

Aus dem Institut für Neuroimmunologie
(Prof. Dr. Flügel)
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

Die Rolle des ko-stimulatorischen Moleküls CD28 in verschiedenen Phasen der EAE

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

vorgelegt von
Johannes Hufschmidt
aus Hamburg

Göttingen 2017

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer

Referent: PD Dr. F. Lühder

Ko-Referent/in: Prof. Dr. Holger Reichardt

Datum der mündlichen Prüfung: 25. Januar 2018

AFFIDAVIT

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "*Die Rolle des ko-stimulatorischen Moleküls CD28 in verschiedenen Phasen der EAE*" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den ____ . ____ . ____

(Unterschrift)

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis	IV
Abkürzungsverzeichnis	V
1 Einleitung	1
1.1 Multiple Sklerose.....	2
1.1.1 Ätiologie	2
1.1.2 Pathogenese	3
1.1.3 Klinischer Verlauf und Prognose.....	4
1.1.4 Therapie.....	6
1.2 Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis.....	7
1.2.1 Pathogenese der EAE.....	9
1.3 Aktivierung naiver T-Zellen.....	12
1.3.1 Bedeutung ko-stimulatorischer Signale für die Aktivierung und Differenzierung von T-Zellen.....	12
1.3.2 CD28 und regulatorische T-Zellen	14
1.4 Bedeutung von CD28 in der EAE.....	15
1.5 Cre-Rekombinase-Modell.....	17
1.6 Beurteilung der Expression und Deletion von CD28	18
1.6.1 Kinetik der Deletion von CD28.....	19
1.6.2 Wirksamkeit der induzierbaren CD28-Deletion.....	19
1.6.3 Klinische Beurteilung der Rolle der Deletion von CD28.....	20
1.7 Ziele der Arbeit	20
2 Material und Methoden.....	22
2.1 Material.....	22
2.1.1 Versuchstiere	22
2.1.2 Agenzien für die Behandlung der Mäuse	23
2.1.3 Antikörper und Farbstoffe für die Durchflusszytometrie.....	23
2.1.4 Puffer und Medien.....	24
2.1.5 Verbrauchsgüter und Laborausrüstung.....	27
2.1.6 Gerätschaften	28
2.1.7 Software.....	28
2.2 Methoden.....	29
2.2.1 EAE-Induzierung	29
2.2.2 Klinische Beurteilung.....	29
2.2.3 Deletion von CD28	30
2.2.4 Organentnahme und Herstellung einer Einzelzellsuspension.....	30
2.2.5 T-Zell-Isolation und Injektion.....	30

2.2.6 B-Zell-Isolation und Injektion.....	31
2.2.7 CFSE-Färbung.....	32
2.2.8 Färben der Zellen.....	32
2.2.9 Sortieren der Zellen.....	34
2.2.10 RNA-Isolation.....	34
2.2.11 Reverse Transkription.....	34
2.2.12 Quantitative Real-Time Polymerase-Kettenreaktion.....	35
2.2.13 Statistische Auswertung.....	35
3 Ergebnisse.....	36
3.1 Deletion von CD28 vor Symptombeginn.....	36
3.1.1 Frühe Aktivierungsmarker auf T-Zellen.....	37
3.1.2 Späte Aktivierungsmarker auf T-Zellen.....	39
3.1.3 Zytokine.....	42
3.1.4 Proliferation.....	46
3.2 Deletion von CD28 am Höhepunkt der EAE.....	50
3.2.1 Klinische Beurteilung in iCD28ko-Mäusen.....	51
3.2.2 Aktivierte und naive T-Zellen.....	52
3.2.3 Apoptotische T-Zellen.....	53
3.2.4 Regulatorische T-Zellen.....	55
3.3 Klinische Beurteilung in OT II-Mäusen.....	57
4 Diskussion.....	60
4.1 Die induzierbare Deletion von CD28 stellt ein sinnvolles Werkzeug zur Untersuchung der Bedeutung von CD28 in der EAE dar.....	60
4.2 Auswirkungen der Deletion von CD28 vor Symptombeginn.....	61
4.2.1 Die Deletion von CD28 führt zu einer deutlichen Reduktion aktivierter T-Zellen.....	61
4.2.2 Die Deletion von CD28 führt möglicherweise zu einer reduzierten Zytokinproduktion.....	63
4.2.3 Die Proliferationsrate MOG-spezifischer CD4 ⁺ -T-Zellen ist bei Deletion von CD28 reduziert.....	65
4.3 Auswirkungen der Deletion von CD28 am Höhepunkt der EAE.....	66
4.3.1 CD28 spielt eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der klinischen Symptomatik.....	66
4.3.2 Die CD28-vermittelte Ko-Stimulation führt zu einem größeren Anteil aktivierter T-Zellen.....	67
4.3.3 Die Deletion von CD28 führt zu einer gesteigerten Apoptose.....	68
4.3.4 Regulatorische T-Zellen sind wahrscheinlich nicht verantwortlich für einen milderen Krankheitsverlauf in Abwesenheit von CD28.....	69
4.4 Die Deletion von CD28 ausschließlich in transferierten T-Lymphozyten führt zu einem deutlich abgeschwächten Krankheitsverlauf.....	71
5 Zusammenfassung.....	73
6 Literaturverzeichnis.....	74

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1: Molekularer Aufbau der Myelinscheide	8
Abbildung 1-2: Pathophysiologie der Neurodegeneration bei MS bzw. EAE.....	11
Abbildung 1-3: Mechanismus der Tamoxifen-induzierten CD28-Deletion	18
Abbildung 1-4: Kinetik der Deletion von CD28.....	19
Abbildung 3-1: Schema der Versuche zur Beurteilung der Deletion von CD28 vor Symptombeginn	37
Abbildung 3-2: Effekte der Deletion von CD28 vor Symptombeginn auf frühe Aktivierungsmarker, Tag 6	38
Abbildung 3-3: Effekte der Deletion von CD28 vor Symptombeginn auf frühe Aktivierungsmarker, Tag 8	39
Abbildung 3-4: Effekte der Deletion von CD28 vor Symptombeginn auf aktivierte T- Zellen	41
Abbildung 3-5: Effekte der Deletion von CD28 vor Symptombeginn auf naive T-Zellen	42
Abbildung 3-6: Effekte der Deletion von CD28 vor Symptombeginn auf die Expression von Interferon- γ	43
Abbildung 3-7: Effekte der Deletion von CD28 vor Symptombeginn auf die Expression von IL-17	44
Abbildung 3-8: Effekte der Deletion von CD28 vor Symptombeginn auf die Genexpression von Interferon- γ (A) und IL-17A (B)	46
Abbildung 3-9: Proliferation von T-Zellen in Abhängigkeit von CD28 am Tag 6 p. i.	47
Abbildung 3-10: Proliferation von T-Zellen in Abhängigkeit von CD28 am Tag 6 p. i. im Histogramm	48
Abbildung 3-11: Proliferation von T-Zellen in Abhängigkeit von CD28 am Tag 8 p. i.	49
Abbildung 3-12: Proliferation von T-Zellen in Abhängigkeit von CD28 am Tag 8 p. i. im Histogramm	50
Abbildung 3-13: Schema der Versuche zur Beurteilung der Deletion von CD28 am Höhepunkt der EAE.....	51
Abbildung 3-14: Klinischer Verlauf der EAE in iCD28ko-Mäusen	52
Abbildung 3-15: Effekte der CD28-Deletion am Höhepunkt der EAE auf Aktivierungsmarker von T-Zellen.....	53
Abbildung 3-16: Effekte der CD28-Deletion am Höhepunkt der EAE auf die Apoptose.....	55
Abbildung 3-17: Effekte der Deletion von CD28 am Höhepunkt der EAE auf T _{Reg} - Zellen	56
Abbildung 3-18: Klinischer Verlauf in OT II-Mäusen nach T-Zell-Transfer.....	58
Abbildung 3-19: Klinischer Verlauf in OT II-Mäusen nach B- & T-Zell-Transfer	59

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2-1: Bei der Immunisierung verwendete Agenzien.....	23
Tabelle 2-2: Verwendete Antikörper	24
Tabelle 2-3: Verwendete Medien und ihre Inhaltsstoffe	24
Tabelle 2-4: Verwendete Primer und Sonden.....	26
Tabelle 2-5: Benutzte Gerätschaften.....	28
Tabelle 3-1: Übersicht über die Anzahlen der Proben bei der Durchführung der qRT-PCR	45

Abkürzungsverzeichnis

4-OHT	4-Hydroxytamoxifen
7-AAD	7-Aminoactinomycin D
ADEM	Akute disseminierte Enzephalomyelitis
Anm. d. V.	Anmerkung des Verfassers
AP1	<i>Activator protein 1</i>
APC	Antigen-präsentierende Zelle
AS	Aminosäuren
Bcl-xL	<i>B-cell lymphoma-extra large</i>
cDNA	Komplementäre DNA
CFA	Komplettes Freund-Adjuvans
CFSE	Carboxyfluorescein-Succinimidylester
CIA	Kollagen-induzierte Arthritis
CIS	Klinisch isoliertes Syndrom
CTLA-4	<i>Cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein 4</i>
DGN	Deutsche Gesellschaft für Neurologie
dLN	Drainierende Lymphknoten
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
EAE	Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis
EDSS	<i>Expanded Disability Status Scale</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EH	<i>Eagles Hepes Medium</i>
EMA	<i>European Medicines Agency</i>
Fab-Fragment	<i>Fragment antigen-binding</i>
FACS	<i>Fluorescence-activated Cell Sorting</i>

FCS	Fetales Kälberserum
GADS	<i>Grb2-related adaptor downstream of Shc</i>
GLAT	Glatirameracetat
GLUT1	Glukose-Transporter 1
GM-CSF	<i>Granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i>
Grb2	<i>Growth factor receptor-bound protein 2</i>
HPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase
Hsp90	Heat-Shock-Protein 90
ICOS	<i>Inducible T-cell Co-Stimulator</i>
iCD28ko	Induzierbare Deletion von CD28
IFA	Inkomplettes Freund-Adjuvans
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IMSF	Institut für Multiple-Sklerose-Forschung
Itk	IL-2-induzierbare T-Zell-Kinase
Lck	Lymphozyten-spezifische Protein-Tyrosin-Kinase
MBP	Basisches Myelinprotein
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
MOG	Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein
MRT	Magnetresonanztomographie
MS	Multiple Sklerose
MSTKG	Multiple Sklerose Therapie Konsensus Gruppe
ndLN	Nicht-drainierende Lymphknoten
NFAT	<i>Nuclear factor of activated T-cells</i>
NF κ B	<i>Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd-Lösung
p. i.	nach Immunisierung

PKB, PKC	Proteinkinase B, Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PLP	Proteolipid-Protein
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PP-MS	Chronisch-progrediente Multiple Sklerose
PTx	Pertussistoxin
qRT-PCR	Quantitative Real-Time PCR
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RP-MS	Schubförmig-progrediente Multiple Sklerose
RR-MS	Schubförmig-remittierende Multiple Sklerose
SH2, SH3	Src homology-2, Src homology-3
SP-MS	Sekundär-progrediente Multiple Sklerose
TCR	T-Zell-Rezeptor
TLR	Toll-like-Rezeptor
UAW	Unerwünschte Arzneimittelwirkungen
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 Einleitung

Als Abwehrsystem gegenüber körperfremden und potentiell pathogenen Strukturen hat das Immunsystem eine existentielle Aufgabe zur Erhaltung der körperlichen Integrität des Menschen. Die erste Komponente des Immunsystems ist die Barrierefunktion von Haut und Schleimhaut. Durch ihren engen Zellverbund verhindern diese Gewebe das unkontrollierte Eindringen von Pathogenen in den menschlichen Körper. Meist ist jedoch, wenn vom Immunsystem die Rede ist, in erster Linie die innere Komponente des Immunsystems gemeint. Diese lässt sich weiter in die unspezifische und die adaptive Immunabwehr unterteilen. Die Differenzierung zwischen körpereigenen und körperfremden Strukturen ist dabei ein essentieller Aspekt des Immunsystems.

Das unspezifische Immunsystem bezeichnet die nicht Erreger-spezifische Antwort des Körpers auf körperfremde Zellen und ist angeboren. Dazu gehören Granulozyten, Monozyten, Makrophagen und Natürliche Killerzellen (NK-Zellen), aber auch nicht-zelluläre Bestandteile wie das Komplementsystem oder antibakterielle Peptide. Teil der unspezifischen Immunantwort ist die Vermittlung von Phagozytose und Destruktion des Pathogens (z. B. Bakterien). Darüber hinaus steht diese über Chemotaxis und Antigenpräsentation in Wechselwirkung mit dem spezifischen Immunsystem des Körpers. Bei Erstkontakt mit einem Pathogen ist das unspezifische Immunsystem für die initiale Immunreaktion verantwortlich, da für die Antwort des spezifischen Immunsystems erst eine Stimulation mittels Antigenpräsentation benötigt wird.

Viele Krankheitserreger zeichnen sich dadurch aus, dass sie Mechanismen entwickelt haben, um der unspezifischen Immunantwort zu entgehen. In diesen Fällen muss das adaptive Immunsystem eingreifen. Wichtige Komponenten dieses Systems sind einerseits die B-Lymphozyten mit den von ihnen produzierten Immunglobulinen und andererseits die T-Lymphozyten. Diese sind aufgrund ihrer Antigenspezifität in der Lage, einen Großteil der Fremdantigene, welche potentielle Pathogene darstellen, zu binden. Wenn ein Pathogen in den menschlichen Körper eindringt, ist der erste Schritt für die Aktivierung der adaptiven Immunantwort die Präsentation dieses Pathogens im lymphatischen Gewebe, vor allem durch dendritische Zellen und Makrophagen. Durch Aufnahme von Antigenen sowie durch die Präsenz von lokalen Entzündungsmediatoren werden die dendritischen Zellen aktiviert und wandern mit Hilfe von Chemokinen in das lymphatische Gewebe ein, genauer in die T-Zell-Zone. Hier binden naive T-Lymphozyten mit ihrem T-Zell-Rezeptor an die *Major Histocompatibility Complex*-Moleküle (MHC) der dendritischen Zellen und differenzieren beim sog. Priming zu Effektorzellen aus. Vor allem durch Zytokine, die von der dendritischen Zelle freigesetzt werden, wird festgelegt, welcher Subtyp der T-Zellen sich entwickelt. So sind zytotoxische CD8⁺-T-Zellen in der Lage, Antigenfragmente zu erkennen, die auf MHC-I-Molekülen präsentiert werden, und die entsprechende (z. B. viral infizierte)

Zelle zu töten. CD4⁺-T-Helferzellen koordinieren die weitere Immunantwort im Anschluss an die Antigenpräsentation. Auch hier gibt es verschiedene Subtypen. T_H1- und T_H17-Zellen aktivieren insbesondere die zellvermittelte Immunantwort gegen intra- bzw. extrazelluläre Pathogene. Dagegen vermitteln vor allem T_H2-Zellen über eine Aktivierung von B-Zellen die humorale Immunantwort. Nach Antigenkontakt entwickelt sich ein Teil der spezifischen Lymphozyten zu Gedächtniszellen. Diese vermitteln bei erneutem Kontakt mit dem gleichen Pathogen eine schnellere und effektivere Reaktion des Organismus, wodurch die Pathogene eliminiert werden können, bevor sie krank machen (Janeway & Murphy 2009).

1.1 Multiple Sklerose

Multiple Sklerose, auch bekannt als Enzephalomyelitis disseminata, ist die häufigste neurologische Erkrankung des jungen Erwachsenenalters. Weltweit sind über zwei Millionen Menschen an Multipler Sklerose erkrankt (Browne et al. 2014), wobei die Prävalenz in nördlichen Regionen deutlich höher ist als in äquatornahen Regionen (Compston & Coles 2008). Während die durchschnittliche jährliche Inzidenz in Europa insgesamt etwa 4,3 auf 100.000 Einwohner beträgt (Pugliatti et al. 2006), ist beispielsweise in Island von einer jährlichen Inzidenz von 7,6 auf 100.000 Einwohner die Rede (Eliasdóttir et al. 2011). In Deutschland wird von mehr als 140.000 Erkrankten ausgegangen (Höer et al. 2014; Kip et al. 2016). Dabei sind Frauen mehr als doppelt so häufig betroffen wie Männer und das Durchschnittsalter der Patienten bei Erstdiagnose beträgt etwa 20 – 40 Jahre (Inglese 2006).

Obwohl die Krankheit seit der Erstbeschreibung ihrer Symptome durch Robert Carswell und Jean Cruveilhier Mitte des vorvergangenen Jahrhunderts (Compston 1988) Gegenstand zahlreicher Untersuchungen war, ist die genaue Pathogenese bis heute nicht zufriedenstellend geklärt. Relativ früh war bereits bekannt, dass ein klarer Zusammenhang zwischen der Akkumulation von Entzündungszellen in der weißen Substanz des ZNS und rezidivierenden neurologischen Dysfunktionen besteht (Hafler 2004).

1.1.1 Ätiologie

Als ursächlich für die Entwicklung von MS wird eine genetische Prädisposition angenommen, wobei zahlreiche Umweltfaktoren einen Einfluss zu haben scheinen. Ersteres zeigt die Tatsache, dass das Erkrankungsrisiko in der Familie betroffener Patienten für Verwandte ersten Grades bis zu 40-fach und bei eineiigen Zwillingen 300-fach erhöht ist (Sadovnick et al. 1996). Ein wichtiger Umweltfaktor hingegen ist die Auswirkung von Vitamin D-Mangel auf die Entstehung von MS. Unterstützt wird diese sog. Vitamin D-Hypothese

durch das Nord-Süd-Gefälle bei Prävalenz und Inzidenz von MS, was die Bedeutung der Sonnenexposition unterstreicht. Auch scheint ein Vitamin D-Mangel mit einem schwereren Krankheitsverlauf assoziiert zu sein (Thouvenot et al. 2015). Weitere oft genannte Faktoren mit einem Einfluss auf Prävalenz und Prognose einer MS sind Stress (Marrie 2004), Nikotinkonsum (Jafari & Hintzen 2011) oder die Ernährungsweise (Hadgkiss et al. 2015). Eine wichtige Rolle scheint aber auch das Epstein-Barr-Virus zu spielen: So gilt für Personen, die in der Kindheit an infektiöser Mononukleose erkrankten, ein bis zu zwanzigfach erhöhtes Erkrankungsrisiko (Ascherio & Munger 2007). Jedoch scheint nicht jede mikrobielle Infektion risikoerhöhend zu sein: So ist eine mögliche Erklärung der sog. „Hygiene-Hypothese“, dass eine verminderte Häufigkeit von opportunistischen Infektionen in der Kindheit eine adäquate Reifung des Immunsystems verhindert. Es zeigten bspw. Hughes et al. (2013), dass das Vorhandensein jüngerer Geschwister, und damit eine entsprechende Exposition gegenüber potentiellen Pathogenen, mit einer verringerten Wahrscheinlichkeit des Auftretens von Demyelinisierung im ZNS einhergeht.

