Ratten entwickeln nach EAE-Induktion einen monophasischen Krankheitsverlauf. Nach aktuellem Stand der Literatur ergaben sich aus dem Phänotyp der Gimap5-defizienten Lewis-Ratten zwei gegensätzliche Prognosen für den Verlauf der EAE. Die präaktivierten Lymphozyten als Folge der Lymphopenie als potenzielle Auslöser der EAE standen dabei dem TH2-dominierten entzündungshemmenden Phänotyp als protektivem Faktor gegenüber.

Die Autoimmunerkrankung MS weist Zusammenhänge mit einer Lymphopenie auf (Zheng et al. 2013). In unseren Versuchen könnten die bereits voraktivierten T-Zellen der Mutanten nach Immunisierung mit gpMBP empfänglicher für die Entwicklung einer Immunantwort sein als die Wildtypzellen. In der lymphopenen Umgebung wird physiologischerweise im Rahmen der LiP die Proliferation autoreaktiver T-Zellen begünstigt, um die Zellarmut in peripheren lymphatischen Organen auszugleichen (Goldrath und Bevan 1999a; Marleau und Sarvetnick 2005). Es wäre daher denkbar, dass eine Gimap5-Defizienz eine Verstärkung des EAE-Verlaufs in Lewis-Ratten bewirkt.

Im Gegensatz dazu fanden sich in Gimap5-defizienten Ratten erhöhte Konzentrationen der TH2-typischen Zytokine IL-4 und IL-10, während TH1-typische Me-

diatoren wie $TNF\alpha$ und $IFN\gamma$ nicht verändert waren. Die in der Histologie erkennbaren eosinophilen Infiltrate und die erhöhten Serum-IgE-Titer sprachen ebenfalls für eine TH2-dominierte Umgebung. TH2-Zellen gelten im Kontext TH1-vermittelter Autoimmunreaktionen wie MS und EAE als entzündungshemmend (Abbas et al. 1996). In aktuellen leitliniengerechten Therapien der MS wird daher mit immunmodulatorisch wirkenden Medikamenten wie $IFN\beta$, Glatirameracetat und Dimethylfumarat versucht, die Immunreaktion von einer TH1- in eine TH2-dominierte Richtung zu lenken (Leitlinien Neurologie 2012). Darüber hinaus wurde eine verringerte Krankheitsaktivität der EAE nach Dezimierung $CD8^+$ -T-Zellen in Lewis-Ratten beschrieben, was die starke Lymphopenie der Gimap5-defizienten Tiere insbesondere in der $CD8^+$ T-Zellreihe zu einem weiteren prognostisch mildernden Faktor machen könnte (Camara et al. 2013). Es war daher besonders spannend, EAE in den Gimap5-defizienten Ratten zu induzieren und zu überprüfen, ob sich die krankheitsfördernden Umstände und die schützenden Bedingungen ausgleichen oder eine Richtung Überhand gewinnt.

Nach Immunisierung traten in den Tieren beider Genotypen nach ca. 8-10 Tagen erste Symptome einer EAE auf. Invers zur Ausprägung der Lähmungssymptome verloren die Tiere an Körpergewicht. Die Wildtyp-Tiere zeigten den für Lewis-Ratten typischen monophasischen Krankheitsverlauf und erreichten im Durchschnitt an Tag 13 den Krankheitshöhepunkt (Peak). Bis Tag 25 erholten sie sich von der Erkrankung. Die Gimap5-defizienten Tiere zeigten dagegen eine ausgeprägtere EAE-Symptomatik und erreichten ihren Peak an den Tagen 14-16 mit deutlich schwereren Lähmungserscheinungen. Außerdem war die Erholung von der Erkrankung abgeschwächt und verlangsamt.

Der gravierende Krankheitsverlauf der Gimap5-defizienten Tiere spricht für die Lymphopenie als wichtigen Einflussfaktor auf die Pathogenese der EAE. Die in der Folge präaktivierten Lymphozyten scheinen leichter durch das Antigen und Adjuvans stimulierbar zu sein und leiten somit eine stärkere, jedoch durch die verminderte Anzahl der Lymphozyten zeitlich leicht verzögerte Immunantwort im Hirn und Rückenmark ein. Vor dieser Reaktion scheint die TH2-dominierte Umgebung nicht ausreichend schützen zu können, obwohl ihr eine anti-inflammatorische Wirkung zugesprochen wird. Besonders vor dem Hintergrund der in mehreren Studien mit Klasse-I-Evidenz belegten Wirkung der immunmodulierenden Medikamente in der MS-Therapie (Leitlinien Neurologie 2012) ist die Auswirkung

der Gimap5-Defizienz in unserem Rattenmodell höchst bemerkenswert. Trotz des TH2-Phänotyps ist die Neigung der Gimap5-defizienten Tiere zur Autoimmunität hoch.