1.1.2 Pathogenese

MS zeigt charakteristische Eigenschaften autoinflammatorischer Erkrankungen, sodass davon ausgegangen werden kann, dass eine Autoimmunerkrankung vorliegt. Diese Annahme wird gestützt durch die Tatsache, dass sich immunsuppressive bzw. -modulatorische Therapieschemata als derzeit wirksamste Option in der Behandlung von MS erweisen. Eine initiale Entzündungsreaktion im Gehirn führt zu einer erhöhten Durchlässigkeit der Blut-Hirn-Schranke, welche zur Migration von in der Peripherie aktivierten T-Zellen in das ZNS führt. Diese T-Zellen sind gegen Bestandteile des Myelins, wie das basische Myelinprotein (MBP), und andere körpereigene Proteine gerichtet. Im ZNS werden sie durch die Präsentation dieser Autoantigene reaktiviert, was zu einer Verstärkung der Entzündung und der Produktion von Zytokinen führt. Außerdem werden durch die Sekretion von Chemokinen B-Lymphozyten an den Entzündungsort gelockt. Diese produzieren dann nach ihrer Aktivierung Autoantikörper, welche weitere pro-inflammatorische Prozesse in Gang setzen. Dieser Kreislauf ist ursächlich für die Ausbildung sklerotischer Läsionen, welche durch Demyelinisierung und – daraus resultierend – axonalen Schaden charakterisiert sind.

Dieser Aspekt wird bestätigt durch die Tatsache, dass in sklerotischen Plaques aus Läsionen von MS-Patienten Antikörper gegen MOG gefunden wurden (O'Connor et al. 2005). Allerdings können Antikörper gegen MBP auch im Blut von Menschen gefunden werden, die nie einen MS-Schub erlitten haben. Jedoch scheinen diese Antikörper nicht mit der gleichen Reproduzierbarkeit zu einer zellulären Immunantwort zu führen, wie die o. g. in Plaques vorhandenen oder auch solche aus dem peripheren Blut von MS-Patienten (Linker et al. 2005).

Unklar ist insbesondere auch die genaue Ursache der fälschlichen Aktivierung autoantigener T-Zellen. Einer Theorie von Hartung et al. (2014) zufolge findet die initiale Aktivierung dieser T-Zellen in den zentralen lymphatischen Organen durch molekulare Mimikry statt. Dieser Begriff charakterisiert die Kreuzreaktivität körperfremder, mikrobieller Pathogene einerseits und Peptiden der Myelinscheiden andererseits, wobei ein wichtiger Aspekt zu sein scheint, dass die Bindungsaffinität des T-Zell-Rezeptors zu dem mikrobiellen Peptid niedriger ist als zu dem Autoantigen (Harkiolaki et al. 2009).

Bei Wucherpfennig (2001) und Nogai et al. (2005) wird die „Bystander-Aktivierung“ als Ursache postuliert: Dabei führt die Entzündung während einer bakteriellen oder viralen Infektion zu einer erhöhten Synthese von pro-inflammatorischen Zytokinen und schließlich zu einer akzidentiellen Aktivierung und Proliferation von T-Zellen aufgrund einer erhöhten Expression ko-stimulatorischer Moleküle auf Antigen-präsentierenden Zellen (APCs).

Jüngere Forschungsergebnisse legen nahe, dass insbesondere T_H17 -Zellen eine große Rolle in der Pathogenese von MS zu spielen scheinen. Einen der ersten Hinweise dafür lieferten Lock et al. (2002), als sie nachweisen konnten, dass höhere Expressionen von Zytokinen, die mit T_H17 -Zellen assoziiert sind, positiv mit dem Fortschreiten von Multipler Sklerose korrelieren. Des Weiteren wurde auf Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke in MS-Läsionen die Expression solcher Zytokine nachgewiesen. Insgesamt scheint die Zytokin-freisetzung durch T_H17 -Zellen die Durchlässigkeit der Blut-Hirn-Schranke zu erhöhen und zu einer Verstärkung der Entzündungsreaktion durch T-Zell-Rekrutierung und der Ausschüttung weiterer pro-inflammatorischer Zytokine zu führen (Kebir et al. 2007). Ein weiterer Aspekt, der die Relevanz von T_H17 -Zellen in der Pathogenese der MS verdeutlicht, ist, dass im Blut und Liquor von MS-Patienten eine Überexpression von IL-17 nachgewiesen werden kann (Shabgah et al. 2014).

1.1.3 Klinischer Verlauf und Prognose

Als erste klinische Symptome von MS werden zumeist Seh- und Sensibilitätsstörungen oder das chronische Erschöpfungssyndrom berichtet (Stuke et al. 2009). Für die klinische Beurteilung der neurologischen Beeinträchtigung existiert die von Kurtzke (1983) entwickelte Expanded Disability Status Scale (EDSS). Es werden acht verschiedene funktionelle Systeme berücksichtigt: die Pyramidenbahnen, das Kleinhirn, der Hirnstamm, das Sensorium, die Blasen- und Mastdarmfunktion, die Sehfunktion, die zerebrale Funktion und andere neurologische Funktionen. Diese Skala beinhaltet dabei eine Bewertung von 0 (= neurologisch unauffällig) bis 10 (= Tod infolge MS) und stellt, obwohl sie mittlerweile über 30 Jahre alt ist, weiterhin den Standard zur klinischen Verlaufsbeobachtung, aber auch zur Erfolgskontrolle bei Therapiestudien dar (Kurtzke 1983; Hufschmidt et al. 2013).

Im weiteren Verlauf einer MS treten verschiedene Ausprägungen auf, die wie folgt unterteilt werden: Der sog. schubförmige Verlauf kann mit einer vollständigen oder partiellen Remission einhergehen. Dies bezeichnet man dann als schubförmig-remittierende Multiple Sklerose (RR-MS) bzw. schubförmig-progrediente Multiple Sklerose (RP-MS). Ein Schub wird als eine neurologische Beeinträchtigung bezeichnet, die länger als 24 Stunden anhält und mit einer inflammatorischen Schädigung des ZNS einhergeht.

Bei einer weiteren Verlaufsform findet die erwähnte Remission der klinischen Symptome nicht statt. Stattdessen findet nach dem initialen Schub eine progrediente Verschlechterung der Symptome statt. Diese Form wird als primär- oder chronisch-progrediente Multiple Sklerose (PP-MS) bezeichnet.

Bei etwa 40% der Patienten, die initial am häufigsten Subtyp schubförmig-remittierende MS (RR-MS) leiden, wird in einem Zeitraum von zehn Jahren ein Übergang in eine progrediente Form beobachtet, die dann als sekundär-progrediente Multiple Sklerose bezeichnet wird (Richards et al. 2002).

Die Diagnosestellung von MS erfolgt nach den revidierten McDonald-Kriterien. Für diese ist vor allem der Nachweis von räumlicher und zeitlicher Dissemination von Bedeutung. Dabei bedeutet räumliche Dissemination, dass entweder klinisch-neurologisch oder mittels der empfohlenen MRT-Untersuchung Läsionen in mindestens zwei verschiedenen Regionen des ZNS nachweisbar sind. Für die zeitliche Dissemination ist zum Beispiel ein zweiter Schub mit einem Mindestabstand von 30 Tagen zum Beginn des ersten Schubes erforderlich (Polman et al. 2011).

Für den mittel- und langfristigen Krankheitsverlauf eines Patienten gibt es zahlreiche prognostische Faktoren. Eine wichtige Rolle scheint der klinische Verlauf bei Krankheitsbeginn zu spielen: So hat eine initiale RR-MS eine bessere Prognose als die PP-MS und ein monosymptomatischer Krankheitsverlauf ist günstiger als ein Verlauf mit vielfältigen Symptomen (Scalfari et al. 2010). Insgesamt ist die Prognose des individuellen Krankheitsverlaufes jedoch äußerst schwierig. So lässt sich bspw. aus der Schubfrequenz zu Beginn der MS oder auch aus MRT-Befunden keine Aussage über den langfristigen Verlauf der Schwere der Beeinträchtigungen durch MS ableiten (Scalfari et al. 2013).

Schwierig ist die Abgrenzung zur akuten disseminierten Enzephalomyelitis (ADEM). Diese – in ihrer Maximalform auch als Hurst-Enzephalitis bekannte Erkrankung – bezeichnet ebenfalls eine demyelinisierende Entzündung des ZNS. Im Gegensatz zur MS zeichnet sich die ADEM jedoch *per definitionem* durch einen monophasischen Verlauf aus, sodass der erste Schub einer MS auch als ADEM fehlinterpretiert werden kann und umgekehrt.

1.1.4 Therapie

Wie schon anfangs angedeutet, gestaltet sich die MS-Therapie momentan noch relativ schwierig, weil bis dato fast ausschließlich empirisch validierte Therapiekonzepte zum Einsatz kommen, die Multiple Sklerose nicht ursächlich bekämpfen. Ein wichtiger Aspekt ist der Fokus auf den axonalen Schaden, dessen klinische Auswirkungen man zu reduzieren versucht. Da von MS als einer Autoimmunerkrankung ausgegangen wird, liegt der therapeutische Schwerpunkt konsequenterweise auf immunmodulatorischen bzw. immunsuppressiven Therapieansätzen. Dabei wird zwischen den verschiedenen Subtypen der MS unterschieden.

In der Basistherapie spielen laut den aktuellen Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Neurologie (DGN) insbesondere Glatirameracetat (GLAT) oder rekombinante β -Interferone eine wichtige Rolle (Leitlinie Multiple Sklerose 2014). Für beide Arzneimittel sind mittlerweile Langzeitdaten publiziert, die zeigen, dass auch nach jahrzehntelanger Anwendung von einer anhaltenden therapeutischen Wirkung bei tolerierbaren unerwünschten Arzneimittelwirkungen (UAW), wie zum Beispiel Grippe-ähnlichen Symptomen, ausgegangen werden kann (Bayas & Rieckmann 2000; Rieckmann 2006). Gemäß den Empfehlungen der MS Therapie Konsensus Gruppe (MSTKG) sollte mit einer Interferon- β -Therapie so früh wie möglich begonnen werden (Rieckmann 2006).

GLAT ist ein synthetisches Oligopeptidanalogen des MBP. Der genaue Wirkmechanismus von GLAT ist nicht abschließend geklärt, postuliert wird jedoch eine Induktion von regulatorischen T-Zellen bei gleichzeitiger Hemmung von T_H17 -Zellen, sowie eine Induktion neuroprotektiver Faktoren wie *Brain-derived neurotrophic factor* (Caporro et al. 2014). Rekombinante β -Interferone haben, wie auch die physiologisch vorkommenden β -Interferone, eine immunmodulatorische Wirkung. Der genaue Mechanismus ist allerdings – ähnlich wie bei GLAT – noch nicht abschließend geklärt. Ramgolam & Markovic-Plese (2010) zeigten, dass Interferon- β über die verschiedenen Zytokine die Differenzierung in T_H17 -Zellen unterdrückt.

Eine weitere Behandlungsoption stellt die Therapie mit dem Zytostatikum Mitoxantron dar. Diese kann jedoch z.T. schwere UAW nach sich ziehen: So ist Mitoxantron kardiotoxisch, und es tritt in etwa 0,1% der Fälle eine akute myeloische Leukämie auf (Scott & Figgitt 2004). In der Behandlung der MS scheint dabei vor allem auf lange Sicht die Apoptose-Induktion in APCs von Bedeutung zu sein (Szwed 2014). Zur Eskalationstherapie bei RR-MS ist mittlerweile Fingolimod das Therapeutikum der ersten Wahl. Dabei handelt es sich um einen Wirkstoff, der insbesondere die Migration der Lymphozyten über die Blut-Hirn-Schranke hemmt (Aktas et al. 2011).

Als erster monoklonaler Antikörper kommt Natalizumab in der MS-Therapie zum Einsatz. Ähnlich wie Fingolimod wird es in der Eskalationstherapie der RR-MS oder bei hochaktiven Verläufen derselben empfohlen (Leitlinie Multiple Sklerose 2014). Die Wirkung wird durch eine Hemmung der Migration der Lymphozyten vermittelt. Beim Einsatz von Nata-

lizumab ist allerdings – insbesondere bei länger andauernder Behandlung – ein erhöhtes Risiko einer progressiven multifokalen Leukenzephalopathie zu berücksichtigen, welche mit einer Inzidenz von etwa 0,3% auftritt (Hoepner et al. 2014). Insgesamt stellen – wie bei vielen anderen Erkrankungen – die monoklonalen Antikörper eine vielversprechende Therapieoption für die Zukunft dar (Straus Farber et al. 2016).

Im akuten Schub ist ein Methylprednisolonpuls Therapie der ersten Wahl. Postulierter Wirkmechanismus ist eine Hemmung der Entzündungsreaktion im Allgemeinen und die Wiederherstellung der Integrität der Blut-Hirn-Schranke (Leitlinie Multiple Sklerose 2014). Darüber hinaus scheinen Glukokortikoide einen positiven Einfluss auf die kortikale Erregbarkeit zu haben (Ayache et al. 2014). Die Auswirkungen einer Stoßtherapie mit Methylprednisolon auf die langfristige Prognose sind noch nicht abschließend geklärt. Zwar besitzt Methylprednisolon ein breites Spektrum an UAWs, jedoch ist es im akuten Schub derzeit (noch) alternativlos, da kein anderes Medikament eine vergleichbare Wirksamkeit erzielt.

1.2 Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis

Die experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis (EAE) ist ein heutzutage weitverbreitetes Tiermodell zur Erforschung von MS. Durch eine Immunisierung mit Proteinen oder davon abgeleiteten Peptiden, die Bestandteil der Myelinscheide der Nervenbahnen sind, wird eine Entzündung autoimmuner Genese in Hirn und Rückenmark induziert. Erstmals beschrieben wurde dieses Phänomen von Rivers et al. (1933) als sie bei Makaken eine Erkrankung induzieren konnten, welche einer monophasischen Enzephalomyelitis beim Menschen nach Verabreichung einer Tollwut-Impfung ähnelte. Auch wenn die EAE so eher einer ADEM ähnelt, bestehen in Bezug auf Klinik, Immunologie und Histopathologie zahlreiche Gemeinsamkeiten mit MS, sodass die EAE als Tiermodell bei sachgemäßer Ausführung weiterhin „ein entscheidendes Werkzeug darstellen wird, um das Verständnis und die Behandlung dieser verheerenden Krankheit [Multiple Sklerose, Anm. d. V.] zu verbessern.“ (Gold et al. 2006, S. 1953). Die Möglichkeit einer Therapie der MS mit Natalizumab wurde beispielsweise als erstes bei der EAE beschrieben (Yednock et al. 1992).

Bei der EAE lassen sich zwei verschiedene Formen unterscheiden: Bei der passiven EAE werden den Versuchstieren autoaggressive CD4⁺-T-Zellen injiziert, welche nach einer relativ kurzen Latenzzeit klinische Symptome, wie zum Beispiel Paresen, verursachen. Bei der aktiven EAE hingegen müssen keine T-Zellen transferiert werden. Stattdessen injiziert man Bestandteile der Myelinscheiden mit Immunstimulanzien, sodass das Immunsystem des Empfängertieres vor allem T-Zell-vermittelt auf die Inhaltsstoffe reagiert und damit die eigenen Myelinscheiden angreift. Als Antigene haben sich bspw. das Proteolipid-Protein (PLP, Tuohy et al. 1988), MBP (Zamvil et al. 1985) oder – wie für die vorliegende Arbeit

verwendet – das Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein (MOG) (Lebar et al. 1986) etabliert (**Abbildung 1-1**).

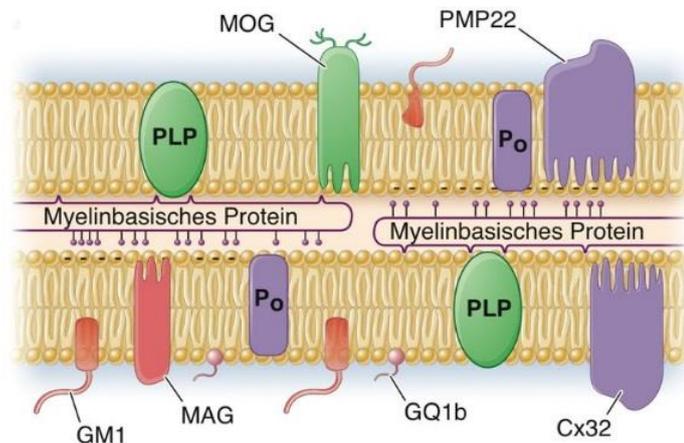


Abbildung 1-1: Molekularer Aufbau der Myelinscheide

Gezeigt sind die wichtigsten krankheitsrelevanten Proteine. Auf das zerebrale Myelin beschränkte Proteine sind grün eingezeichnet, Proteine des peripherenervösen Myelins sind lila und Proteine, die im gesamten Nervensystem vorkommen, sind rot eingezeichnet. Das Proteolipidprotein (PLP) vermittelt die extrazelluläre Anhaftung aneinandergrenzender Myelinlamellen im ZNS. Das myelinbasierte Protein (MBP) spielt eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der Molekularstruktur des Myelins im ZNS. Die Rolle von MOG ist nicht abschließend geklärt, postuliert wird eine Funktion bei der Entstehung der Myelinscheide. Die Lage von MOG auf der äußersten Lamelle der ZNS-Myelinmembran macht es vermutlich angreifbarer für Autoantikörper.

Cx32 = Connexin 32; GM1 = Monosialotetrahexosylgangliosid; GQ1b = Tetrasialogangliosid 1b; MAG = Myelinassoziertes Glykoprotein; P0 = Myelinprotein 0; PMP22 = Peripheres Myelinprotein 22 (Dietel & Fauci 2012, S. 3487. Die Verwendung erfolgt mit freundlicher Genehmigung des ABW-Wissenschaftsverlags).

Der Vorteil der EAE als Tiermodell der MS liegt – wie vorab erwähnt – u. a. in den Gemeinsamkeiten in Bezug auf die Histopathologie. So zeigen Tiere nach einer Immunisierung, die nach den oben genannten Grundsätzen erfolgt ist, Demyelinisierungsherde in Hirn und Rückenmark, die durch infiltrierende T-Zellen und Makrophagen verursacht werden. Darüber hinaus lassen sich auch einige der MS verwandte Erkrankungen, wie bspw. die Neuromyelitis optica, reproduzierbar generieren (Storch et al. 1998). Dabei scheint die Kombination aus injiziertem Antigen und Genotyp des Tieres eine entscheidende Rolle zu spielen: So führt die Immunisierung von C57Bl/6J-Mäusen mit MOG₃₅₋₅₅ in der Regel zu einem chronisch-progressiven Krankheitsverlauf, während eine Immunisierung von SJL-Mäusen mit PLP₁₃₉₋₁₅₁ einen remittierenden Verlauf verursacht (Gold et al. 2006). Eine weitere Möglichkeit ist die Generierung von transgenen Mäusen mit T-Zell-Rezeptoren, welche sich spezifisch gegen Bestandteile der Myelinscheiden richten.

Für die Experimente im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde ein Immunisierungsprotokoll verwendet, welches erstmals von Mendel et al. (1995) beschrieben wurde: Dabei wird MOG₃₅₋₅₅ subkutan in C57Bl/6J-Mäuse injiziert. Die Tiere entwickeln bei hoher Reproduzierbarkeit typischerweise eine aufsteigende Paralyse, welche etwa zehn Tage nach der Immunisierung beginnt. Dafür wird MOG₃₅₋₅₅ in einer Emulsion mit CFA, bestehend aus IFA in Kombination mit Mykobakterium tuberculosis, injiziert. Die Zugabe von CFA bewirkt eine Induktion ko-stimulatorischer Signalwege auf peripheren APCs, wie bspw. die Expression von CD80 und CD86 (Shibaki & Katz 2002). Zusätzlich wird am Tag der Immunisierung sowie 48 Stunden danach Pertussistoxin (PTx) verabreicht. Dies führt zu einer Steigerung der Immunantwort und – daraus resultierend – zu einer optimierten Reproduzierbarkeit der EAE. Die genauen molekulargenetischen Mechanismen sind nicht genau geklärt, es wird jedoch postuliert, dass PTx als Surrogat für umweltbedingte Auslösefaktoren dient. Als zentrale Rolle wird die Erhöhung der Durchlässigkeit der Blut-Hirnschranke beschrieben, welche die Migration pathogener T-Zellen in das ZNS ermöglicht. Durch Steigerung der Zytokin-Produktion sowie der Lymphozytose könnte PTx außerdem einen Beitrag zur Pathogenese der EAE liefern (Hofstetter et al. 2002).

1.2.1 Pathogenese der EAE

In den meisten Immunisierungsprotokollen zur EAE wird die Autoimmunreaktion in erster Linie über CD4⁺-T-Zellen vermittelt, welche an MHC-Klasse-II-Komplexe binden. Dabei führt die Ähnlichkeit der CD4⁺-T-Zell-vermittelten EAE mit der „klassischen“ MS dazu, dass diese Zellen im Mittelpunkt des Interesses der Forschung stehen, obwohl Lymphozyteninfiltrate in aktiven MS-Läsionen in erster Linie aus CD8⁺-T-Zellen bestehen (Babbe et al. 2000; Goverman 2009). Ein wichtiger Aspekt ist die genaue Identifizierung der Subpopulation der CD4⁺-T-Zellen, welche in der Induktion der EAE eine entscheidende Rolle spielt. In den vergangenen Jahren setzte dabei ein Umdenken ein: Während bis vor einigen Jahren noch angenommen wurde, dass CD4⁺-T_H1-Zellen in der Pathogenese der EAE am wichtigsten sind, wird heute davon ausgegangen, dass IL-17-produzierende T_H17-Zellen eine entscheidende Rolle in der Entstehung autoimmuner Entzündungsprozesse im Gehirn – und damit in der Pathogenese der EAE – spielen (Korn et al. 2009; Bedoya et al. 2013). Unterstützt wird diese Annahme u. a. durch eine Studie von Murugaiyan et al. (2015), in der die Hemmung der Expression von MicroRNA-21 zu einer mangelnden T_H17-Differenzierung führte und die entsprechenden Tiere trotz Immunisierung keine EAE entwickelten. Bei der Entstehung einer EAE nach Immunisierung mit MOG₃₅₋₅₅ sind alle Zellen des Immunsystems beteiligt. Eine besondere Rolle scheint jedoch den dendritischen Zellen zuzukommen: Diese nehmen das Antigen auf, migrieren zu den drainierenden Lymphknoten, wo sie aktiviert werden, um schließlich durch Antigenpräsentation autoreaktive CD4⁺-T-Zellen zu aktivieren (Mohammad et al. 2012). Dafür ist die Zugabe von PTx und CFA essentiell, da es sonst nicht zur Aktivierung von autoreaktiven

T-Zellen käme. Nach ihrer Aktivierung verlassen diese T-Zellen die regionalen Lymphknoten und dringen in das ZNS ein. Es wird angenommen, dass die T-Zellen nach Überquerung der Blut-Hirn-Schranke im Subarachnoidalraum durch lokal präsente APCs reaktiviert werden und so – noch während des symptomfreien Intervalls – die Initialzündung für die Entstehung der Neuroinflammation setzen (Kivisäkk et al. 2009). Die darauf folgende verstärkte Sekretion verschiedener Zytokine und Chemokine führt zu einer Einwanderung weiterer T-Zellen, aber auch von Makrophagen und neutrophilen Granulozyten (Tran et al. 2000). Die Interaktion von T-Zellen mit perivaskulären APCs führt schließlich zur Invasion der T-Zellen in das Parenchym (Bartholomäus et al. 2009). Gemeinsam mit Makrophagen verursachen die auf diese Weise reaktivierten T-Zellen die Zerstörung von Axonen und Demyelinisierung, was zum klinischen Beginn der Krankheitssymptomatik führt (**Abbildung 1-2**).

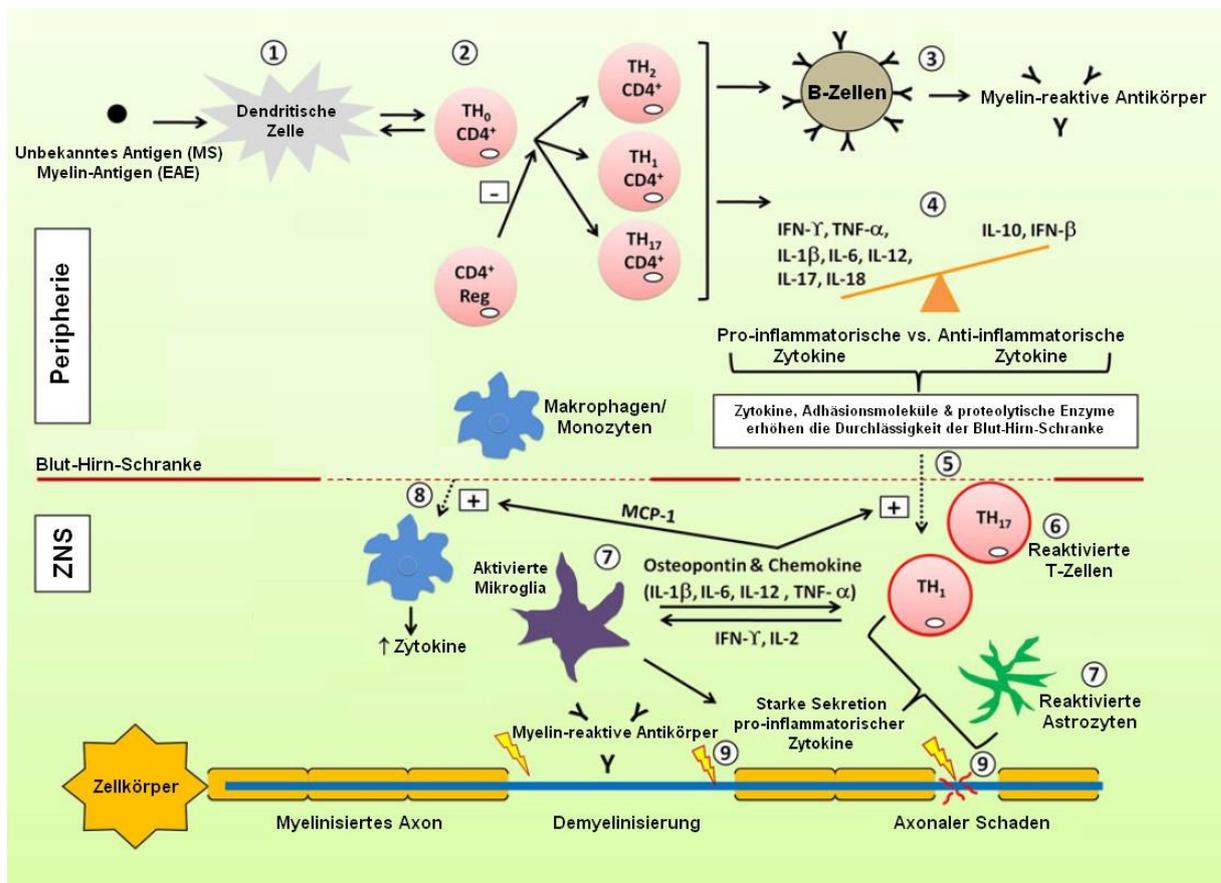


Abbildung 1-2: Pathophysiologie der Neurodegeneration bei MS bzw. EAE

(1) Dendritische Zellen nehmen Myelin-Antigene auf (bei EAE) und präsentieren diese CD4⁺-T-Zellen. (2) Daraufhin werden verschiedene Subpopulationen zur Proliferation angeregt, darunter v. a. TH₁ und TH₁₇ Zellen. (3) B-Zellen werden aktiviert und zur Produktion Myelin-reaktiver Antikörper angeregt. (4) Pro- und anti-inflammatorische Zytokine werden produziert, darunter Interferon- γ und IL-17. (5) Die Interaktion zwischen diesen Zytokinen und Adhäsionsmolekülen, wie VCAM-1, in Kombination mit Matrix-Metalloproteasen führt zu einer Beeinträchtigung der Blut-Hirn-Schranke. (6) Im ZNS erfolgt die Reaktivierung geprägter T-Zellen durch perivaskuläre Makrophagen oder dendritische Zellen, was eine starke Freisetzung pro-inflammatorischer Zytokine bewirkt. (7) Die folgende Aktivierung von Gliazellen führt ebenfalls zu einer Freisetzung pro-inflammatorischer Zytokine. (8) Die Expression dieser Zytokine und des Chemokins CCL2 (oder auch MCP-1) bewirkt die weitere Migration von Makrophagen und T-Zellen in das ZNS. (9) Insgesamt führen diese Signalwege zur Demyelinisierung und zum axonalen Schaden, was die klinische Symptomatik von EAE bzw. MS verursacht.

VCAM-1 = Vasculäres Zell-Adhäsions-Molekül-1; MCP-1 = Monozyten-Chemoattraktions-Protein 1 (Bearbeitet nach Khan & Smith 2014, S. 12. Die Verwendung erfolgt unter den Bedingungen der Creative Commons-Lizenz BY).

1.3 Aktivierung naiver T-Zellen

Nach der Synthese im Knochenmark wandern die Progenitorzellen in den Thymus ein, wo sie T-Zell-Rezeptoren an der Oberfläche exprimieren, die in der Lage sind, mit MHC-Molekülen zu interagieren. Unter physiologischen Bedingungen findet dabei eine negative Selektion statt, um eine Immunreaktion auf körpereigene Epitope zu verhindern. In den sekundären lymphatischen Organen können naive $CD4^+$ -T-Zellen durch APCs aktiviert werden. Vergleichend zur Neurophysiologie wird die Interaktion zwischen diesen beiden Zelltypen als immunologische Synapse bezeichnet.

Für eine vollständige Aktivierung sind mehrere Signale nötig: Die Antigenpräsentation durch APCs mit Hilfe von MHC-Molekülen führt zum sog. ersten Signal. Dafür exprimieren $CD4^+$ -T-Zellen auf ihrer Oberfläche T-Zell-Rezeptoren, welche gemeinsam mit CD3 den T-Zell-Rezeptor-Komplex bilden. Nach Ausbildung der immunologischen Synapse mit dem antigenpräsentierenden MHC-Molekül wird durch die Rekrutierung des Ko-Rezeptors CD4 eine anhaltende Bindung an das MHC-Molekül sichergestellt. Nach Bindung des Antigens wird eine intrazelluläre Signalkaskade in Gang gesetzt, welche schließlich über die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren (wie z. B. NF κ B, NFAT oder AP1) zu einer verstärkten Expression von Genen führt, die für pro-inflammatorische Zytokine kodieren. Außerdem führt die Signaltransduktion der TCRs zu einer verstärkten Proliferation – auch als klonale Expansion bezeichnet – und Migration von (weiteren) T-Lymphozyten. Bei $CD4^+$ -T-Zellen führt dieses Signal darüber hinaus zu einer Differenzierung in T-Helfer-Zellen (Smith-Garvin et al. 2009).

Das zweite oder auch ko-stimulatorische Signal, das für die komplette Aktivierung der T-Zellen vonnöten ist, wurde erstmals von Bretscher & Cohn (1970) postuliert. Am bedeutsamsten für die Aktivierung naiver T-Zellen ist das ko-stimulatorische Signal mittels Bindung der B7-Moleküle auf den APCs (CD80/CD86) an ihren Rezeptor auf den T-Zellen, CD28. Darauf möchte ich im Folgenden näher eingehen.

1.3.1 Bedeutung ko-stimulatorischer Signale für die Aktivierung und Differenzierung von T-Zellen

Die Ko-Stimulation via CD28 ist für die suffiziente Aktivierung von T-Zellen essentiell. So führt *in vitro* eine Bindung an den T-Zell-Rezeptor ohne gleichzeitige Bindung von CD28 durch eines der B7-Moleküle der APCs dazu, dass die T-Zelle in einen anergen Zustand oder sogar in die Apoptose übergeht (Harding et al. 1992; Daikh et al. 1997). Aber auch *in vivo* konnte nachgewiesen werden, dass die Expression von CD28 für die Entwicklung zahlreicher autoimmun-vermittelter Krankheiten, wie z. B. eben EAE, erforderlich ist (Webb et al. 1996; Oliveira-dos-Santos et al. 1999). Allerdings scheint nicht jede Subpopulation innerhalb der T-Zellen gleichermaßen von CD28-vermittelter Signaltransduktion abhängig zu sein. Vielmehr scheint die Blockade von CD28-abhängigen Signalwegen die Entwicklung

von CD4⁺-T_H-Zellen deutlich stärker zu beeinträchtigen als die von CD8⁺-T-Zellen (Newell et al. 1999).

Komplizierter wird es, wenn man die Wechselwirkungen zwischen CD28 und den verschiedenen Subpopulationen der CD4⁺-T_H-Zellen betrachtet. Es gibt Hinweise, dass eine Blockade von CD28 in erster Linie zu einer Hemmung von T_H1-Zellen führt, ohne T_H2-Zellen zu beeinflussen (Khoury et al. 1995). In anderen Veröffentlichungen wird jedoch eine Abhängigkeit auch der T_H2-Zellen von der Bindung von B7-Molekülen an CD28 beschrieben (King et al. 1996) oder sogar, dass die CD28-abhängige Ko-Stimulation für die Entwicklung von T_H2-Zellen eine größere Rolle spiele als für die Entwicklung von T_H1-Zellen (Corry et al. 1994). Jüngere Studien legen nahe, dass neben der B7-CD28-Wechselwirkung vor allem auch die Dosis des Antigen und die Anzahl der reagiblen CD4⁺-T-Zellen einen großen Einfluss auf die Differenzierung in T_H1- oder T_H2-Zellen hat (Rudulier et al. 2014). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass dieser Signalweg auch in der Pathogenese T_H2-vermittelter Autoimmunerkrankungen wie der Kollagen-induzierten Arthritis (CIA) oder allergischer T_H2-abhängiger Erkrankungen eine entscheidende Rolle zu spielen scheint (Oliveira-dos-Santos et al. 1999; Tada et al. 1999; Girvin et al. 2000; Gogishvili et al. 2012). Allerdings scheint die Induktion von EAE oder CIA unter gewissen Umständen auch ohne CD28-vermittelte Ko-Stimulation möglich zu sein (Chitnis et al. 2001; Taneja et al. 2005).

Diese Auswirkungen der Bindung von CD28 werden auf vielfältige Art und Weise erreicht: So führt die Bindung von B7-Molekülen an CD28 zu einer Hochregulation des anti-apoptotischen Faktors Bcl-xL, u. a. durch eine Aktivierung von NFκB. Die so stimulierten Zellen sind weniger empfänglich für die Signalwirkung von CD95/CD95L-Interaktionen. Dieser Signalweg führt normalerweise nach T-Zell-Aktivierung zur Apoptose-Induktion, um eine überschießende Immunreaktion zu verhindern (Boise et al. 1995). Die Behandlung der Zellen mit CD28-Superagonisten führt zwar ebenfalls zu einer Induktion von NFAT (ein Aktivator des für CD95L kodierenden Gens). Diese ist jedoch im Verhältnis zu den anti-apoptotischen Wirkungen vermindert (Kerstan & Hünig 2004).

Um die klonale Expansion der T-Zellen, ihr Überleben und die weitere Differenzierung zu unterstützen, induziert die CD28-vermittelte Ko-Stimulation eine erhöhte Glukoseaufnahme durch vermehrte Expression von GLUT1 an der Zelloberfläche, ebenso wie eine Aktivierung der Glykolyse. Auf diese Weise wird Energie für die aktivierten T-Zellen zur Verfügung gestellt, die diese anscheinend – ähnlich der Warburg-Hypothese in der Onkologie – anaerob verstoffwechseln (Frauwirth et al. 2002; Boomer & Green 2010; Palmer et al. 2015).