4.4 Die Darmflora beeinflusst die Entwicklung einer eosinophilen Gastroenteritis, jedoch nicht die der EAE

Nicht jeder Organismus eines Risiko-HLA-Haplotyps entwickelt zwingend eine Autoimmunerkrankung. Es handelt sich vielmehr um einen multimodalen Prozess, in dem viele extrinsische (z.B. Diät und Rauchen) und intrinsische Faktoren (z.B. genetischer Hintergrund) eine Rolle spielen (Danese et al. 2004; Dendrou et al. 2015). Ein wichtiger Einflussfaktor scheint die Darmbesiedelung zu sein. So konnte bei Patienten mit entzündlichen Darmerkrankungen und rheumatoider Arthritis häufig eine im Vergleich zu gesunden Probanden alterierte Darmflora festgestellt werden (Collins et al. 2012; Maranduba et al. 2015). Über das darm-spezifische Immunsystem interagieren Inhalte des Darmlumens mit verschiedenen Immunzellen. Das GALT muss gleichzeitig Toleranz gegenüber Nahrungsbestandteilen und Kommensalen sowie Immunreaktionen zur Elimination potenziell pathogener Keime vermitteln. Zum GALT gehörende DCs können durch die Produktion unterschiedlicher Zytokine entzündliche zelluläre (TH1/TH17) und humorale (TH2), aber auch regulatorische T-Zellantworten induzieren und damit entweder Toleranz gegenüber einem Antigen (z.B. Nahrungsbestandteile oder Kommensalen) oder eine auf das Antigen abgestimmte Immunreaktion zu dessen Elimination erwirken. Das im Darm generierte Zytokinmilieu kann durchaus systemischen Einfluss haben und so beispielsweise Immunreaktionen in anderen Organen in entweder eine TH1- oder TH2-dominierte Richtung lenken (Brucklacher-Waldert et al. 2014; Cording et al. 2013; Maranduba et al. 2015). Eine besondere Bedeutung könnte dieser Mechanismus in der Entwicklung TH1-dominanter Autoimmunerkrankungen wie der MS oder entzündlichen Darmerkrankungen, aber auch in der Entstehung TH2-dominanter Hypersensibilitätsreaktionen haben. In der aktuellen Forschung zur Therapie verschiedener Autoimmunerkrankungen wird die Wichtigkeit der Darmflora im Aufrechterhalten der gesamt-heitlichen immunbiologischen Balance aufgegriffen. Eine potenzielle neue Therapieform besteht in der Stuhltransplantation, einer Behandlungsmethode, in der Stuhl eines gesunden Spenders in den Darm eines Empfängers transferiert wird

(Choi und Cho 2016). Die Bakterien im Stuhl des Spenders sollen die gestörte Darmflora des Empfängers ersetzen und durch Wechselwirkungen mit dem GALT für einen entzündungshemmenden Effekt auf das Immunsystem sorgen (Borody et al. 2013; Choi und Cho 2016; Maranduba et al. 2015).

Da die von uns für die Tierexperimente genutzten Gimap5-defizienten Lewis-Ratten sowohl spontan eine TH2 dominierte eosinophile Darmerkrankung entwickelten als auch zusätzlich empfänglich für die extrinsische Induktion der EAE waren, bot sich uns die besondere Möglichkeit, den Einfluss der Darmflora auf zwei verschiedene Krankheitsbilder in demselben Tier zu erforschen. Um die Darmflora der Gimap5-defizienten Tiere aus ihrem Gleichgewicht zu bringen, behandelten wir sie 6 Wochen lang mit dem Antibiotikum Enrofloxacin.

Nach der Behandlung verfestigte sich der Stuhl der Ratten. Makroskopisch erschien der Darm weniger geschwollen. Histologisch waren zwar weiterhin eosinophile Infiltrate erkennbar, mit der stärksten Infiltration im Jejunum, jedoch mit einer insgesamt geringeren Intensität. Diese Ergebnisse sind mit den Serumkonzentrationen der IgE-Antikörper vereinbar. Die Gimap5-defizienten Ratten wiesen nach antibiotischer Behandlung erniedrigte IgE-Titer im Vergleich zu gleichaltrigen Tieren ohne Behandlung auf.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Darmflora in Gimap5-defizienten Tieren einen Einfluss auf die Stärke der Darmsymptomatik hat. Die Entwicklung der Gastroenteritis konnte durch Antibiotikagabe zwar nicht verhindert, jedoch deutlich gemildert werden. Weiterführende Experimente die nach Abschluss dieser Arbeit durchgeführt wurden, dienen der Charakterisierung der Darmbakterien vor und nach Antibiotikabehandlung mittels next generation Sequenzierung einzelner Bakterien-Spezies. Außerdem wäre es interessant zu untersuchen, wie Gimap5-defiziente Ratten auf eine Stuhltransplantation von wildtypischen Spender-Ratten reagieren würden.

Im Gegensatz zur eosinophilen Gastroenteritis veränderte sich der EAE-Verlauf der Gimap5-defizienten Tiere nach Antibiose nicht signifikant. Es konnte lediglich eine Tendenz zu einem verzögerten Krankheitsbeginn nach Behandlung mit Enrofloxacin beobachtet werden. Obwohl eine Assoziation der MS mit einer veränderten Darmflora diskutiert wird (Bhargava und Mowry 2014; Mielcarz und Kas-

per 2015) konnten wir diese Assoziation in dem Tiermodell der EAE nicht nachvollziehen. Ein Grund dafür könnten Unterschiede im Mikrobiom zwischen Ratten und Menschen sein. Eine andere Ursache für den unveränderten EAE-Verlauf könnte sein, dass durch Enrofloxacin die Darmflora in ihrer Zusammensetzung nicht ausreichend verändert wurde, um einen systemischen Einfluss auf die Pathogenese von induzierter Autoimmunität im ZNS zu nehmen. In weiterführenden Experimenten sollte man daher die Dosis des Antibiotikums variieren oder den Einfluss anderer Antibiotika testen. Außerdem kämen auch hier Experimente zu Stuhltransplantationen und Typisierungen der Darmflora in Betracht.

Überlegungen, warum die autoimmune Darmerkrankung durch antibiotische Behandlung der Gimap5-defizienten Tiere rückläufig war, der EAE-Verlauf dagegen unbeeinflusst blieb, führen zu einem Vergleich der zugrundeliegenden Immunmechanismen in Darm und ZNS. Im Darm werden die Zellen des Immunsystems ständig Antigenen aus Darmflora und Nahrungsbestandteilen ausgesetzt. Die T-Zell-Homöostase ist hier besonders wichtig, um einerseits potenziell pathogene Keime zu bekämpfen und andererseits die Toleranz des Organismus gegenüber Kommensalen zu wahren. Das ZNS ist dagegen ein immunprivilegiertes Organ, das durch die Blut-Hirn-Schranke vor einer Lymphozyteninvasion geschützt wird. Nichtsdestoweniger finden sich in gesunden Tieren und Menschen autoreaktive Zellen gegen Myelinbestandteile in der Blutbahn (Hellings et al. 2001).