Des Weiteren führt diese Signalkaskade zu einem vermehrten Ca²⁺-Einstrom. Außerdem erfolgt eine Reorganisation des Zytoskeletts von T-Zellen und über die verstärkte Ausbildung sog. *lipid rafts* an der Zelloberfläche eine verstärkten Attraktion u. a. der Lymphozyten-spezifischen Protein-Tyrosin-Kinase Lck im Bereich der immunologischen Synapse

(Boomer & Green 2010; Chen & Flies 2013). Ebenso wird durch die Bindung von CD28 die mRNA pro-inflammatorischer Zytokine stabilisiert (Bour-Jordan et al. 2011).

Der entscheidende Mechanismus über den die CD28-vermittelte Ko-Stimulation von T-Zellen vermittelt wird, ist jedoch die Hochregulation von CD25, der α -Kette des IL-2-Rezeptors, und dem zugehörigen Liganden IL-2, was eine erhöhte Überlebens- und Proliferationsrate der Antigen-spezifischen T-Zellen verursacht und die klonale Expansion einleitet (Kuiper et al. 1994). Darüber hinaus wird die Anzahl benötigter TCR-Aktivierungen und damit die Reizschwelle für eine suffiziente Aktivierung herabgesetzt (Chen & Flies 2013). Bei Transkriptionsanalysen zeigte sich, dass T-Zellen, die nur ein Signal via TCR erhalten, inaktiven Zellen deutlich ähnlicher sind als solchen, die auch ein zweites, CD28-vermitteltes Signal erhielten (Martinez-Llordella et al. 2013). Gelegentlich wird die weitere Differenzierung der T-Zellen durch die Sekretion verschiedener inflammatorischer Zytokine als drittes Signal bezeichnet (Curtsinger & Mescher 2010).

Ein weiteres Molekül, das bei der Regulierung der T-Zell-Aktivierung eine Rolle spielt, ist CTLA-4. Dieses wird – im Gegensatz zu CD28 – erst nach Aktivierung exprimiert und bindet ebenfalls B7-Moleküle. Allerdings führt die Bindung von CD80 oder CD86 durch CTLA-4 zu einer verminderten Erregbarkeit der T-Zellen. Dies geschieht durch Hemmung der Expression von IL-2 und Interferon- γ in den T-Zellen. Außerdem induziert CTLA-4 immunosuppressive Signalwege in APCs (Munn et al. 1999). Auf diese Weise wird die Aktivierung von T-Zell-Rezeptoren durch das Wechselspiel zwischen CD28 einerseits und CTLA-4 andererseits reguliert (Krummel & Allison 1995; Perrin et al. 1999a).

1.3.2 CD28 und regulatorische T-Zellen

Neben den zuvor genannten Auswirkungen CD28-vermittelter Ko-Stimulation spielt dieser Signalweg auch eine bedeutsame Rolle in der Entwicklung regulatorischer T-Zellen. Die Unterdrückung von CD28-vermittelter Ko-Stimulation führt einerseits zu einer deutlich beeinträchtigten Reifung von regulatorischen T-Zellen im Thymus und andererseits zu einer verminderten Überlebensrate regulatorischer T-Zellen in der Peripherie (Guo et al. 2008). Es zeigen sich auch intrinsische Effekte der CD28-vermittelten Ko-Stimulation auf regulatorische T-Zellen. Wird die Reifung der T_{Reg} -Zellen im Thymus noch ermöglicht und erst danach durch induzierbare CD28-Deletion diese ko-stimulatorischen Signale unterbunden, zeigt sich ein beträchtlicher Verlust an regulatorischen T-Zellen in der Peripherie, während die Anzahl $CD4^+$ - und $CD8^+$ -T-Zellen insgesamt nicht reduziert ist. Die regulatorischen T-Zellen sind überdies in ihrer suppressiven Funktion beeinträchtigt. Als möglicher Wirkmechanismus wird die reduzierte Expression von CTLA-4 in Folge der CD28-Deletion postuliert (Gogishvili et al. 2013). Die beeinträchtigte Suppressor-Funktion regulatorischer T-Zellen in Abwesenheit CD28-abhängiger Ko-Stimulation wird in einer weiteren Veröffentlichung verdeutlicht, in der Mäuse mit CD28-defizienten T_{Reg} -Zellen im

Vergleich zu Wildtyp-Mäusen einen schwereren klinischen Verlauf einer EAE ohne Remission zeigen. In diesem Fall führt die Deletion von CD28 also durch die gestörte Entwicklung regulatorischer T-Zellen zur Aggravation des klinischen Verlaufs der EAE (Zhang et al. 2013). Im Gegenzug konnte in einer weiteren Studie nach Applikation geringer Dosen eines CD28-Superagonisten, welcher in erster Linie die Entwicklung von T_{Reg} -Zellen bewirkt, ein deutlich milderer klinischer Verlauf einer EAE beobachtet werden (Beyersdorf et al. 2005). Bei einem *First-in-man*-Versuch mit dem daraufhin entwickelten Superagonisten TGN1412 zeigte sich jedoch, wie fein die Dosis dieser Substanz abgestimmt werden muss, als es bei sechs gesunden Probanden kurz nach Verabreichung von TGN1412 zu einem Zytokinsturm lebensbedrohlichen Ausmaßes mit massiver Freisetzung proinflammatorischer Zytokine wie Interferon- γ , TNF und IL-2 kam (Suntharalingam et al. 2006; Hünig 2012). Nach vielfältiger, weitergehender Ursachenforschung laufen mittlerweile wieder klinische Studien mit diesem Superagonisten, bei denen eine vornehmliche Aktivierung regulatorischer T-Zellen erreicht werden konnte (Tabares et al. 2014).

Wenn durch Gabe von Immunglobulinen etwa eine Woche nach Immunisierung die Signaltransduktion via CTLA-4 und B7 blockiert wird, zeigen sich in der Folge eine verstärkte Demyelinisierung und Entzündungsreaktion im ZNS sowie ein schwererer klinischer Verlauf. Dies ist auf eine Suppression regulatorischer T-Zellen durch die Immunglobulin-Gabe zurückgeführt worden (Vogel et al. 2015).

1.4 Bedeutung von CD28 in der EAE

So gut wie alle in den vergangenen Jahren veröffentlichten Arbeiten zur Bedeutung von CD28 für die EAE kommen zu dem Fazit, dass die CD28-vermittelte Ko-Stimulation ein wichtiger, wenn nicht gar der entscheidende Schritt in der Pathogenese der EAE ist. So wurde in verschiedenen Studien gezeigt, dass durch die Blockade dieses Signalwegs eine deutliche Reduktion klinischer Symptomatik erreicht werden kann. Die Bedeutung CD28-vermittelter Ko-Stimulation konnte dabei für verschiedene EAE-Modelle gezeigt werden (Oliveira-dos-Santos et al. 1999; Girvin et al. 2000; Srinivasan et al. 2002). Allerdings reagieren $CD28^{-/-}$ -MBP-spezifische T-Zellen auch ohne CD28-vermittelte Ko-Stimulation auf die Applikation von MBP als Antigen durch Proliferation und die Sekretion von IL-2, wenn auch in geringerem Ausmaß als bei $CD28^{+/-}$ -T-Zellen (Oliveira-dos-Santos et al. 1999). Des Weiteren entwickelten CD28-defiziente Mäuse bei Immunisierung nach einem EAE-Protokoll eine experimentelle autoimmune Meningitis. Dieses Krankheitsbild unterscheidet sich in seiner klinischen Ausprägung von der EAE, führt jedoch ebenfalls $CD4^{+}$ -T-Zell-vermittelt zu neurologischer Ausfallssymptomatik. Die CD28-abhängige Ko-Stimulation scheint also einen bedeutsamen Einfluss auf die klinische Ausprägung der Immunantwort auf Neuroantigene zu haben (Perrin et al. 1999b).

Es stellt sich daher die Frage, wie ko-stimulatorische Signale vermittelt werden können, wenn die CD28-vermittelte Signaltransduktion blockiert ist. Bei CD28-knockout-Mäusen zeigten sich nach einer zweiten Immunisierung ebenfalls EAE-typische Lymphozyteninfiltrate im ZNS und diese entwickelten in der Folge eine EAE mit vergleichbarem klinischem Verlauf wie Wildtyp-Kontrollen. Dabei scheint die Interaktion zwischen Ox40 – auch als CD134 bekannt – und seinem Liganden ebenfalls von Bedeutung für die Aktivierung und Zytokinproduktion von T-Zellen zu sein. Zwar wird Ox40 im Gegensatz zu CD28 nicht konstitutiv auf naiven T-Zellen exprimiert, aber dieser Signalweg scheint eine alternative Möglichkeit der Ko-Stimulation darzustellen (Chen et al. 1999; Chitnis et al. 2001).

Als weitere Alternative wird die CD40/CD40L-Signaltransduktion postuliert: Nach Blockade dieses Signalweges bei CD28-defizienten Mäusen führte auch eine zweite Immunisierung mit MOG₃₅₋₅₅ nicht zur klinischen Manifestation einer EAE (Girvin et al. 2002). Die Zusammenschau dieser Ergebnisse legt nahe, dass eine Blockade der CD28-vermittelten Ko-Stimulation nicht automatisch zur immunologischen Anergie führt, sondern vielmehr die Reizschwelle zur Aktivierung von T-Zellen erhöht. Gleichzeitig liefert dies auch einen Hinweis, dass – obwohl EAE in erster Linie eine T-Zell-vermittelte Erkrankung ist – auch B-Zellen eine wichtige Rolle in der Pathogenese spielen.

Die Blockade der Ko-Stimulation durch Bindung von B7-Molekülen an CD28 scheint ein vielversprechendes Ziel zur Therapie autoimmun vermittelter Inflammation im ZNS zu sein. Die Applikation von CTLA-4-Ig, welche die Bindung von B7 an CD28 unterbindet, führt zu einer deutlichen Reduktion klinischer Symptome der EAE – jedoch in erster Linie dann, wenn dies schon während der Immunisierung geschieht. Die Behandlung mit CTLA-4-Ig bei Tieren, denen bereits aktivierte MBP-spezifische T-Zellen injiziert wurden, hatte keine Auswirkungen auf die Inzidenz oder den klinischen Verlauf der EAE (Perrin et al. 1995). Weitergehend kann davon ausgegangen werden, dass bereits aktivierte T-Zellen oder sog. Gedächtniszellen in deutlich geringerem Maße von B7/CD28-vermittelter Ko-Stimulation abhängig sind als naive T-Zellen (Schweitzer & Sharpe 1998). Dies zeigte sich auch bei der Untersuchung MBP-reaktiver T-Zellen, die MS-Patienten entnommen wurden (Racke et al. 2000).

Um eine bereits klinisch manifeste EAE zu unterbinden oder zumindest abzumildern, scheint die direkte Manipulation von CD28 eine gute Möglichkeit zu sein. Dabei wird postuliert, dass die B7-vermittelte Ko-Stimulation nicht vollständig mit der CD28-vermittelten Ko-Stimulation gleichzusetzen ist. Im Gegenteil scheint eine Behandlung mit CTLA-4-Ig, wenn sie in erster Linie die Interaktion zwischen CD86 (einem B7-Molekül) und CTLA-4 hemmt, zu einer Aggravation der EAE zu führen (Racke et al. 1995). Die direkte Blockade von CD28 durch monoklonale Fab-Antikörper führte auch nach klinischer Manifestation einer EAE zu einem abgeschwächten Krankheitsverlauf (Perrin et al. 1999a). Die Wirksamkeit einer MS-Therapie durch eine Antikörper-vermittelte Blockade der CD28/B7-Ko-Stimulation wird teilweise angezweifelt, da bei einigen MS-Patienten der

Anteil von CD4⁺-CD28⁻-T-Zellen deutlich erhöht war. Daraus wurde gefolgert, dass diese Zellen dem Wirkmechanismus dieser Therapie keine Angriffsfläche böten und so weiterhin autoinflammatorische Prozesse vermitteln würden (Markovic-Plese et al. 2001). Bei der – ebenfalls autoinflammatorisch bedingten – rheumatoiden Arthritis wurde 2007 Abatacept – ein CTLA4-Ig – von der europäischen Arzneimittelagentur zugelassen und die Zulassung seitdem schrittweise erweitert. In einer kürzlich veröffentlichten Studie zum Einsatz dieses Fusionsproteins in der Therapie der RR-MS zeigte sich jedoch keine Reduktion MR-radiologischer Läsionen oder eine Verbesserung der klinischen Symptomatik unter einer Therapie mit Abatacept (Khoury et al. 2016).

Trotz dieses Rückschlages stellt die Antikörper-vermittelte Hemmung der CD28-vermittelten Ko-Stimulation weiterhin einen aussichtsreichen Ansatz in der MS-Therapie dar. Gleichzeitig bleiben aber viele molekularbiologische Feinheiten im Unklaren, sodass die weiterführende Erforschung der Auswirkungen der Hemmung der Ko-Stimulation von großem Interesse ist.

1.5 Cre-Rekombinase-Modell

Um untersuchen zu können, welche Auswirkungen die Deletion von CD28 in den verschiedenen Phasen der EAE hat, wurden für diese Arbeit Tamoxifen-induzierbare CD28-knockout (iCD28ko)-Mäuse verwendet, wie sie von Seibler et al. (2003) und Gogishvili et al. (2012) beschrieben werden. Dieses Konzept erlaubt eine zeitlich genau definierte, permanente Deletion des CD28-Gens. Zu diesem Zweck besitzen diese Mäuse im konditionalen Allel zwei LoxP2-Stellen. Diese können von der Cre-Rekombinase identifiziert werden, sofern sich diese im Nukleus befindet. Dies führt in der Folge dazu, dass der Genabschnitt zwischen den beiden LoxP2-Stellen herausgeschnitten und dadurch inaktiviert wird. Bei iCD28ko-Mäusen liegen die Exone 2 und 3 in diesem Bereich, sodass nach Cre-vermittelter Rekombination kein funktionales CD28 mehr exprimiert werden kann. Die Steuerung, wann die Deletion stattfindet, erfolgt über die Lokalisation der Cre-Rekombinase, welche als Fusionsprotein mit der Liganden-bindenden Domäne des Östrogen-Rezeptors vorliegt (Seibler et al. 2003). Die Verwendung gewebespezifischer Promoter führt dazu, dass die Expression dieses Fusionsproteins nur in den erwünschten Geweben vorkommt, sprich, dass es auch nur in diesen Geweben zu einer Deletion von CD28 kommen kann. In diesen Geweben wird durch die Bindung der Cre-Rekombinase an das Heat-Shock-Protein 90 (Hsp90) initial verhindert, dass diese in den Nukleus migrieren kann; die Cre-Rekombinase ist also inaktiv. Erst die Zugabe von Tamoxifen führt zur Verdrängung von Hsp90. Alternativ kann auch der Metabolit 4-Hydroxytamoxifen (4-OHT) benutzt werden; wichtig ist aber, dass endogene Steroide nicht in der Lage sind, Hsp90 aus seiner Bindung zu verdrängen, um eine akzidentelle Aktivierung der Cre-Rekombinase zu verhindern. Nach Bindung an Tamoxifen (oder eben 4-OHT) ist die Cre-Rekombinase in

der Lage, in den Zellkern einzudringen und hier durch Rekombination die Deletion der entsprechenden Genabschnitte zu vermitteln (**Abbildung 1-3**).

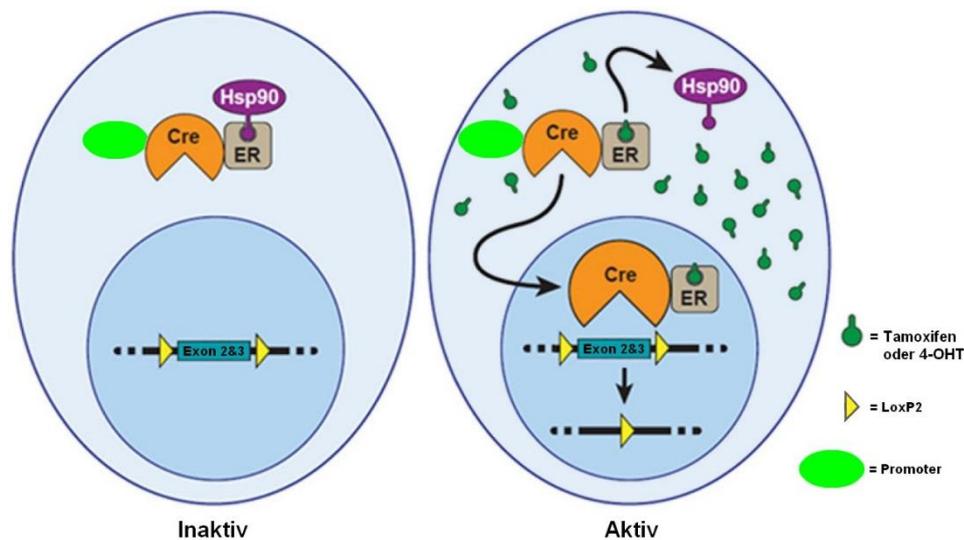


Abbildung 1-3: Mechanismus der Tamoxifen-induzierten CD28-Deletion

Die Cre-Rekombinase (Cre) liegt als Fusionsprotein mit der Liganden-bindenden Domäne des Östrogen-Rezeptors (ER) vor. Die Expression erfolgt nur in bestimmten Zellen unter der Kontrolle gewebe-spezifischer Promoter-Regionen. In Abwesenheit von Tamoxifen ist die CreER an Hsp90 gebunden, wodurch das Eindringen in den Nukleus verhindert wird. Zur Aktivierung wird nun Tamoxifen oder 4-OHT hinzugegeben. Dieses bindet an den Östrogen-Rezeptor, verdrängt so Hsp90 und ermöglicht der CreER in den Nukleus einzudringen. Im konditionalen Allel von CD28 sind die Exone 2 und 3 von LoxP2-Stellen flankiert. Diese werden von der eindringenden CreER erkannt, herausgeschnitten und dadurch inaktiviert.

(Bearbeitet nach Cox et al. 2012, S. 297. Die Verwendung erfolgt mit freundlicher Genehmigung des Springer-Verlags.)

1.6 Beurteilung der Expression und Deletion von CD28

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, welche Auswirkungen die Deletion von CD28 in verschiedenen Phasen der EAE hat. Zu diesem Zweck wurde – wie im vorigen Abschnitt beschrieben – mit einem induzierbaren Knockout von CD28 gearbeitet. Diese Methode war im Institut für Multiple-Sklerose-Forschung (IMSF) bereits zu Beginn dieser Arbeit etabliert. Dennoch möchte ich im Folgenden kurz die wichtigsten Fakten zu Kinetik und Wirksamkeit zusammenstellen, sowie einen Überblick über bereits durchgeführte Experimente zu klinischen Auswirkungen der Deletion von CD28 geben.

1.6.1 Kinetik der Deletion von CD28

Die EAE wurde durch die Verwendung von MOG₃₅₋₅₅ in den schon erwähnten iCD28ko-Mäusen induziert. Nach Beginn der Behandlung mit Tamoxifen dauert es noch etwa zwei Tage bis die CD28-Expressionslevels der CD4⁺-Zellen zu sinken beginnen, bis sie schließlich nach vier Tagen deutlich reduziert sind (**Abbildung 1-4**).

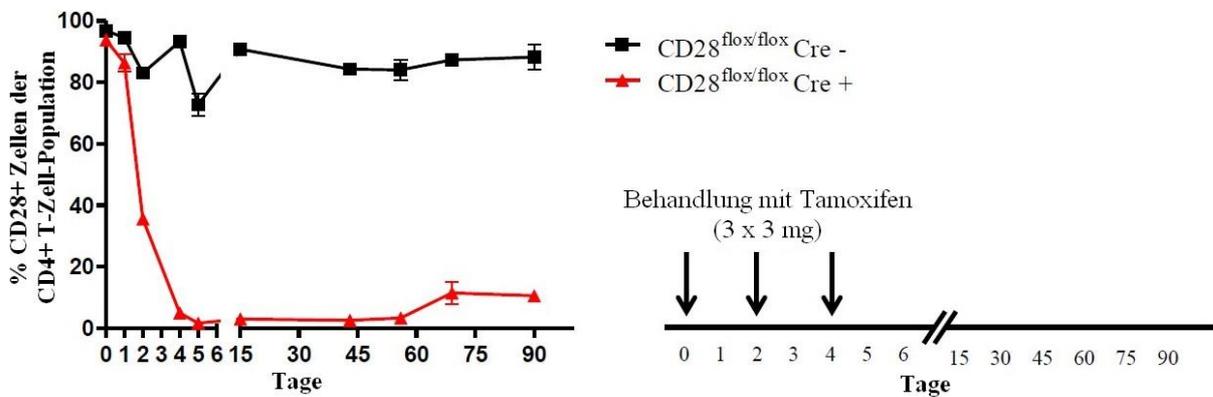


Abbildung 1-4: Kinetik der Deletion von CD28

Blut von zwei CD28^{flox/flox} Cre⁻ und CD28^{flox/flox} Cre⁺-Mäusen wurde auf den Anteil an CD28⁺-Zellen an der Gesamtheit der CD4⁺-Zellen untersucht. Vorgegangen war eine Behandlung mit drei Dosen Tamoxifen jeden zweiten Tag (Daten von Tanja Litke zur Verfügung gestellt).

Für die klinischen Versuche wurden Mäuse mit dem Genotyp CD28^{-/flox} benutzt, welche im Vergleich zu C57Bl/6J-Mäusen ein leicht verringertes CD28-Expressionslevel zeigen (Eckert 2014). Da Tamoxifen im Allgemeinen zu einer reduzierten Proliferation von Myelin-spezifischen autoreaktiven T-Zellen, einem milderem Krankheitsverlauf der EAE sowie einer verringerten Demyelinisierungsrate führt (Bebo et al. 2009), wurden in jedem Experiment CD28^{-/flox} Cre⁻-Mäuse als Negativkontrollen ebenfalls mit Tamoxifen behandelt. Bei diesen Mäusen hatte eine Behandlung mit Tamoxifen erwartungsgemäß keine Auswirkungen auf die Expressionslevels von CD28 (Eckert 2014).

Zusammengefasst zeigen diese Daten, dass das Modell des Tamoxifen-induzierbaren Knockouts von CD28 eine zeitlich verlässliche und nachhaltige Deletion von CD28 bewirkt und so für die Beurteilung der Rolle von CD28 in verschiedenen Phasen der EAE ein geeignetes Werkzeug darstellt.

1.6.2 Wirksamkeit der induzierbaren CD28-Deletion

Zur Beurteilung, ob die induzierbare Deletion von CD28 mit Hilfe des Cre-Rekombinase-Modells ebenso wirksam ist wie ein konventioneller Knockout von CD28, verglich Eckert (2014) CD28^{-/flox} Cre⁺-Mäuse mit CD28^{-/flox} Cre⁻-Mäusen. Dabei wurde die Behandlung mit

Tamoxifen vier Wochen vor der Immunisierung durchgeführt, sodass zum Zeitpunkt der Immunisierung Tamoxifen vollständig abgebaut war. Am dritten Tag nach der Immunisierung wurde eine einzelne Dosis Tamoxifen (3 mg) verabreicht, um die Deletion von CD28 sicherzustellen. In der Folge zeigte sich bei der Kontrollgruppe ein normaler Krankheitsverlauf mit Symptombeginn am Tag 12 nach Immunisierung (p. i.) mit einer Inzidenz von 100%. Die iCD28ko-Mäuse waren hingegen fast vollständig vor EAE geschützt. Lediglich eines der sechs Tiere entwickelte – deutlich verspätet – Symptome. Dies zeigt, dass das Modell der induzierbaren Deletion von CD28 ähnlich effizient ist wie die konventionelle CD28-Deletion, was auch in aktuellen Studien bestätigt wurde (Fröhlich et al. 2016).

1.6.3 Klinische Beurteilung der Rolle der Deletion von CD28

Im Folgenden wurden die Auswirkungen einer Deletion von CD28 nach Immunisierung, aber vor Beginn der klinischen Symptomatik der EAE untersucht. Dazu wurden wieder Cre⁺- mit Cre⁻-Mäusen als Kontrollgruppe verglichen. Diesen wurde beginnend am Tag 3 nach der Immunisierung, an jedem zweiten Tag insgesamt drei Dosen Tamoxifen schlundiert. Dabei zeigte sich in der Kontrollgruppe ein weitgehend normaler Krankheitsverlauf, wobei der Beginn der Symptomatik etwa am Tag 14 p. i. war. Die Cre⁺-Mäuse dagegen waren fast vollständig geschützt. Lediglich eine von acht Mäusen entwickelte – deutlich verzögert – EAE-Symptome (Eckert 2014).

Darüber hinaus wurde untersucht, welchen Effekt die Deletion von CD28 am Höhepunkt der klinischen Symptome einer EAE hat. Nach Immunisierung mit 50 µg MOG₃₅₋₅₅ wurden dazu Cre⁺- und Cre⁻-Mäuse beginnend am Tag 12 p. i. mit je drei Dosen Tamoxifen behandelt. In beiden Gruppen zeigten sich erwartungsgemäß eine ähnliche Inzidenz und ein vergleichbarer Krankheitsbeginn. Nach Deletion von CD28 bildeten sich bei den iCD28ko-Mäusen ab Tag 14 p. i. jedoch die Symptome zurück und die Krankheit verlief in der Folge deutlich milder. Die Tiere der Kontrollgruppe hingegen erholten sich nicht und zeigten einen typischen Krankheitsverlauf (Eckert 2014).

Zu Beginn dieser Arbeit wurde also die Charakterisierung der klinischen Deletion von CD28 zu unterschiedlichen Zeitpunkten bereits erfolgreich durchgeführt. Dabei zeigte sich eine bedeutsame Rolle der CD28-vermittelten Signaltransduktion sowohl kurz nach Immunisierung der untersuchten Tiere als auch in der Effektorphase der EAE.

1.7 Ziele der Arbeit

Die CD28-vermittelte Ko-Stimulation von T-Zellen stellt einen bedeutsamen Mechanismus in der Aktivierung naiver T-Zellen dar. Die Interaktion zwischen CD28 und seinen Liganden liefert das essentiell wichtige zweite, ko-stimulatorische Signal, welches in der Folge die

T-Zellen zur Proliferation und Produktion pro-inflammatorischer Zytokine anregt und die Überlebenswahrscheinlichkeit bereits aktivierter T-Zellen erhöht (Harding et al. 1992; Kerstan & Hünig 2004). Die Bedeutung der Ko-Stimulation in Bezug auf die Aktivierung des Immunsystems legt bereits nahe, dass CD28 eine große Rolle bei der Entstehung und Aufrechterhaltung autoimmuner Krankheitsprozesse spielt. Daher ist es nicht überraschend, dass CD28 in der Pathogenese der EAE als Tiermodell von MS eine entscheidende Rolle spielt (Oliveira-dos-Santos et al. 1999). Jedoch ist bis heute nicht vollständig geklärt, über welche Mechanismen die CD28-vermittelte Ko-Stimulation zur Entstehung und Aufrechterhaltung der EAE beiträgt. Gerade angesichts der Heterogenität von MS und dem Tiermodell, der EAE, erscheint die genauere Untersuchung der genannten Aspekte wünschenswert.

Die vorliegende Arbeit untersucht die Bedeutung ko-stimulatorischer Signale in verschiedenen Phasen der EAE. Dafür werden Mäuse benutzt, die dahingehend genetisch verändert sind, dass durch Behandlung mit Tamoxifen eine zeitlich festgelegte Deletion von CD28 induzierbar ist (Gogishvili et al. 2012). Auf diese Weise ist es möglich, in direktem Vergleich mit Kontrollgruppen die Relevanz der CD28-vermittelten Ko-Stimulation in verschiedenen Phasen der EAE zu untersuchen. Dabei wird für diese Arbeit die Deletion von CD28 einerseits nach Immunisierung, aber vor Krankheitsbeginn und andererseits am Höhepunkt der klinischen Symptomatik induziert.

Bei der frühen Deletion von CD28 soll mit Hilfe der Durchflusszytometrie untersucht werden, wie sich durch Hemmung der Ko-Stimulation das Expressionsmuster CD4⁺-T-Zellen im Hinblick auf Aktivierungsmarker, Zytokine und Proliferation verändert. Außerdem soll via qRT-PCR die Zytokinproduktion genauer untersucht werden. Dabei sollen auch Experimente durchgeführt werden, bei denen einzelnen Tieren gleichzeitig fluoreszenzmarkierte, MOG-spezifische Cre⁺- und Cre⁻-Zellen injiziert werden, um so eventuell vorhandene interindividuelle Unterschiede ausschließen zu können und ein interne Kontrollgruppe im gleichen Individuum zu haben. Die weitere Entwicklung dieser Zellen soll nach Immunisierung und Deletion von CD28 mittels Durchflusszytometrie in Bezug auf ihre Proliferation untersucht werden.

Bei der späten Deletion wird untersucht, welchen Effekt diese auf den klinischen Verlauf der EAE hat. Außerdem soll mittels Durchflusszytometrie untersucht werden, wie die Deletion von CD28 das Expressionsmuster von CD4⁺-T-Zellen in Bezug auf Aktivierung und Apoptose verändert und welche Auswirkungen sich auf regulatorische T-Zellen ergeben.

Ein weiteres Experiment beinhaltet den Transfer MOG-spezifischer T-Zellen in OT II-Mäuse, welche über keine MOG-spezifischen T-Zellen verfügen, um einschätzen zu können, ob die CD28-vermittelte Ko-Stimulation ausschließlich in den enzephalitogenen T-Lymphozyten für die Entwicklung klinischer Symptome essentiell ist.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Versuchstiere

Die verwendeten Mäuse wurden unter spezifisch pathogenfreien Bedingungen in einzelbelüfteten Käfigen gehalten. Klinische Experimente wurden ausschließlich an Tieren durchgeführt, die mindestens zehn Wochen alt waren. Der genetische Hintergrund aller eingesetzten Tiere ist C57Bl/6J. 2D2-Mäuse wurden aufgrund ihrer T-Zellen verwendet, welche spezifisch gegen MOG gerichtet sind, wie von Bettelli et al. (2003) beschrieben. Des Weiteren wurden RFP-exprimierende 2D2-Mäuse eingesetzt, welche aus den zuerst von Luche et al. (2007) beschriebenen RFP-exprimierenden Mäusen und den bereits erwähnten 2D2-Mäusen gekreuzt wurden. Außerdem wurden im Rahmen dieses Projektes Mäuse eingesetzt, bei denen ein konditionaler CD28-knockout möglich ist. Bei diesen Tieren ist die Deletion von CD28 durch Tamoxifen induzierbar (Feil et al. 1996; Gogishvili et al. 2012).

Darüber hinaus wurden CD45.1/2D2-Mäuse eingesetzt, also Kreuzungen aus 2D2-Mäusen und solchen, die den kongenen Marker CD45.1 exprimieren (Shen et al. 1985). In weiteren Versuchen wurde mit OT II-Mäusen gearbeitet (Barnden et al. 1998).

Alle Experimente wurden gemäß der Richtlinien des Tierschutzgesetzes und der Tierschutz-Versuchstierverordnung des Landes Niedersachsen durchgeführt (Tierversuchsantrag Nr. 33.9-42502-04-11/0411).

2.1.2 Agenzien für die Behandlung der Mäuse

Tabelle 2-1: Bei der Immunisierung verwendete Agenzien

Agens	Produzent
<i>M. tuberculosis</i> H37a	Difco Laboratories, Detroit, USA
Inkomplettes Freund-Adjuvans (IFA)	Difco Laboratories, Detroit, USA
Komplettes Freund-Adjuvans (CFA)	IFA in Verbindung mit 1mg/ml <i>M. tuberculosis</i>
MOG ₃₅₋₅₅	Charité Berlin, Institut für medizinische Immunologie, Berlin
Pertussistoxin (PTx)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Ketamine 10%	Medistar Arzneimitteltrieb GmbH, Ascheberg
Xylarium®	Ecuphar GmbH, Greifswald
Isotone Kochsalz-Lösung	Braun Melsungen AG, Melsungen
Tamoxifen	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Mazola Keimöl	Unilever Deutschland GmbH, Hamburg

2.1.3 Antikörper und Farbstoffe für die Durchflusszytometrie

Für die Durchflusszytometrie (FACS) wurden Antikörper verwendet, die mit PE, FITC, APC, APC/Cy7, PE/Cy7, PE/Cy5 oder AF647 markiert waren. Eine weitere eingesetzte Methode war der Einsatz von Biotin-Antikörpern und nachfolgend von Streptavidin-markierten Farbstoffen.

7-Aminoactinomycin D (7-AAD) wurde von der Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen, erworben und Carboxyfluorescein-Succinimidylester (CFSE) bei Life Technologies, Carlsbad, USA.

Tabelle 2-2: Verwendete Antikörper

Antikörper	Klon	Produzent
Anti-Mouse Annexin V	-	BioLegend, London, Vereinigtes Königreich
Anti-Mouse CD3	145-2C11	BioLegend, London, Vereinigtes Königreich
Anti-Mouse CD4 (APC/Cy7)	RM4-5	BioLegend, London, Vereinigtes Königreich
Anti-Mouse CD4 (PE/Cy5)	H129.19	BioLegend, London, Vereinigtes Königreich
Anti-Mouse CD8	53-6.7	BioLegend, London, Vereinigtes Königreich
Anti-Mouse CD25	7D4	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
Anti-Mouse CD44	IM7	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
Anti-Mouse CD45.1	A20	BioLegend, London, Vereinigtes Königreich
Anti-Mouse CD62L	MEL-14	BioLegend, London, Vereinigtes Königreich
Anti-Mouse CD69	H1.2F3	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
Anti-Mouse/Anti-Rat FoxP3	FJK-16s	eBiosciences, Frankfurt
Anti-Mouse IL-17	TC11-18H10	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
Anti-Mouse Interferon- γ	XMG1.2	BioLegend, London, Vereinigtes Königreich
Streptavidin PE, APC	-	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA

2.1.4 Puffer und Medien

Tabelle 2-3: Verwendete Medien und ihre Inhaltsstoffe

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	133,8 g DMEM Pulver + 37 g Natron + 10 l destilliertes Wasser
Eagles Hepes Medium (EH)	25 mM Hepes in DMEM
Restimulationsmedium	EH + 10% FCS
Präfixationsmedium	1x PBS + 2% PFA
Isolationsmedium	1x PBS + 2% FCS + 5% Rattenserum
T-Zell-Medium	1x PBS + 2% FCS

Gibco DMEM Pulver	Life Technologies, Carlsbad, USA
Natron	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Gibco 1M Hepes	Life Technologies, Carlsbad, USA
Fetales Kälberserum (FCS)	Biochrom AG, Berlin
10x Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) ¹	1,37M NaCl + 27mM KCl + 0,1M Na ₂ HPO ₄ in H ₂ O (pH 7,4)
1x PBS	10x PBS in destilliertem Wasser verdünnt
Paraformaldehyd (PFA)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Rattenserum	Stemcell Technologies, Newark, USA
Mouse T cell enrichment kit	Stemcell Technologies, Newark, USA
Mouse B cell isolation kit	Stemcell Technologies, Newark, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Erythrolysepuffer	0,15M NH ₄ Cl + 1mM KHCO ₃ + 0,1mM Na ₂ in EDTA (pH 7,2 - 7,4)
FACS Puffer	0,5% Bovines Serumalbumin (BSA) + 0,05% NaN ₃ in 1x PBS
Anti-Mouse/Anti-Rat FoxP3 Kit	eBiosciences, Frankfurt
1x Annexin V-Puffer	10 mM Hepes in NaOH (pH 7,4) + 140 mM NaCl + 2,5 mM CaCl ₂ in destilliertem Wasser
Percoll™-Verdünnungspuffer	0,02 g BSA + 0,2 g Glucose + 1x PBS ad 20 g
Rückenmark-Resuspensionpuffer	0,02 g BSA + 0,2 g Glucose + DNase I (10 mg/ml) 200 µl + 1x PBS ad 20 g
Percoll™	GE Healthcare, Chalfont St Giles, Vereinig- tes Königreich
Trypanblau (0,4%)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
BD Cytotfix/Cytoperm	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
BD Perm/Wash Buffer	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
PMA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Ionomycin	Merck Millipore, Merck KGaA, Darmstadt

¹ Soweit nicht anders angegeben wurden alle Inhaltsstoffe von Pufferlösungen bzw. Medien bei der Carl Roth GmbH, Karlsruhe, erworben.