Eine Gimap5-Defizienz führt zu einer Lymphopenie und zur LiP, die das Risiko zur Proliferation autoreaktiver Zellen erhöht. Besonders im Darm könnte dieses Risiko deutlich erhöht sein, weil die T-Zellen durch den Kontakt mit Fremdantigenen bereits für eine Aktivierung durch Selbstantigene aus der unmittelbaren Umgebung der Darmschleimhaut empfänglicher gemacht werden könnten. Eine durch die Behandlung mit Antibiotika reduzierte Darmflora könnte dieser Empfänglichkeit daher entgegenwirken. Auf die Empfänglichkeit für eine EAE scheinen die Schwere der Gastroenteritis und die durch Antibiotika veränderte Darmflora dagegen keinen Einfluss zu haben. Allerdings geht aus der aktuellen Literatur hervor, dass die Symptome einer EAE in Mäusen mit stark verminderter Darmflora abgeschwächt sind (Lee et al. 2011; Ochoa-Repáraz et al. 2009). Außerdem wird eine Assoziation zwischen alterierter Darmflora und der MS diskutiert (Bhargava und Mowry 2014; Mielcarz und Kasper 2015). Unsere Ergebnisse sprechen insgesamt für einen stärkeren Einfluss der Lymphopenie und der im

Zuge der LiP präaktivierten T-Zellen auf die Schwere des EAE-Verlaufs, als der Einfluss der Darmflora.

4.5 Ein T-Zell-Transfer lindert den Verlauf der EAE

T-Zellen Gimap5-defizienter Tiere gehen nach Verlassen des Thymus schnell in Apoptose. Die daraus resultierende Lymphopenie scheint über homöostatische Proliferation die Generierung autoreaktiver Zellen zu fördern und die Tiere empfänglicher für die Entstehung von Autoimmunität zu machen. Wir wollten deshalb in unseren Experimenten untersuchen, ob die Neigung zur Autoreaktivität durch den Transfer von T-Zellen aus gesunden Wildtyp-Ratten in die Mutanten verändert werden kann.

Der adoptive Transfer von T-Zellen wurde bereits in vielen Bereichen der Tumorthherapie als mögliche Therapieform untersucht. Transferierte Zellen sollen sich dabei speziell gegen die Tumorzellen wenden oder durch Zytokinproduktion das Immunsystem aktivieren (Feuerer et al. 2001; Rosenberg et al. 2008). In einer Studie induzierte beispielsweise der adoptive Transfer reaktiver Gedächtnis-T-Zellen gegen tumorspezifische Antigene aus dem Knochenmark von Brustkrebs-Patienten eine Tumorrogression in einem autologen NOD/Scid Mausmodell (Feuerer et al. 2001).

Auch auf die Verläufe von Autoimmunprozessen konnten bei einem adoptiven T-Zell-Transfer positive Einflüsse nachgewiesen werden. In Tierversuchen wurde gezeigt, dass ein Transfer gesunder Tregs in DP-BB-Ratten die Entwicklung eines spontanen Diabetes mellitus verhindern konnte (Poussier et al. 2005). In einem transgenen Mausmodell schützte der adoptive Transfer von CD4⁺-T-Zellen vor der Entwicklung einer EAE (van de Keere und Tonegawa 1998).

In unseren Versuchen wurden T-Zellen aus eGFP-transgenen Lewis-Ratten in die Gimap5-defizienten Tiere transferiert, was eine Minderung der Lymphopenie bewirkte. Die im Anschluss in den Transfer-Tieren induzierte EAE hatte einen milderen Verlauf und erreichte den Krankheitshöhepunkt verspätet. Außerdem erholten sich die Tiere schneller. Ungeachtet des beobachteten positiven Effektes konnte durch den T-Zell-Transfer jedoch keine vollständige Normalisierung der EAE auf das Niveau von Wildtyp-Ratten erreicht werden.

Die Ergebnisse aus den Experimenten zum T-Zell-Transfer in den Gimap5-defizienten Lewis-Ratten stützen die Theorie, dass die Lymphopenie und die in Folge präaktivierten Lymphozyten mit einem veränderten TCR-Repertoire einen entscheidenden Einfluss auf den Verlauf der EAE haben. Durch den Transfer naiver T-Zellen aus eGFP-transgenen Lewis-Ratten konnte die Lymphopenie gemildert werden. Der gemilderte EAE-Verlauf spricht dafür, dass die Spenderlymphozyten zu einer Wiederherstellung der T-Zell-Homöostase beitragen. Dadurch werden zum einen die LiP als Quelle der Proliferation autoreaktiver Zellen eingedämmt und zum anderen der Anteil der potenziell autoreaktiven Gimap5-defizienten T-Zellen vermindert.

5 Zusammenfassung

T-Zell-Lymphopenie ist ein wichtiger Risikofaktor für die Entstehung von Autoimmunität. In dieser Arbeit untersuchten wir daher die Auswirkungen einer *loss-of-function*-Mutation im *lyp*-Gen in Lewis-Ratten, welche eine schwere T-Zell-Lymphopenie zur Folge hatte.

Der Verlust der GTPase Gimap5, die dazu beiträgt, Lymphozyten vor Apoptose zu schützen, führte zu einer verkürzten Überlebenszeit naiver T-Zellen. In peripheren lymphatischen Organen konnten wir Zeichen einer durch die Lymphopenie induzierten Proliferation beobachten, die mit einer erhöhten Expression von Aktivierungsmarkern und einem veränderten T-Zell-Repertoire einherging. Spontan entwickelten die Tiere eine autoimmune Durchfallerkrankung mit histologisch sichtbaren eosinophilen Infiltraten in der Darmwand und stark erhöhten IgE-Titern im Serum. Wir identifizierten einen wesentlichen Einfluss der Darmflora auf die entzündliche Darmerkrankung, da wir nach Antibiose der Tiere mit Enrofloxacin eine Abschwächung des Phänotyps nachweisen konnten.