Brefeldin A	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
QIAzol Lysis Reagent	Qiagen N.V., Venlo, Niederlande
RNeasy™ Mini Kit	Qiagen N.V., Venlo, Niederlande
Chloroform	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Isopropanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Glykogen	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Ethanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit	Thermo Scientific, Waltham, USA
qPCR MasterMix	Eurogentec Deutschland GmbH, Köln
Primer und Sonden	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
RNase-freies Wasser	Life Technologies, Carlsbad, USA

Tabelle 2-4: Verwendete Primer und Sonden

Gen	Primer	Sequenz (5' → 3')
Mouse HPRT	Vorwärts	TGC TCG AGA TGT CAT GAA GG
	Rückwärts	TAT GTC CCC CGT TGA CTG AT
	Sonde	Fam-ATC ACA TTG TGG CCC TCT GT-Tamra
Mouse Interferon- γ	Vorwärts	TCA AGT GGC ATA GAT GTG GAA GAA
	Rückwärts	TGG CTC TGC AGG ATT TTC ATG
	Sonde	Fam-TCA CCA TCC TTT TGC CAG TTC CTC CAG-Tamra
Mouse IL-17A	Vorwärts	ACT TTC AGG GTC GAG AAG ATG CT
	Rückwärts	TTC TGA ATC TGC CTC TGA ATC CAC
	Sonde	Fam-TGG GTG TGG GCT GCA CCT GC-Tamra

2.1.5 Verbrauchsgüter und Laboraustattung

Mikroreaktionsgefäße (0,2 ml; 1,5 ml; 2 ml)	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht
Falcon-Röhrchen (15 ml; 50 ml)	Greiner Bio-One AG, Kremsmünster, Österreich
Röhrchen für die T-Zell-Isolation (13 ml)	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht
Pipettenspitzen (0,01 ml; 0,2 ml; 1 ml)	StarLab GmbH, Hamburg
Filterspitzen (0,01 ml; 0,2 ml; 1 ml)	StarLab GmbH, Hamburg
Zellkulturplatten (6-well; 24-well; 96-well)	Thermo Scientific, Waltham, USA
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging Company, Chicago, USA
Einmal-Handschuhe	Kimberly-Clark Corporation, Irving, USA
Petrischalen	Greiner Bio-One AG, Kremsmünster, Österreich
Spritzen (5 ml; 10 ml)	Braun Melsungen AG, Melsungen
Insulinspritzen (1 ml)	BD Medical, Franklin Lakes, USA
Kanülen (20 G; 24 G; 26 G; 27 G)	Braun Melsungen AG, Melsungen
FACS-Röhrchen (mit & ohne Filter)	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
Glaspipetten (2 ml; 5 ml; 10 ml; 20 ml)	HBG Henneberg-Sander GmbH, Giessen-Lützellinden
Neubauer-Zählkammer	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim
Tuberkulin-Spritzen (1 ml; 2 ml)	Hartenstein GmbH, Würzburg
Pipetten (0,5-10 µl; 10-200 µl; 100-1000 µl)	Eppendorf AG, Hamburg
Pipetus	Hirschmann GmbH & Co. KG, Eberstadt
“Big Easy” EasySep Magnet	Stemcell Technologies, Newark, USA
Siebe (Porengröße 40 µm)	Werkstatt der Universitätsmedizin Göttingen

2.1.6 Gerätschaften

Tabelle 2-5: Benutzte Gerätschaften

Markenname	Beschreibung	Hersteller
FACSAria	Durchflusszytometer und Cell sorter	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
FACSCalibur	Durchflusszytometer	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
	Gefriergerät (-20 °C)	Liebherr AG, Bulle, Schweiz
Herafreeze HFU 586 Top	Gefriergerät (-80 °C)	Heraeus Holding GmbH, Hanau
HeraCell240	Inkubator	Heraeus Holding GmbH, Hanau
	Kühlgerät (4 °C)	Liebherr AG, Bulle, Schweiz
Axioskop 40	Mikroskop	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Herasafe HS18	Sterilbank	Heraeus Holding GmbH, Hanau
StepOnePlus	Thermocycler	Life Technologies, Carlsbad, USA
Lauda A100	Wasserbad	Lauda GmbH, Lauda-Königshofen
Multifuge 1 S-R	Zentrifuge	Heraeus Holding GmbH, Hanau

2.1.7 Software

Microsoft Office 2013	Microsoft Corporation, Redmond, USA
FlowJo, Version 10.0.5	Tree Star Inc., Ashland, USA
StepOne, Version 2.3	Life Technologies, Carlsbad, USA
GraphPad Prism 5	GraphPad Software Inc., San Diego, USA
BD FACSDiva	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
BD CellQuestPro	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA

2.2 Methoden

2.2.1 EAE-Induzierung

Um bei den Mäusen eine experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis zu induzieren, wurde ihnen unter Narkose je 50 µl einer Emulsion bestehend aus 50 µg MOG₃₅₋₅₅ in PBS gelöst und 50 µg CFA subkutan beidseits der Schwanzwurzel injiziert. CFA wurde hergestellt durch Hinzufügen von Mykobakterium tuberculosis (Stamm H37Ra) zu IFA in einer Konzentration von 1 mg/ml. Als Narkotikum wurde eine Lösung mit 8% Ketamin und 4% Xylariem auf Basis einer isotonen Kochsalzlösung verwendet. Dabei wurde jede Maus mit 90 µl Narkoselösung pro 10 g Körpergewicht anästhesiert. Außerdem wurden den Tieren am gleichen Tag und zwei Tage später jeweils 200 ng PTx intraperitoneal injiziert.

2.2.2 Klinische Beurteilung

Der Verlauf der EAE wurde dokumentiert, indem die Tiere täglich gewogen und gescort wurden. Grundlage für die klinische Beurteilung bildete eine Skala von 0 - 10 mit den folgenden Entsprechungen:

0 =	gesund
1 =	verringertes Schwanztonus
2 =	schlaffe Schwanzlähmung
3 =	fehlende Ausgleichsbewegungen beim Gehen
4 =	Gangataxie
5 =	geringgradige Lähmung eines Hinterbeines
6 =	vollständige Lähmung eines Hinterbeines oder mittelgradige Lähmung beider Hinterbeine
<hr/>	
7 =	vollständige Lähmung beider Hinterbeine
8 =	vollständige Lähmung beider Hinterbeine und beginnende Lähmung der Vorderbeine
9 =	moribund
10 =	tot

Ab einem Score von 7 wurden die Tiere aus ethischen Gründen aus dem Versuch entnommen und getötet.

2.2.3 Deletion von CD28

Den Mäusen wurde an drei Tagen mit jeweils einem Tag Pause je 3 mg Tamoxifen verabreicht. Eine Dosis Tamoxifen wurde in 150 μ l Keimöl gelöst. Den Tieren wurde das Tamoxifen mittels einer Sonde schlundiert.

2.2.4 Organentnahme und Herstellung einer Einzelzellsuspension

Nach Tötung der Mäuse mittels CO₂ wurden ihnen Lymphknoten und Milz entnommen. Dabei wurden inguinale und paraaortale Lymphknoten als drainierende Lymphknoten klassifiziert, während axilläre, mesenteriale und zervikale Lymphknoten als nicht-drainierend gezählt wurden. Nach Entnahme wurden die Organe in EH-Medium gegeben und durch Metallsiebe (Porengröße 40 μ m) gepresst. Die in den Milzproben enthaltenen Erythrozyten wurden durch Inkubation mit 1 ml Erythrolysepuffer für fünf Minuten auf Eis lysiert. Die so erhaltene Zellsuspension wurde zweimal mit EH-Medium gewaschen (1200 U/min für acht Minuten bei 4 °C). Um die Zellen zählen zu können, wurden 10 μ l der Zellsuspension mit Trypanblau im Verhältnis 1:10 verdünnt und mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer unter dem Mikroskop gezählt.

Wenn darüber hinaus auch die Leukozyten aus dem Rückenmark der betreffenden Mäuse untersucht werden sollten, so erfolgte dies mit Hilfe einer Dichtegradientenzentrifugation, einem sog. Percoll-Gradienten. Dafür wurde das Rückenmark herauspräpariert, mit einem Spritzenstempel zerkleinert und schließlich in 20 ml Rückenmark-Resuspensionspuffer gelöst. Die so erhaltene Rückenmark-Suspension wurde für zehn Minuten bei 1600 U/min bei 4 °C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 6 ml einer Lösung mit 30% Percoll (in Percoll-Verdünnungspuffer) gelöst. Anschließend wurde der Percoll-Gradient hergestellt. Dafür wurden 4 ml einer 45% Percoll-Lösung in ein Falcon-Röhrchen (15 ml) pipettiert, und es wurden 2 ml einer 70% Percoll-Lösung unterlegt. Auf den so entstandenen Gradienten wurde vorsichtig die Rückenmark-Suspension (etwa 8 ml) aufgetragen. Anschließend wurden die Proben für 20 Minuten bei 2300 U/min bei 4 °C zentrifugiert. Dabei wurden Beschleunigung und Bremse möglichst niedrig eingestellt. Ziel dieser Zentrifugation ist, dass sich das Myelin oben auf dem Gradienten absetzt, während sich die Leukozyten in den beiden Interphasen sammeln. Letztere wurden nun mit einer 2-ml-Spritze abgenommen und in ein Falcon-Röhrchen (50 ml) überführt. Dieses wurde mit FACS-Puffer aufgefüllt und zentrifugiert (1600 U/min für zehn Minuten bei 4 °C). Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 1 ml PBS resuspendiert und mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer unter dem Mikroskop die Zellzahl bestimmt.

2.2.5 T-Zell-Isolation und Injektion

T-Zellen wurden aus einer Einzelzellsuspension unter Anwendung des *EasySep™ Mouse T cell enrichment Kit* isoliert. Das zugrundeliegende Prinzip besteht in einer negativen Selekti-

on, d.h. dass Nicht-T-Zellen mittels eines biotinylierten Antikörpers und magnetischen Nanopartikels markiert wurden und so – unter Zuhilfenahme des „BigEasy“ Magneten – von CD3⁺ T-Zellen separiert werden konnten.

Dafür wurden 10⁸ Zellen/ml in einer Lösung bestehend aus PBS mit 2% FCS und 5% Rattenserum resuspendiert. Nach Zugabe von 50 µl *T cell enrichment cocktail* pro ml Zellsuspension wurde die Suspension für 15 Minuten bei 4 °C inkubiert. Danach wurden 100 µl *Biotin selection cocktail* pro ml Zellsuspension hinzugegeben, gefolgt von weiteren 15 Minuten Inkubationszeit bei 4 °C. Als letztes wurden die magnetischen Nanopartikel in einer Konzentration von 75 µl pro ml Zellsuspension zugegeben. Nach fünf Minuten Inkubationszeit bei 4 °C wurde die Probe mit PBS mit 2% FCS auf 5 ml aufgefüllt und für fünf Minuten in einen EasySepTM-Magneten gestellt. Auf diese Weise wurden die markierten Nicht-T-Zellen von den gewünschten T-Zellen getrennt, welche sodann in ein neues Röhrchen überführt werden konnten.

Daran anschließend wurde die Reinheit der isolierten T-Zellen mittels FACS-Analyse überprüft, wobei ein Anteil von mindestens 90% T-Zellen als zufriedenstellend gewertet wurde. Bei den Transfer-Experimenten wurden im Anschluss je Tier 15 · 10⁶ der isolierten T-Lymphozyten in die Schwanzvenen injiziert.

2.2.6 B-Zell-Isolation und Injektion

B-Zellen wurden – analog zu T-Zellen – aus einer Einzelzellsuspension unter Benutzung des *EasySepTM Mouse B cell isolation Kit* isoliert. Dieses arbeitet ebenfalls mit einer negativen Selektion. Die Zellen, welche nicht CD19⁺ sind, werden gebunden und so von den in einer Probe enthaltenen B-Zellen getrennt.

Hierfür wurden 10⁸ Zellen/ml in PBS mit 2% FCS und 5% Rattenserum resuspendiert und 50 µl *Mouse B cell isolation Cocktail* pro ml Zellsuspension hinzugegeben. Nach einer Inkubation für zehn Minuten bei Raumtemperatur wurden nun die magnetischen Nanopartikel hinzugegeben (75 µl/ml Zellsuspension). Nach weiteren drei Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Probe durch Hinzugabe von PBS mit 2% FCS auf 5 ml aufgefüllt. Schließlich wurde die Probe für drei Minuten in einen EasySepTM Magneten gestellt, sodass die nun magnetischen Nicht-B-Zellen beim Abschütten in ein neues Röhrchen zurückgehalten wurden.

Auch im Anschluss an die B-Zell-Isolation erfolgte via FACS-Analyse eine Reinheitskontrolle, bei der für ein zufriedenstellendes Ergebnis ein Mindestanteil an B-Zellen von 90% vorausgesetzt wurde. Bei dem Transfer-Experiment wurde im Anschluss je Tier 10 · 10⁶ der isolierten B-Zellen injiziert.

2.2.7 CFSE-Färbung

Die Markierung der gereinigten T-Zellen mit CFSE ermöglicht die Quantifizierung der Proliferation von MOG-spezifischen T-Zellen *ex vivo*. Dafür wurden die Zellen nach der Isolation mit PBS gewaschen und die Konzentration auf 10^6 Zellen pro ml PBS eingestellt. Als nächstes wurde pro ml Zellsuspension $0,025 \mu\text{l}$ CFSE (in einer Konzentration von 5 mM in DMSO gelöst) hinzugegeben und die Suspension daraufhin umgehend für zehn Minuten in einem Wasserbad bei 37°C inkubiert. Um die Reaktion abzustoppen, wurde nach Ablauf der zehn Minuten $20 \mu\text{l}$ FCS pro ml Zellsuspension zugegeben, gefolgt von einem Waschschrift mit einer Lösung bestehend aus PBS mit 2% FCS (1200 U/min für acht Minuten bei 4°C). In Vorbereitung auf die intravenöse Injektion der CFSE-markierten T-Zellen wurden diese in PBS gelöst und auf ein Injektionsvolumen von maximal $200 \mu\text{l}$ pro Empfängermaus eingestellt. Bei der FACS-Analyse *ex vivo* macht man sich zunutze, dass die Helligkeit des CFSE-Signals mit jeder Zellteilung um die Hälfte abnimmt, was eine genaue Analyse der Proliferation speziell der injizierten T-Zellen ermöglicht.

2.2.8 Färben der Zellen

Für die Durchflusszytometrie wurde eine Oberflächenfärbung und – je nach Versuch – auch eine intrazelluläre Färbung durchgeführt. In diesen Fällen erfolgte vor der Oberflächenfärbung eine Restimulation der Zellen. Dafür wurden jeweils 10^6 Zellen in 1 ml EH-Medium mit 2% FCS in einer 24-well-Zellkulturplatte resuspendiert. Zu dem Zellsubstrat wurden 50 ng PMA und 500 ng Ionomycin hinzugegeben und die Zellkulturplatte für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Danach wurde $5 \mu\text{g}$ Brefeldin A hinzugegeben und die Proben erneut bei 37°C inkubiert, diesmal für drei Stunden. Anschließend erfolgte die Oberflächenfärbung.

2.2.8.1 Oberflächenfärbung

Für eine Oberflächenfärbung der Zellen für die Durchflusszytometrie wurden pro Probe $0,5 \cdot 10^6$ Zellen in ein FACS-Röhrchen gegeben und mit 3 ml FACS-Puffer gewaschen (1200 U/min für acht Minuten bei 4°C). Anschließend wurde der Überstand verworfen und das Pellet in $100 \mu\text{l}$ einer Lösung, bestehend aus markierten Antikörpern in FACS-Puffer bei einer optimalen Verdünnung, resuspendiert. Danach wurde das FACS-Röhrchen mit der Zellsuspension für 15 Minuten bei 4°C inkubiert. Als nächstes wurden 3 ml FACS-Puffer hinzugefügt und es erfolgte ein weiterer Waschschrift (1200 U/min für acht Minuten bei 4°C). Zur Durchführung der Durchflusszytometrie wurde das Pellet in $250 \mu\text{l}$ FACS-Puffer resuspendiert.

2.2.8.2 Intrazelluläre Färbung - Zytokine

Nach Abschluss der Oberflächenfärbung erfolgte bei Zellen, die RFP-markiert waren, eine sog. Präfixation. Dafür wurden die Proben mit 150 µl PBS mit 2% PFA für fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend zweimal mit 3 ml FACS-Puffer gewaschen (je 1200 U/min für acht Minuten bei 4 °C).

Vor Beginn der eigentlichen Intrazellulärfärbung wurden die Zellen fixiert und permeabilisiert. Nach Resuspension des Pellets in 250 µl Cytofix/Cytoperm wurden die Proben für 20 Minuten bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden 1 ml *Perm/Wash Buffer* hinzugefügt und die Proben zweimal gewaschen (je 1200 U/min für acht Minuten bei 4 °C). Danach wurde das Pellet in 50 µl einer Lösung, bestehend aus markierten Antikörpern in *Perm/Wash Buffer* bei einer optimalen Verdünnung, resuspendiert und für 30 Minuten bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Darauf folgend wurden die Proben zweimal mit je 1 ml *Perm/Wash Buffer* gewaschen. Dann wurden die Pellets zur Durchführung der Durchflusszytometrie in 250 µl FACS-Puffer resuspendiert.

2.2.8.3 Intrazelluläre Färbung – FoxP3

Nach Abschluss der Oberflächenfärbung erfolgte die FoxP3-Färbung mit Hilfe des *Anti-Mouse/Anti-Rat FoxP3 Kit*, beginnend mit der Fixation und Permeabilisation mit 400 µl *Fix/Perm Buffer* durch Inkubation für 30 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Zellen einmal mit 1 ml FACS-Puffer und zweimal mit 1 ml Permeabilisationspuffer (FoxP3 Perm) gewaschen (je 1200 U/min für acht Minuten bei 4 °C). Als nächstes wurde das Pellet in 100 µl Permeabilisationspuffer mit 2% Rattenserum resuspendiert und für 15 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Bevor die Proben erneut inkubiert wurden (für 30 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln), wurde nun 1 µl des markierten FoxP3-Antikörpers gelöst in 100 µl Permeabilisationspuffer hinzugegeben. Schließlich wurden die Zellen zweimal mit je 2 ml Permeabilisationspuffer gewaschen (je 1200 U/min für acht Minuten bei 4 °C) und für die Durchführung der Durchflusszytometrie in 250 µl FACS-Puffer aufgenommen.

2.2.8.4 Apoptosefärbung

Vor Durchführung der Apoptosefärbung mussten zuerst alle anderen Färbungen (intra- & extrazellulär) abgeschlossen werden. Im Anschluss daran wurden die Proben mit 2 ml FACS-Puffer gewaschen (1200 U/min für acht Minuten bei 4 °C). Als nächstes wurden 100 µl Annexin V-Puffer mit 1 µl des markierten Annexin V-Antikörpers hinzugegeben. Nach einer Inkubation der Proben für 15 Minuten bei 4 °C wurde jeweils 0,5 µl 7-AAD hinzugegeben. Im Anschluss daran wurden die Proben in FACS-Röhrchen mit Filtern überführt und umgehend gemessen.

2.2.9 Sortieren der Zellen

Das Sortieren von Zellen wurde durchgeführt um CD4⁺-RFP⁺-Zellen aus Proben herausfiltern zu können. Dafür wurden die Proben – ausgehend von einer Einzelzellsuspension – in etwa 1 ml EH-Medium mit EDTA (2mM) suspendiert. Für das Sortieren wurde der *FACSAria™ cell sorter* benutzt (Reinheit >95%). Die auf diese Weise sortierten Zellen wurden in 2 ml EH-Medium aufgefangen und bei 1200 U/min für acht Minuten bei 4 °C herunterzentrifugiert. Das Pellet wurde in 25 µl PBS resuspendiert. Anschließend wurden 350 µl *QLAzol Lysis Reagent* hinzugegeben und die Probe mit den sortierten Zellen in einem Mikroreaktionsgefäß bei -80 °C eingefroren.

2.2.10 RNA-Isolation

Zur Extraktion der RNA aus den sortierten Zellen wurde das *RNeasy™ Mini Kit* verwendet. In einem ersten Schritt wurde dafür zu den Proben mit den sortierten Zellen – in *QLAzol Lysis Reagent* gelöst – 70µl Chloroform hinzugegeben. Nach einer 15-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Proben bei 10.000 U/min für 15 Minuten zentrifugiert. Dadurch trennte sich die Probe in drei Phasen – die oberste, wässrige Phase enthielt die RNA, die Interphase die DNA, während sich Proteine und Lipide in der organischen Phase sammelten. Die wässrige Phase wurde nun in ein neues Gefäß überführt und 175 µl Isoopropanol und 1 µl Glykogen hinzugegeben. Anschließend wurden die Proben über Nacht bei -20 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Proben nach dem Auftauen bei 10.000 U/min für zehn Minuten bei 4 °C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Als nächstes wurden 350 µl 70%iges Ethanol hinzugegeben und die Probe bei 6250 U/min für fünf Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Im Anschluss wurde der Überstand verworfen und das Pellet bei Raumtemperatur getrocknet. Schließlich wurde das Pellet in 12 µl RNase-freiem Wasser resuspendiert.

2.2.11 Reverse Transkription

Im Anschluss an die Extraktion der RNA wurde diese mit Hilfe des *RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit* in cDNA transkribiert. Dafür wurden zu der Probe 1 µl Primer hinzugegeben und diese im Anschluss bei 65 °C für fünf Minuten inkubiert. Danach wurden pro Probe je 4 µl 5x *Reaction Buffer*, 1 µl *RiboLock RNase Inhibitor*, 2 µl 10 mM dNTP Mix und 1 µl *RevertAid M-MuLV RT* hinzugegeben. Anschließend erfolgte im Thermocycler folgendes Protokoll: fünf Minuten bei 25 °C → 60 Minuten bei 42 °C → fünf Minuten bei 70 °C. Dadurch wurde die cDNA-Synthese abgeschlossen und die Proben konnten bei -20 °C eingefroren werden.

2.2.12 Quantitative Real-Time Polymerase-Kettenreaktion

Die Real Time-PCR wurde mit FAM/TAMRA-markierten TaqMan-Sonden durchgeführt. Dabei ist als Reporter 6-Carboxyfluoreszein-Phosphoramidit (=FAM) kovalent an das 5'-Ende gebunden und als Akzeptor wird Tetramethylrhodamin (=TAMRA) eingesetzt, welches an das 3'-Ende gebunden ist. Die aliquotierten cDNA-Proben wurden mit Vor- und Rückwärtsprimern der zu bestimmenden Gene und 1x qPCR MasterMix gemischt, sodass sich pro Probe ein Gesamtvolumen von 25 µl ergab. Jede Untersuchung wurde in Triplets in einem *StepOnePlus Real-Time PCR System* durchgeführt. Hierbei wurde folgendes Protokoll durchgeführt: einmalig 50 °C für zwei Minuten und 95 °C für zehn Minuten und anschließend für insgesamt 40 Zyklen jeweils eine Denaturierungsphase (95 °C) für 15 Sekunden, sowie eine Primerhybridisierungs- und Elongationsphase (60 °C) für 60 Sekunden.

Die unterschiedlichen Expressionslevels wurden anschließend mit Hilfe der Expression von HPRT als *Housekeeping gene* normiert. Die Primärdaten wurden mit der StepOnePlus-Software ausgewertet. Die genauen Details zu den verwendeten Primern und Sonden finden sich in **Tabelle 2-4** auf Seite 26.

2.2.13 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit GraphPad Prism. Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardfehler dargestellt. Für die Beurteilung, ob ein Unterschied signifikant ist oder nicht, wurde in der Regel ein ungepaarter t-Test, bei den Kurven zum klinischen Verlauf ein Mann-Whitney-U-Test durchgeführt. Dabei wurden die folgenden Signifikanzniveaus verwendet: $p > 0,05 \rightarrow$ nicht signifikant; $p \leq 0,05 \rightarrow *$; $p \leq 0,01 \rightarrow **$; $p \leq 0,005 \rightarrow ***$

3 Ergebnisse

3.1 Deletion von CD28 vor Symptombeginn

Als erstes wurde der Effekt einer Deletion von CD28 vor dem Auftreten klinischer EAE-Symptome, jedoch nach Immunisierung untersucht. Durch vorherige Experimente war bereits bekannt, dass die Deletion von CD28 zu diesem Zeitpunkt zu einem deutlich milderen klinischen Verlauf führt. Daher war von besonderem Interesse, den dafür zugrundeliegenden Mechanismus zu untersuchen, also welchen Effekt die Deletion von CD28 in dieser initialen Phase auf die Aktivierung von CD4⁺-T-Zellen hat. Dafür wurden die Expression von Aktivierungsmarkern, die Produktion von Zytokinen, sowie die Proliferation der T-Lymphozyten analysiert. Um dies untersuchen zu können, wurden C57Bl/6J-Mäusen T-Lymphozyten injiziert, die aus 2D2-Mäusen isoliert wurden. Diese transferierten Lymphozyten zeichnen sich dadurch aus, dass sie spezifisch gegen MOG gerichtet sind. Jeder Maus wurden dabei entweder Cre⁻ oder Cre⁺-T-Lymphozyten injiziert, welche RFP- oder CD45.1-markiert waren, um eine Unterscheidung zwischen körpereigenen und –fremden Zellen gewährleisten zu können. Zur Beurteilung der Proliferation wurden Cre⁻ und Cre⁺-T-Zellen gleichzeitig in die Mäuse injiziert. Auf diese Weise kann die Proliferation MOG-spezifischer T-Lymphozyten in einem Individuum beurteilt werden. Diese werden durch die Immunisierung zur Proliferation angeregt und können schließlich die Demyelinisierung – und damit die klinische Symptomatik – vermitteln.

Am Tag 3 nach Beginn der Immunisierung wurde mit der Behandlung mit Tamoxifen begonnen, welche aus drei Dosen bestand. Bezugnehmend auf Absatz 1.6 ist daher davon auszugehen, dass die Expression von CD28 am Tag 5 p. i. abzunehmen beginnt und schließlich am Tag 7 p. i. deutlich reduziert ist (vgl. **Abbildung 1-4**). Am Tag 6 und am Tag 8 p. i. wurden Zellen aus der Milz, sowie aus drainierenden und nicht-drainierenden Lymphknoten isoliert und mittels Durchflusszytometrie auf ihre Expressionsmuster in Bezug auf frühe und späte Aktivierungsmarker, Marker für naive T-Zellen, Zytokine, sowie das Proliferationsverhalten hin untersucht (**Abbildung 3-1**).

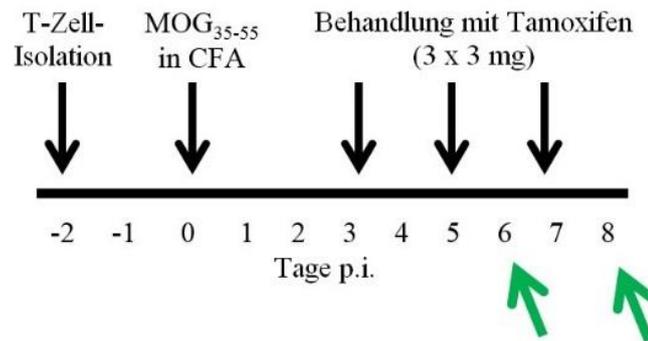


Abbildung 3-1: Schema der Versuche zur Beurteilung der Deletion von CD28 vor Symptombeginn

Zwei Tage vor Beginn der Immunisierung der Mäuse mit MOG₃₅₋₅₅ wurde der T-Zell-Transfer durchgeführt. Am Tag 3, 5 und ggf. 7 p. i. wurde den Mäusen je 3 mg Tamoxifen verabreicht. Die Aufbereitung der Zellen erfolgte am Tag 6 und 8 p. i..

3.1.1 Frühe Aktivierungsmarker auf T-Zellen

Um die Frage zu untersuchen, welchen Effekt die Deletion von CD28 vor Symptombeginn auf die Expression von frühen Aktivierungsmarkern in den Effektor-T-Zellen hat, wurde die Expression von CD25 und CD69 untersucht. Insbesondere CD69 ist bekannt dafür, einer der frühesten Aktivierungsmarker zu sein (Testi et al. 1989b). Dabei wurde einerseits die Gesamtheit aller CD4⁺-Lymphozyten der Mäuse betrachtet, aber auch der Effekt der CD28-Deletion auf die injizierten (= RFP-markierten), MOG-spezifischen T-Zellen im Speziellen quantifiziert. Dabei zeigten sich in Milz, dLN und ndLN am Tag 6 p. i. sowohl in Bezug auf die Expression von CD25 als auch auf die Expression von CD69 ähnliche Resultate in der Kontrollgruppe (Cre⁻) und in den Cre⁺-T-Zellen. Bei Betrachtung der injizierten Zellen in den drainierenden Lymphknoten fiel auf, dass hier – in beiden Kohorten – der Anteil der CD69⁺ T-Zellen erhöht war (**Abbildung 3-2**).

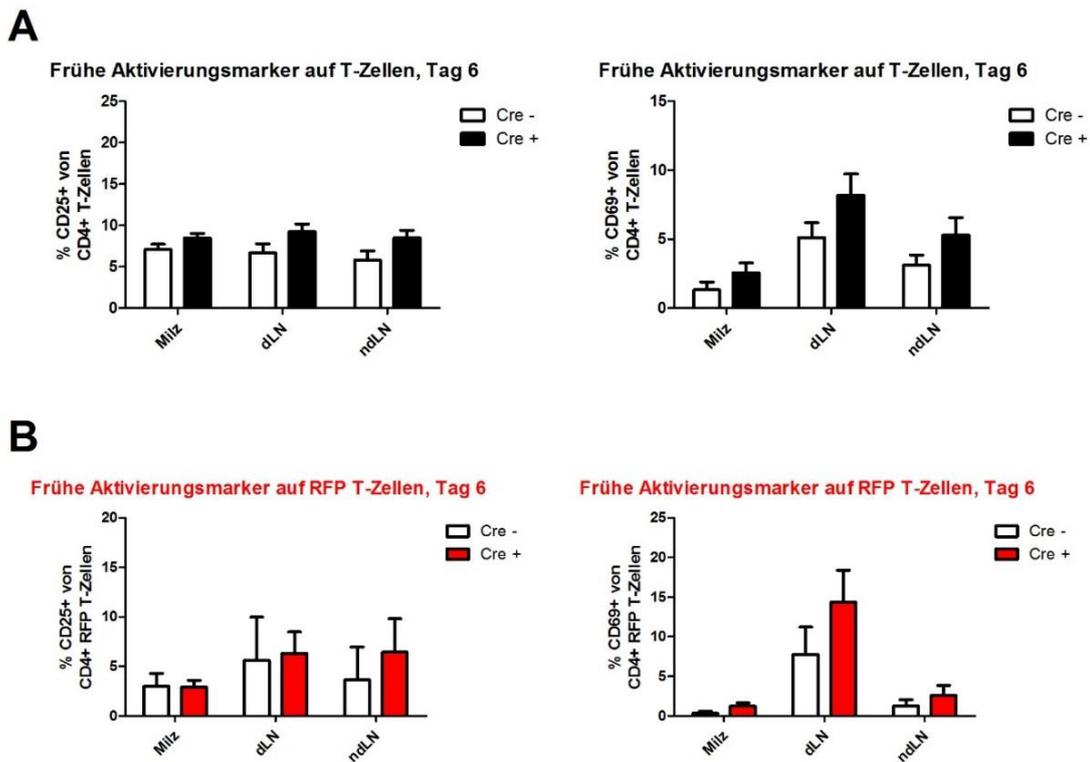


Abbildung 3-2: Effekte der Deletion von CD28 vor Symptombeginn auf frühe Aktivierungsmarker, Tag 6

MOG-spezifische T-Zellen aus Cre⁺- und Cre⁻-Mäusen wurden isoliert und in C57Bl/6J-Mäuse injiziert. Diese wurden mit je 50 µg MOG₃₅₋₅₅ immunisiert und in der Folge ab dem dritten Tag jeden zweiten Tag mit je 3 mg Tamoxifen behandelt. Am Tag 6 wurden Zellen aus Milz, dLN und ndLN isoliert und mittels FACS hinsichtlich der Expression von CD25 und CD69 analysiert (A). Außerdem wurden die injizierten Zellen isoliert analysiert (B). Die Ergebnisse sind als Mittelwert ± Standardfehler dargestellt. Für die statistische Auswertung wurde ein ungepaarter t-Test durchgeführt. Es sind ausschließlich signifikante Unterschiede mit Sternchen markiert. $p \leq 0,05 \rightarrow *$; $p \leq 0,01 \rightarrow **$; $p \leq 0,005 \rightarrow ***$.

(A): $n = 4 - 7$, (B): $n = 3 - 6$

Die Analyse der Zellen am Tag 8 ergab eine vergleichbare Situation in Bezug auf die Analyse der Gesamtheit aller CD4⁺-T-Zellen. Die Analyse der injizierten, MOG-spezifischen T-Zellen hingegen liefert einen ersten Hinweis auf unterschiedliche Aktivierungsmuster, je nachdem, ob CD28 vorhanden ist oder nicht. Ein signifikant größerer Anteil von den aus dLN isolierten T-Zellen der Kontrollgruppe exprimierte CD25 (**Abbildung 3-3**).

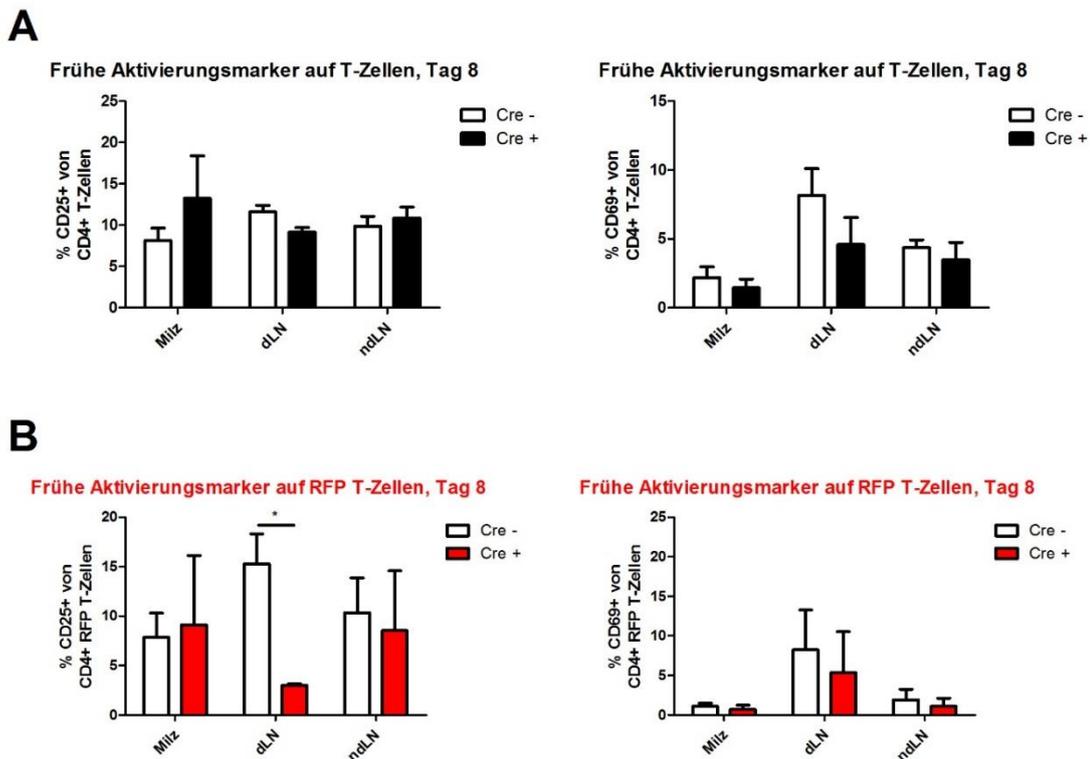


Abbildung 3-3: Effekte der Deletion von CD28 vor Symptombeginn auf frühe Aktivierungsmarker, Tag 8

MOG-spezifische T-Zellen aus Cre⁺- und Cre⁻-Mäusen wurden isoliert und in C57Bl/6J-Mäuse injiziert. Diese wurden mit je 50 µg MOG₃₅₋₅₅ immunisiert und in der Folge ab dem dritten Tag jeden zweiten Tag mit je 3 mg Tamoxifen behandelt. Am Tag 8 wurden Zellen aus Milz, dLN und ndLN isoliert und mittels FACS hinsichtlich der Expression von CD25 und CD69 analysiert (A). Außerdem wurden die injizierten Zellen isoliert analysiert (B). Die Ergebnisse sind als Mittelwert ± Standardfehler dargestellt. Für die statistische Auswertung wurde ein ungepaarter t-Test durchgeführt. Es sind ausschließlich signifikante Unterschiede mit Sternchen markiert. $p \leq 0,05 \rightarrow *$; $p \leq 0,01 \rightarrow **$; $p \leq 0,005 \rightarrow ***$.