Um den Einfluss der Gimap5-Defizienz auf eine Autoimmunerkrankung des ZNS untersuchen zu können, induzierten wir in den Ratten eine EAE als Tiermodell für die MS. Mutante Ratten zeigten einen schwereren EAE-Verlauf, im Gegensatz zu der primär untersuchten Darmerkrankung linderte eine Antibiotikabehandlung die Symptomatik jedoch nicht. Somit nimmt die Darmflora keinen Einfluss auf die durch den Gimap5-Verlust verschlimmerte Erkrankung. Stattdessen konnten wir die erhöhte Aktivierungsrate naiver T-Zellen im Zuge der LiP als Einflussfaktor für die Anfälligkeit gegenüber einer Autoimmunität im ZNS identifizieren, da der EAE-Verlauf durch die Abschwächung der Lymphopenie mittels des Transfers naiver wildtypischer T-Zellen in Gimap5-defizienten Tieren abgemildert wurde.

Insgesamt konnte im Rahmen der vorliegenden Dissertation die Rolle eines Gimap5-Verlustes auf die Entwicklung verschiedener Autoimmunerkrankungen erarbeitet werden. Die Ergebnisse zeigen einen organspezifisch unterschiedlichen Einfluss von Lymphopenie und der Darmflora auf die Empfänglichkeit für Autoimmunität.

6 Literaturverzeichnis

- Abbas AK, Murphy KM, Sher A (1996): Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* 383, 787–793
- Ali SA, Ahmad M, Lynam J, McLean CS, Entwisle C, Loudon P, Choolun E, McArdle SEB, Li G, Mian S, Rees RC (2004): Anti-tumour therapeutic efficacy of OX40L in murine tumour model. *Vaccine* 22, 3585–3594
- Anderson JR (1955): Iso-immunisation of Rabbits by Means of Freund-McDermott Adjuvants. *Br J Exp Pathol* 36, 137–142
- Annunziato F, Cosmi L, Liotta F, Maggi E, Romagnani S (2012): Defining the human T helper 17 cell phenotype. *Trends Immunol* 33, 505–512
- Attaf M, Huseby E, Sewell AK (2015): $\alpha\beta$ T cell receptors as predictors of health and disease. *Cell Mol Immunol* 12, 391–399
- Baig MA, Qadir A, Rasheed J (2006): A review of eosinophilic gastroenteritis. *J Natl Med Assoc* 98, 1616–1619
- Berthelot J-M, Maugars Y, Hamidou M, Chiffolleau A, Barrier J, Grolleau J-Y, Prost A (1994): Pancytopenia and severe cytopenia induced by low-dose methotrexate. Eight case-reports and a review of one hundred cases from the literature (with twenty-four deaths). *Rev Rhum Engl Ed* 62, 477–486
- Bhargava P, Mowry EM (2014): Gut Microbiome and Multiple Sclerosis. *Curr Neurol Neurosci Rep* 14, 492
- Borody TJ, Paramsothy S, Agrawal G (2013): Fecal Microbiota Transplantation: Indications, Methods, Evidence, and Future Directions. *Curr Gastroenterol Rep* 15, 337
- Brucklacher-Waldert V, Carr EJ, Linterman MA, Veldhoen M (2014): Cellular Plasticity of CD4+ T Cells in the Intestine. *Front Immunol* 5, 488
- Camara M, Beyersdorf N, Fischer HJ, Herold MJ, Ip CW, van den Brandt J, Toyka KV, Taurog JD, Hünig T, Herrmann T (2013): CD8+ T cell help is required for efficient induction of EAE in Lewis rats. *J Neuroimmunol* 260, 17–27
- Cao Y, Goods BA, Raddassi K, Nepom GT, Kwok WW, Love JC, Hafler DA (2015): Functional inflammatory profiles distinguish myelin-reactive T cells from patients with multiple sclerosis. *Sci Transl Med* 7, 287ra74–287ra74
- Chen Z, O’Shea JJ (2008): Th17 cells: a new fate for differentiating helper T cells. *Immunol Res* 41, 87–102
- Choi HH, Cho Y-S (2016): Fecal Microbiota Transplantation: Current Applications, Effectiveness, and Future Perspectives. *Clin Endosc* 49, 257–265
- Collins SM, Surette M, Bercik P (2012): The interplay between the intestinal microbiota and the brain. *Nat Rev Microbiol* 10, 735–742

- Compston A, Coles A (2008): Multiple sclerosis. *Lancet* 372, 1502–1517
- Cording S, Fleissner D, Heimesaat MM, Bereswill S, Loddenkemper C, Uematsu S, Akira S, Hamann A, Huehn J (2013): Commensal microbiota drive proliferation of conventional and Foxp3+ regulatory CD4+ T cells in mesenteric lymph nodes and Peyer's patches. *Eur J Microbiol Immunol* 3, 1–10
- Cosmi L, Liotta F, Maggi E, Romagnani S, Annunziato F (2011): Th17 cells: new players in asthma pathogenesis. *Allergy* 66, 989–998
- Cosmi L, Maggi L, Santarlaschi V, Liotta F, Annunziato F (2014): T helper cells plasticity in inflammation. *Cytometry A* 85, 36–42
- Cousins L, Graham M, Tooze R, Carter C, Miller JR, Powrie FM, Macpherson GG, Butcher GW (2006): Eosinophilic bowel disease controlled by the BB rat-derived lymphopenia/Gimap5 gene. *Gastroenterology* 131, 1475–1485
- Coyle AJ, Wagner K, Bertrand C, Tsuyuki S, Bews J, Heusser C (1996): Central role of immunoglobulin (Ig) E in the induction of lung eosinophil infiltration and T helper 2 cell cytokine production: inhibition by a non-anaphylactogenic anti-IgE antibody. *J Exp Med* 183, 1303–1310
- Danese S, Sans M, Fiocchi C (2004): Inflammatory bowel disease: the role of environmental factors. *Autoimmun Rev* 3, 394–400
- Dendrou CA, Fugger L, Friese MA (2015): Immunopathology of multiple sclerosis. *Nat Rev Immunol* 15, 545–558
- DGN-Leitlinien 2012 für Diagnostik und Therapie in der Neurologie. Thieme, Stuttgart 2012
- Elde NC, Malik HS (2009): The evolutionary conundrum of pathogen mimicry. *Nat Rev Microbiol* 7, 787–797
- Eppinga H, Konstantinov SR, Peppelenbosch MP, Thio HB (2014): The microbiome and psoriatic arthritis. *Curr Rheumatol Rep* 16, 1–8
- Erhardt A, Hinz E, Asta-Werke, Brak-wede, Kloné W, Lämmle G, Farbwerke Höchst AG, Meske C, Piekarski G, Themann H (1965): Erzeugung Von Krankheitszuständen Durch Das Experiment, Infektionen I. *Am J Med Sci* 250, 227
- Feinstein A, Freeman J, Lo AC (2015): Treatment of progressive multiple sclerosis: what works, what does not, and what is needed. *Lancet Neurol* 14, 194–207
- Fernando MMA, Stevens CR, Walsh EC, Jager PLD, Goyette P, Plenge RM, Vyse TJ, Rioux JD (2008): Defining the Role of the MHC in Autoimmunity: A Review and Pooled Analysis. *PLOS Genet* 4, e1000024
- Feuerer M, Beckhove P, Bai L, Solomayer E-F, Bastert G, Diel IJ, Pedain C, Oberniedermayr M, Schirmacher V, Umansky V (2001): Therapy of human tumors in NOD/SCID mice with patient-derived reactivated memory T cells from bone marrow. *Nat Med* 7, 452–458

- Fischer HJ, Witte A-K, Walter L, Gröne H-J, van den Brandt J, Reichardt HM (2016): Distinct roles of T-cell lymphopenia and the microbial flora for gastrointestinal and CNS autoimmunity. *FASEB J* 30, 1724–1732
- Fletcher JM, Lalor SJ, Sweeney CM, Tubridy N, Mills KHG (2010): T cells in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *Clin Exp Immunol* 162, 1–11
- Fouser LA, Wright JF, Dunussi-Joannopoulos K, Collins M (2008): Th17 cytokines and their emerging roles in inflammation and autoimmunity. *Immunol Rev* 226, 87–102
- Freund J, McDermott K (1942): Sensitization to horse serum by means of adjuvants. *Exp Biol Med* 49, 548–553
- Friese MA, Schattling B, Fugger L (2014): Mechanisms of neurodegeneration and axonal dysfunction in multiple sclerosis. *Nat Rev Neurol* 10, 225–238
- Frischer JM, Bramow S, Dal-Bianco A, Lucchinetti CF, Rauschka H, Schmidbauer M, Laursen H, Sorensen PS, Lassmann H (2009): The relation between inflammation and neurodegeneration in multiple sclerosis brains. *Brain* 132, 1175–1189
- Geginat J, Paroni M, Maglie S, Alfen JS, Kastirr I, Gruarin P, De Simone M, Pagani M, Abrignani S (2014): Plasticity of Human CD4 T Cell Subsets. *Front Immunol* 5, 630
- Gispén JG, Alarcon GS, Johnson JJ, Acton RT, Barger BO, Koopman WJ (1987): Toxicity of methotrexate in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 14, 74–79
- Gold R, Linington C, Lassmann H (2006): Understanding pathogenesis and therapy of multiple sclerosis via animal models: 70 years of merits and culprits in experimental autoimmune encephalomyelitis research. *Brain* 129, 1953–1971
- Goldrath AW, Bevan MJ (1999a): Low-Affinity Ligands for the TCR Drive Proliferation of Mature CD8+ T Cells in Lymphopenic Hosts. *Immunity* 11, 183–190
- Goldrath AW, Bevan MJ (1999b): Selecting and maintaining a diverse T-cell repertoire. *Nature* 402, 255–262
- Goldrath AW, Bogatzki LY, Bevan MJ (2000): Naive T cells transiently acquire a memory-like phenotype during homeostasis-driven proliferation. *J Exp Med* 192, 557–564
- Haghikia A, Hohlfeld R, Gold R, Fugger L (2013): Therapies for multiple sclerosis: translational achievements and outstanding needs. *Trends Mol Med* 19, 309–319
- Haider L, Fischer MT, Frischer JM, Bauer J, Höftberger R, Botond G, Esterbauer H, Binder CJ, Witztum JL, Lassmann H (2011): Oxidative damage in multiple sclerosis lesions. *Brain* 134, 1914–1924

- Harkioliaki M, Holmes SL, Svendsen P, Gregersen JW, Jensen LT, McMahon R, Friese MA, van Boxel G, Etzensperger R, Tzartos JS (2009): T Cell-Mediated Autoimmune Disease Due to Low-Affinity Crossreactivity to Common Microbial Peptides. *Immunity* 30, 348–357
- Hauser SL, Oksenberg JR (2006): The Neurobiology of Multiple Sclerosis: Genes, Inflammation, and Neurodegeneration. *Neuron* 52, 61–76
- Hauser SL, Waubant E, Arnold DL, Vollmer T, Antel J, Fox RJ, Bar-Or A, Panzara M, Sarkar N, Agarwal S (2008): B-Cell Depletion with Rituximab in Relapsing–Remitting Multiple Sclerosis. *N Engl J Med* 358, 676–688
- Heinonen MT, Laine A-P, Söderhäll C, Gruziova O, Rautio S, Melén E, Pershagen G, Lähdesmäki HJ, Knip M, Ilonen J (2015): GIMAP GTPase family genes: potential modifiers in autoimmune diabetes, asthma, and allergy. *J Immunol* 194, 5885–5894
- Hellings N, Barée M, Verhoeven C, D’hooghe MB, Medaer R, Bernard CC, Raus J, Stinissen P (2001): T-cell reactivity to multiple myelin antigens in multiple sclerosis patients and healthy controls. *J Neurosci Res* 63, 290–302
- Hellquist A, Zucchelli M, Kivinen K, Saarialho-Kere U, Koskenmies S, Widen E, Julkunen H, Wong A, Karjalainen-Lindsberg M-L, Skoog T (2007): The human GIMAP5 gene has a common polyadenylation polymorphism increasing risk to systemic lupus erythematosus. *J Med Genet* 44, 314–321
- Hernández-Hoyos G, Joseph S, Miller NG, Butcher GW (1999): The lymphopenia mutation of the BB rat causes inappropriate apoptosis of mature thymocytes. *Eur J Immunol* 29, 1832–1841
- Hohlfeld R, Wekerle H (2004): Autoimmune concepts of multiple sclerosis as a basis for selective immunotherapy: from pipe dreams to (therapeutic) pipelines. *Proc Natl Acad Sci* 101, 14599–14606
- Jennings VM (1995): Review of selected adjuvants used in antibody production. *ILAR J* 37, 119–125
- Ji Q, Perchellet A, Goverman JM (2010): Viral infection triggers central nervous system autoimmunity via activation of CD8⁺ T cells expressing dual TCRs. *Nat Immunol* 11, 628–634
- Kieper WC, Troy A, Burghardt JT, Ramsey C, Lee JY, Jiang H-Q, Dummer W, Shen H, Cebra JJ, Surh CD (2005): Cutting edge: recent immune status determines the source of antigens that drive homeostatic T cell expansion. *J Immunol* 174, 3158–3163
- King C, Ilic A, Koelsch K, Sarvetnick N (2004): Homeostatic Expansion of T Cells during Immune Insufficiency Generates Autoimmunity. *Cell* 117, 265–277
- Kosiewicz MM, Dryden GW, Chhabra A, Alard P (2014): Relationship between gut microbiota and development of T cell associated disease. *FEBS Lett* 588, 4195–4206

- Kozovska ME, Hong J, Zang YCQ, Li S, Rivera VM, Killian JM, Zhang JZ (1999): Interferon beta induces T-helper 2 immune deviation in MS. *Neurology* 53, 1692–1692
- Lang JA, Kominski D, Bellgrau D, Scheinman RI (2004): Partial activation precedes apoptotic death in T cells harboring an IAN gene mutation. *Eur J Immunol* 34, 2396–2406
- Le Campion A, Gagnerault M-C, Auffray C, Bécourt C, Poitrasson-Rivière M, Lallemand E, Bienvenu B, Martin B, Lepault F, Lucas B (2009): Lymphopenia-induced spontaneous T-cell proliferation as a cofactor for autoimmune disease development. *Blood* 114, 1784–1793
- Lee YK, Menezes JS, Umesaki Y, Mazmanian SK (2011): Proinflammatory T-cell responses to gut microbiota promote experimental autoimmune encephalomyelitis. *Proc Natl Acad Sci* 108, 4615–4622
- Leitlinien Neurologie s. DGN-Leitlinien 2012
- López-Cadenas C, Sierra-Vega M, García-Vieitez JJ, Díez-Liébana MJ, Sahagún-Prieto A, Fernández-Martínez N (2013): Enrofloxacin: Pharmacokinetics and metabolism in domestic animal species. *Curr Drug Metab* 14, 1042–1058
- Lundsgaard D, Holm TL, Hornum L, Markholst H (2005): In vivo control of diabetogenic T-cells by regulatory CD4+ CD25+ T-cells expressing Foxp3. *Diabetes* 54, 1040–1047
- Mabbott NA, Donaldson DS, Ohno H, Williams IR, Mahajan A (2013): Microfold (M) cells: important immunosurveillance posts in the intestinal epithelium. *Mucosal Immunol* 6, 666–677
- MacMurray AJ, Moralejo DH, Kwitek AE, Rutledge EA, Van Yserloo B, Gohlke P, Speros SJ, Snyder B, Schaefer J, Bieg S (2002): Lymphopenia in the BB rat model of type 1 diabetes is due to a mutation in a novel immune-associated nucleotide (Ian)-related gene. *Genome Res* 12, 1029–1039
- Maranduba CM da C, De Castro SBR, de Souza GT, Rossato C, da Guia FC, Valente MAS, Rettore JVP, Maranduba CP, de Souza CM, do Carmo AMR (2015): Intestinal microbiota as modulators of the immune system and neuroimmune system: impact on the host health and homeostasis. *J Immunol Res* 2015, 931574
- Marleau AM, Sarvetnick N (2005): T cell homeostasis in tolerance and immunity. *J Leukoc Biol* 78, 575–584
- Marrie RA (2004): Environmental risk factors in multiple sclerosis aetiology. *Lancet Neurol* 3, 709–718
- Masuhr KF, Masuhr F, Neumann M (Hrsg.): *Duale Reihe Neurologie*. 7. Auflage; Thieme, Stuttgart 2013
- Mielcarz DW, Kasper LH (2015): The gut microbiome in multiple sclerosis. *Curr Treat Options Neurol* 17, 1–10

- Miller A, Shapiro S, Gershtein R, Kinarty A, Rawashdeh H, Honigman S, Lahat N (1998): Treatment of multiple sclerosis with Copolymer-1 (Copaxone®): implicating mechanisms of Th1 to Th2/Th3 immune-deviation. *J Neuroimmunol* 92, 113–121
- Minagar A, Shapshak P, Fujimura R, Ownby R, Heyes M, Eisdorfer C (2002): The role of macrophage/microglia and astrocytes in the pathogenesis of three neurologic disorders: HIV-associated dementia, Alzheimer disease, and multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 202, 13–23
- Moralejo DH, Fuller JM, Rutledge EA, Van Yserloo B, Ettinger RA, Jensen R, Osborne W, Kwitek A, Lernmark Å (2011): BB rat Gimap gene expression in sorted lymphoid T and B cells. *Life Sci* 89, 748–754
- Münz C, Lünemann JD, Getts MT, Miller SD (2009): Antiviral immune responses: triggers of or triggered by autoimmunity? *Nat Rev Immunol* 9, 246–258
- Murphy K, Weaver C: *Janeway's Immunobiology*. 9. Auflage; Garland Science, New York/London 2016
- Nitta T, Takahama Y (2007): The lymphocyte guard-IANs: regulation of lymphocyte survival by IAN/GIMAP family proteins. *Trends Immunol* 28, 58–65
- Ochoa-Repáraz J, Mielcarz DW, Ditrio LE, Burroughs AR, Foureau DM, Haque-Begum S, Kasper LH (2009): Role of gut commensal microflora in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 183, 6041–6050
- Olson JK, Croxford JL, Calenoff MA, Dal Canto MC, Miller SD (2001): A virus-induced molecular mimicry model of multiple sclerosis. *J Clin Invest* 108, 311–318
- Opferman JT, Korsmeyer SJ (2003): Apoptosis in the development and maintenance of the immune system. *Nat Immunol* 4, 410–415
- Ortega-Hernandez O-D, Agmon-Levin N, Blank M, Asherson RA, Shoenfeld Y (2009): The physiopathology of the catastrophic antiphospholipid (Asherson's) syndrome: compelling evidence. *J Autoimmun* 32, 1–6
- Polukort SH, Rovatti J, Carlson L, Thompson C, Ser-Dolansky J, Kinney SR, Schneider SS, Mathias CB (2016): IL-10 Enhances IgE-Mediated Mast Cell Responses and Is Essential for the Development of Experimental Food Allergy in IL-10-Deficient Mice. *J Immunol* 196, 4865–4876
- Poussier P, Ning T, Murphy T, Dabrowski D, Ramanathan S (2005): Impaired post-thymic development of regulatory CD4+ 25+ T cells contributes to diabetes pathogenesis in BB rats. *J Immunol* 174, 4081–4089
- Purchiaroni F, Tortora A, Gabrielli M, Bertucci F, Gigante G, Ianiro G, Ojetti V, Scarpellini E, Gasbarrini A (2013): The role of intestinal microbiota and the immune system. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 17, 323–333

- Radvanyi LG, Shi Y, Vaziri H, Sharma A, Dhala R, Mills GB, Miller RG (1996): CD28 costimulation inhibits TCR-induced apoptosis during a primary T cell response. *J Immunol* 156, 1788–1798
- Ramanathan S, Poussier P (2001): BB rat lyp mutation and Type 1 diabetes. *Immunol Rev* 184, 161–171
- Ramanathan S, Norwich K, Poussier P (1998): Antigen activation rescues recent thymic emigrants from programmed cell death in the BB rat. *J Immunol* 160, 5757–5764
- Randall TD, Mebius RE (2014): The development and function of mucosal lymphoid tissues: a balancing act with micro-organisms. *Mucosal Immunol* 7, 455–466
- Rolston KVI (2004): Management of infections in the neutropenic patient. *Annu Rev Med* 55, 519–526
- Rosenberg SA, Restifo NP, Yang JC, Morgan RA, Dudley ME (2008): Adoptive cell transfer: a clinical path to effective cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer* 8, 299–308
- Ruck T, Bittner S, Wiendl H, Meuth SG (2015): Alemtuzumab in Multiple Sclerosis: Mechanism of Action and Beyond. *Int J Mol Sci* 16, 16414–16439
- Sondermann W, Griewank KG, Schilling B, Livingstone E, Leyh JC, Rompoti N, Cosgarea I, Schimming T, Schadendorf D, Zimmer L, Hillen U (2015): Corticosteroids Augment BRAF Inhibitor Vemurafenib Induced Lymphopenia and Risk of Infection. *PLOS ONE* 10, e0124590
- Stromnes IM, Goverman JM (2006a): Active induction of experimental allergic encephalomyelitis. *Nat Protoc* 1, 1810–1819
- Stromnes IM, Goverman JM (2006b): Passive induction of experimental allergic encephalomyelitis. *Nat Protoc* 1, 1952–1960
- Sun D, Whitaker JN, Huang Z, Liu D, Coleclough C, Wekerle H, Raine CS (2001): Myelin antigen-specific CD8⁺ T cells are encephalitogenic and produce severe disease in C57BL/6 mice. *J Immunol* 166, 7579–7587
- Surh CD, Sprent J (2000): Homeostatic T Cell Proliferation. *J Exp Med* 192, F9–F14
- van Beelen AJ, Teunissen MB, Kapsenberg ML, de Jong EC (2007): Interleukin-17 in inflammatory skin disorders. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 7, 374–381
- van de Keere F, Tonegawa S (1998): CD4⁺ T cells prevent spontaneous experimental autoimmune encephalomyelitis in anti-myelin basic protein T cell receptor transgenic mice. *J Exp Med* 188, 1875–1882
- van den Brandt J, Wang D, Kwon S-H, Heinkelein M, Reichardt HM (2004): Lentivirally generated eGFP-transgenic rats allow efficient cell tracking in vivo. *Genesis* 39, 94–99

- van den Brandt J, Fischer HJ, Walter L, Hünig T, Klötting I, Reichardt HM (2010): Type 1 diabetes in BioBreeding rats is critically linked to an imbalance between Th17 and regulatory T cells and an altered TCR repertoire. *J Immunol* **185**, 2285–2294
- Wahren-Herlenius M, Dörner T (2013): Immunopathogenic mechanisms of systemic autoimmune disease. *Lancet* **382**, 819–831
- Wang J, Cunningham-Rundles C (2005): Treatment and outcome of autoimmune hematologic disease in common variable immunodeficiency (CVID). *J Autoimmun* **25**, 57–62
- Watanabe M, Masaki K, Yamasaki R, Kawanokuchi J, Takeuchi H, Matsushita T, Suzumura A, Kira J (2016): Th1 cells downregulate connexin 43 gap junctions in astrocytes via microglial activation. *Sci Rep* **6**, 38387
- Wekerle H, Kojima K, Lannes-Vieira J, Lassmann H, Linington C (1994): Animal models. *Ann Neurol* **36**, 47–53
- Wucherpfennig KW, Strominger JL (1995): Selective binding of self peptides to disease-associated major histocompatibility complex (MHC) molecules: a mechanism for MHC-linked susceptibility to human autoimmune diseases. *J Exp Med* **181**, 1597–1602
- Zadeh HH, Greiner DL, Wu DY, Tausche F, Goldschneider I (1996): Abnormalities in the Export and Fate of Recent Thymic Emigrants in Diabetes-Prone BB/W Rats1. *Autoimmunity* **24**, 35–46
- Zamvil SS, Steinman L (1990): The T lymphocyte in experimental allergic encephalomyelitis. *Annu Rev Immunol* **8**, 579–621
- Zan H, Casali P (2015): Epigenetics of Peripheral B-Cell Differentiation and the Antibody Response. *Front Immunol* **6**, 631
- Zheng P, Chang X, Lu Q, Liu Y (2013): Cytopenia and autoimmune diseases: a vicious cycle fueled by mTOR dysregulation in hematopoietic stem cells. *J Autoimmun* **41**, 182–187
- Zoghi S, Amirghofran Z, Nikseresht A, Ashjazadeh N, Kamali-Sarvestani E, Rezaei N (2011): Cytokine secretion pattern in treatment of lymphocytes of multiple sclerosis patients with fumaric acid esters. *Immunol Invest* **40**, 581–596

7 Anhang

Tabelle A1: Fallzahlen zu Abbildung 4: Gimap5-defiziente Tiere weisen in den Lymphknoten eine T-Zell-Lymphopenie auf.

Organ und untersuchte Zellpopulation (WT/IL versus Gimap5 -/-)	B-Zellen	T-Zellen	CD4	CD8	NK
LK	18/11	8/2	18/16	18/16	10/14

Tabelle A2: Fallzahlen zu Abbildung 9: Gimap5-defiziente T-Lymphozyten weisen in den peripheren lymphatischen Organen einen aktivierten Phänotyp auf.

CD134: Organ und untersuchte Zellpopulation (WT/IL versus Gimap5 -/-)	T-Zellen	CD4	CD8
LK	32/15	32/15	-
Milz	8/2	8/2	-
Thymus	8/2	8/2	-
IFN γ : Organ und untersuchte Zellpopulation (WT/IL versus Gimap5 -/-)	T-Zellen	CD4	CD8
LK	24/12	24/12	24/12
Milz	8/2	8/2	8/2
Thymus	8/2	8/2	8/2
LFA1: Organ und untersuchte Zellpopulation (WT/IL versus Gimap5 -/-)	T-Zellen	CD4	CD8

LK	9/6	8/2	8/2
Milz	-	-	-
Thymus	-	-	-

Tabelle A3: Fallzahlen zu Abbildung 12: Gimap5-defiziente Ratten weisen altersabhängig erhöhte IgE-, aber nicht IgG-Antikörper-Titer im Serum auf.

Experiment/Anzahl (WT/IL versus Gimap5 -/-)	IgE	IgG
Punktgraphiken (A, C)	26/23	26/21
Altersabhängig (B, D)	1Monat:4/4, 2M:5/8, 3M:7/5, 4M:0/3, 5M:3/0, 6M:4/0, 7M:0/4, 8M: -, 9M:1/0, 10M:4/0, 11M: -, 12M:2/3	1Monat:4/4, 2M:3/2, 3M:4/5, 4M:0/3, 5M:3/0, 6M:5/0, 7M:0/4, 8M: -, 9M:1/0, 10M:3/0, 11M: -, 12M:3/3

Danksagung

Bedanken möchte ich mich als erstes bei Prof. Holger Reichardt für die Möglichkeit, in seiner Arbeitsgruppe zu forschen und für die allzeit freundliche und motivierende Betreuung. Es gab immer ein offenes Ohr für Fragen und konstruktive Diskussionen.

Als Anfängerin im Labor wäre dieses Projekt kaum ohne tatkräftige Unterstützung meiner Betreuerin Dr. Henrike Fischer möglich gewesen. Danke für Deine Herzlichkeit und die ansteckende Freude an der Wissenschaft.

Ein großer Dank gilt der ganzen AG Reichardt, insbesondere Carina, Elena, Katharina, Julian, Amina, Sybille und Sarah. Ihr habt mir bei wissenschaftlichen/praktischen Fragen immer zur Seite gestanden und meine Zeit bei Euch mit vielen tollen Erinnerungen auch außerhalb des Labors gespickt.

Bedanken möchte ich mich außerdem bei meinen Eltern und bei Dimi, die einige Passagen dieser Arbeit lebhaft diskutiert und mit neuen Ideen gefüllt haben.

Lebenslauf

Ich bin am 05.07.1992 in Hannover geboren, habe dort im Juni 2010 die schulische Ausbildung mit dem Abitur an der Schillerschule beendet und wohne seit Oktober 2010 in Göttingen. Hier begann ich zum Wintersemester 2010/11 das Studium der Humanmedizin an der Georg-August-Universität.

Im September 2012 und April 2016 absolvierte ich das Erste und Zweite Staatsexamen. Im September 2013 nahm ich für den überwiegenden experimentellen Teil meiner Dissertation ein Freisemester. Die Tertiale des Praktischen Jahres absolvierte ich in der Abteilung für Innere Medizin an den Asklepios Kliniken Schildautal, Seesen, in der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Kinderchirurgie, in der Klinik für Unfallchirurgie, Orthopädie und plastische Chirurgie und in der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin an der Universitätsmedizin Göttingen. Im Mai 2017 beendete ich mein Studium mit dem Dritten Staatsexamen. Seit August 2017 arbeite ich als Assistenzärztin in der Abteilung Innere Medizin am Evangelischen Krankenhaus Göttingen-Weende.

Von Juli 2014 bis Mai 2017 war ich Mitglied der Studienstiftung des deutschen Volkes. Fremdsprachenkenntnisse habe ich in Englisch (flüssig) sowie Französisch und Italienisch (Grundkenntnisse). Meine Interessen liegen neben dem Studium in Sport und Musik. Seit 1998 spiele ich Hockey. Mit meiner Mannschaft wurde ich 2004 Deutscher Vizemeister, außerdem war ich Teil der Junioren-Niedersachsenauswahl. Über mein Hobby lernte ich im Team zu arbeiten und Herausforderungen zu meistern. In den Jahren 2011-2014 trainierte ich eine Kindermannschaft des Hockey Club Göttingen. Seit 2001 spiele ich Trompete und gewann 2003 den ersten Platz im Wettbewerb „Jugend Musiziert“ in Hannover. Ich spielte im Schulorchester sowie bei der Camerata Medica.