(A): $n = 5 - 8$, (B): $n = 3 - 6$

3.1.2 Späte Aktivierungsmarker auf T-Zellen

Des Weiteren wurden die Auswirkungen der CD28-Deletion vor Symptombeginn auf die Expression von CD44 und CD62L untersucht. Diese beiden Oberflächenmoleküle erlauben die Unterscheidung von CD4⁺-T-Zellen in naive T-Zellen einerseits und aktivierte oder Memory-T-Zellen andererseits. Während auf naiven T-Zellen CD62L in hohem Maße exprimiert wird, ist die Expression von CD44 unterdrückt. Dies ändert sich mit der Aktivierung der T-Zellen – nun wird die Expression von CD62L deutlich herunterreguliert und die CD44-Expression induziert (Barrat et al. 1995). Ähnlich wie bei den frühen Aktivie-

rungsmarkern wurde die Expression der genannten Oberflächenmerkmale jeweils am Tag 6 und 8 zum Einen für alle isolierten T-Zellen insgesamt und zum Anderen für die injizierten, RFP-markierten, MOG-spezifischen T-Zellen im Einzelnen analysiert.

Bei den am Tag 6 analysierten Zellen zeigte sich in Bezug auf die aktivierten T-Zellen ($CD44^{\text{high}} CD62L^{\text{low}}$) kein Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und den Cre^+ -T-Zellen – und zwar sowohl für die Gesamtheit aller $CD4^+$ -T-Zellen als auch für die injizierten T-Zellen im Speziellen (**Abbildung 3-4, A**).

Innerhalb der folgenden zwei Tage führte die Deletion von CD28 bei Betrachtung aller $CD4^+$ -T-Zellen zu einem leicht reduzierten Anteil aktivierter T-Lymphozyten, der allerdings nur in den dLN signifikant ist. Im Gegensatz dazu zeigt sich bei Analyse der MOG-spezifischen T-Zellen eine deutliche Reduktion des Anteils aktivierter T-Zellen. Dieser Effekt war – wenn auch in unterschiedlichem Maße – in allen untersuchten Gewebetypen durchweg signifikant (**Abbildung 3-4, B**). Auffällig ist außerdem, dass der Anteil aktivierter T-Zellen an beiden Tagen in der Population der injizierten, MOG-spezifischen T-Zellen deutlich erhöht ist. Nach Deletion von CD28 gleicht sich der Anteil dem Niveau der Gesamtpopulation an.

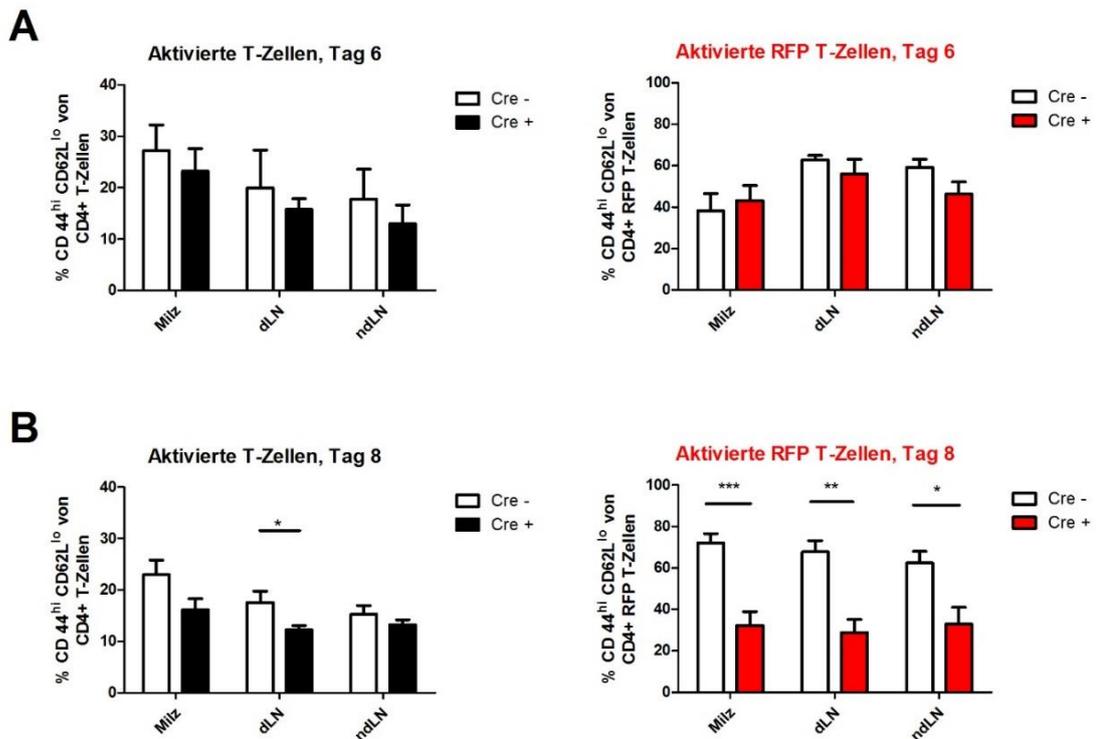


Abbildung 3-4: Effekte der Deletion von CD28 vor Symptombeginn auf aktivierte T-Zellen
 MOG-spezifische T-Zellen aus Cre⁺- und Cre⁻-Mäusen wurden isoliert und in C57Bl/6J-Mäuse injiziert. Diese wurden mit je 50 µg MOG₃₅₋₅₅ immunisiert und in der Folge beginnend am Tag 3 p. i. jeden zweiten Tag mit je 3 mg Tamoxifen behandelt. Am Tag 6 (A) und Tag 8 (B) wurden Zellen aus Milz, dLN und ndLN isoliert und mittels FACS hinsichtlich der Expression von CD44 und CD62L analysiert. Die Ergebnisse sind als Mittelwert ± Standardfehler dargestellt. Für die statistische Auswertung wurde ein ungepaarter t-Test durchgeführt. Es sind ausschließlich signifikante Unterschiede mit Sternchen markiert. $p \leq 0,05 \rightarrow *$; $p \leq 0,01 \rightarrow **$; $p \leq 0,005 \rightarrow ***$.
 Diagramme (alle CD4⁺-T-Zellen): $n = 4 - 7$, RFP-Diagramme: $n = 3 - 6$

Bei Betrachtung der naiven T-Zellen (CD44^{low} CD62L^{high}) ergab sich am Tag 6 p. i. ein leichter Trend hin zu einem höheren Anteil naiver T-Zellen bei Deletion von CD28. Diese Unterschiede waren jedoch – sowohl in Bezug auf die Gesamtheit aller CD4⁺-T-Zellen als auch auf die injizierten, MOG-spezifischen T-Zellen im Einzelnen – nicht statistisch signifikant (**Abbildung 3-5, A**). Die Analyse aller CD4⁺-T-Zellen am Tag 8 p. i. machte deutlich, dass der am Tag 6 angedeutete Trend nun signifikante Bedeutung erlangte. So war der Anteil naiver T-Zellen in CD4⁺-T-Zellen aus Milz und ndLN aus Mäusen der Kontrollgruppe deutlich reduziert und auch bei den aus drainierenden Lymphknoten isolierten T-Lymphozyten setzte sich dieser Trend fort. Besonders deutlich wurden diese Unterschiede bei Betrachtung allein der injizierten, MOG-spezifischen Zellen (**Abbildung 3-5, B**).

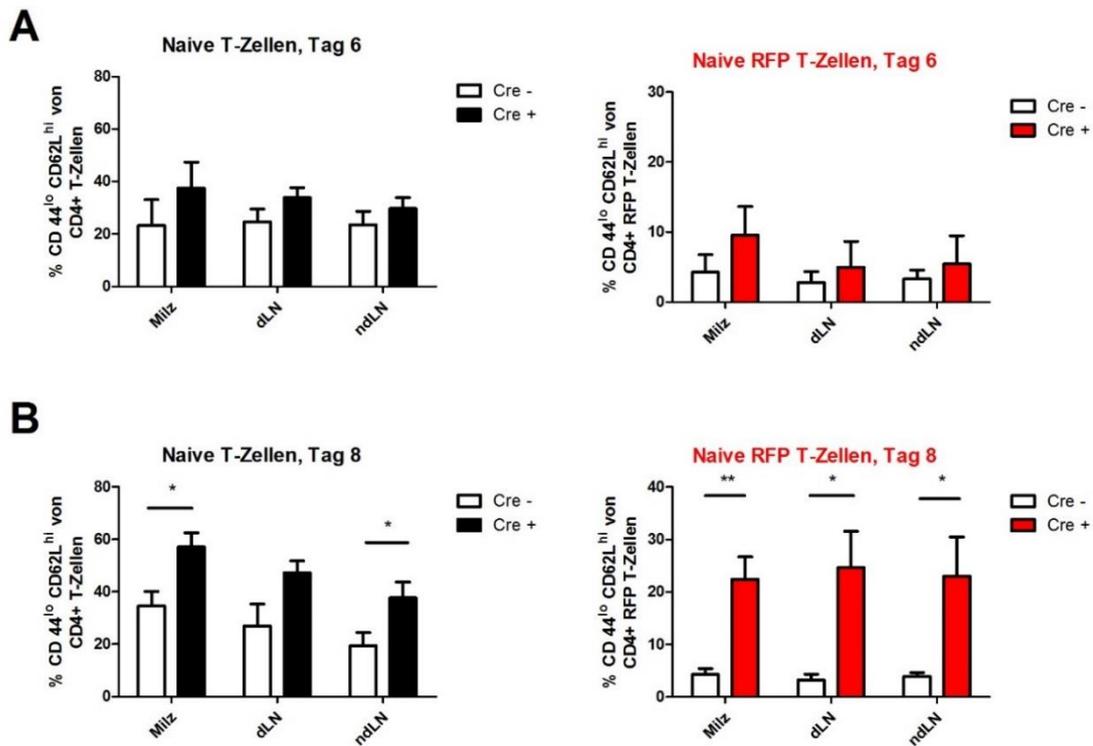


Abbildung 3-5: Effekte der Deletion von CD28 vor Symptombeginn auf naive T-Zellen

MOG-spezifische T-Zellen aus Cre⁺- und Cre⁻-Mäusen wurden isoliert und in C57Bl/6J-Mäuse injiziert. Diese wurden mit je 50 µg MOG₃₅₋₅₅ immunisiert und in der Folge beginnend am Tag 3 p. i. jeden zweiten Tag mit je 3 mg Tamoxifen behandelt. Am Tag 6 (A) und Tag 8 (B) wurden Zellen aus Milz, dLN und ndLN isoliert und mittels FACS hinsichtlich der Expression von CD44 und CD62L analysiert. Die Ergebnisse sind als Mittelwert ± Standardfehler dargestellt. Für die statistische Auswertung wurde ein ungepaarter t-Test durchgeführt. Es sind ausschließlich signifikante Unterschiede mit Sternchen markiert. $p \leq 0,05 \rightarrow *$; $p \leq 0,01 \rightarrow **$; $p \leq 0,005 \rightarrow ***$.

Diagramme (alle CD4⁺-T-Zellen): $n = 4 - 8$, RFP-Diagramme: $n = 3 - 6$

3.1.3 Zytokine

3.1.3.1 Analyse via Durchflusszytometrie

Ein weiterer untersuchter Aspekt war die Zytokinproduktion von CD4⁺-T-Lymphozyten in Abhängigkeit von der Deletion von CD28. Dabei wurde die Expression von Interferon- γ und von IL-17A am Tag 6 und 8 p. i. untersucht.

In Bezug auf Interferon- γ fiel durchweg eine hohe Schwankung in Bezug auf die Expressionslevels auf. Am Tag 6 zeigten sich bei Analyse aller isolierten T-Zellen leicht erhöhte Expressionslevels in der Kontrollgruppe, ohne jedoch statistische Signifikanz zu erreichen.

Bei Betrachtung ausschließlich der injizierten, MOG-spezifischen Zellen wurde dieser Unterschied deutlicher, auch wenn lediglich bei den Proben aus der Milz statistische Signifikanz erreicht wurde. Ein ähnliches Bild ergab sich am Tag 8 – in der Gesamtheit aller CD4⁺-T-Zellen traten leichte Trends zu erhöhten Expressionslevels bei der Kontrollgruppe auf. Bei Betrachtung der injizierten, MOG-spezifischen T-Zellen zeigten sich signifikante Unterschiede bei den Proben aus der Milz. Insgesamt fiel auf, dass die Expression von Interferon- γ am Tag 8 deutlich geringer war als noch am Tag 6 (**Abbildung 3-6**).

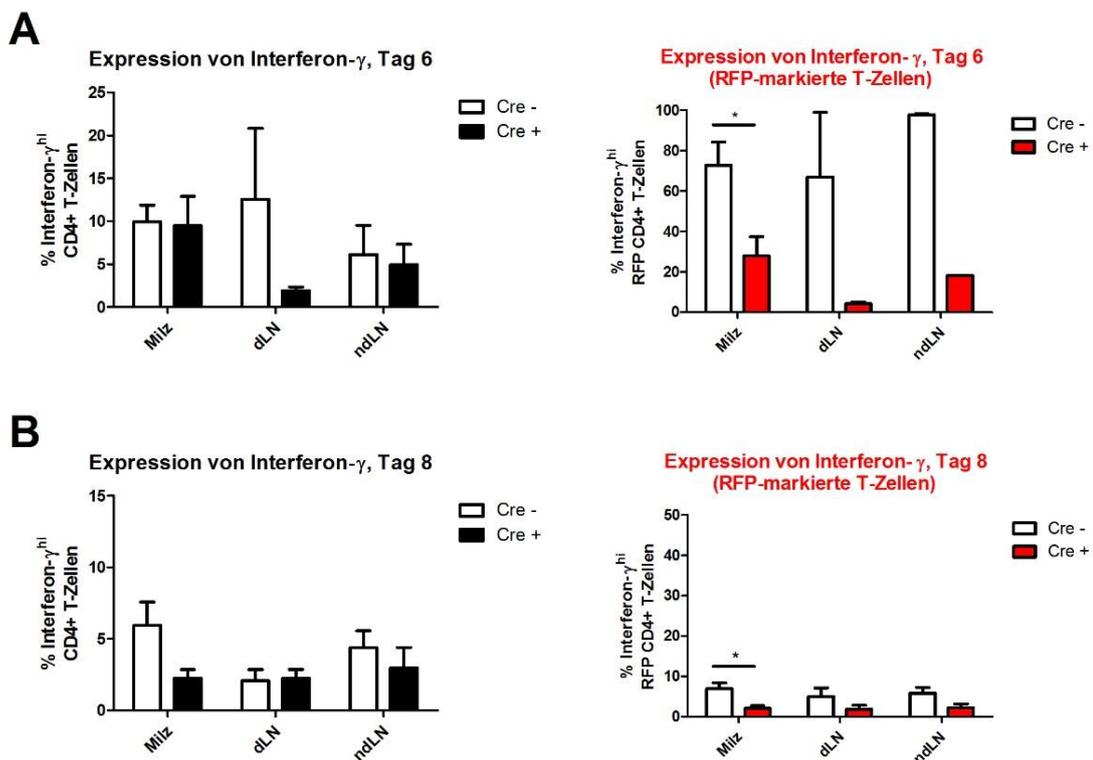


Abbildung 3-6: Effekte der Deletion von CD28 vor Symptombeginn auf die Expression von Interferon- γ

MOG-spezifische T-Zellen aus Cre⁺- und Cre⁻-Mäusen wurden isoliert und in C57Bl/6J-Mäuse injiziert. Diese wurden mit je 50 μ g MOG₃₅₋₅₅ immunisiert und in der Folge beginnend am Tag 3 p. i. mit drei Dosen Tamoxifen behandelt. Am Tag 6 (A) und Tag 8 (B) wurden Zellen aus Milz, dLN und ndLN isoliert und mittels FACS hinsichtlich der Expression von Interferon- γ analysiert. Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardfehler dargestellt. Für die statistische Auswertung wurde ein ungepaarter t-Test durchgeführt. Wenn die Anzahl der analysierten Proben sehr gering war – wie bei den RFP-markierten Proben aus ndLN am Tag 6 – wurde keine statistische Auswertung durchgeführt ($n < 3$). Es sind ausschließlich signifikante Unterschiede mit Sternchen markiert. $p \leq 0,05 \rightarrow *$; $p \leq 0,01 \rightarrow **$; $p \leq 0,005 \rightarrow ***$.

Milz: $n = 4 - 8$, dLN: $n = 3 - 6$, ndLN: $n = 1 - 6$

Die Expressionsanalyse von IL-17A ergab am Tag 6 p. i. bei Knockout von CD28 keine einheitliche Abweichung von den Proben der Kontrollgruppe. Auch in Bezug auf die MOG-spezifischen T-Zellen ließ sich keine deutliche Tendenz zu einer veränderten Expression von IL-17A ausmachen. Bei der Betrachtung aller CD4⁺-T-Zellen am Tag 8 schien die Deletion von CD28 zu einer leicht verringerten Expression von IL-17A zu führen. Dieser Eindruck bestätigte sich jedoch nicht, wenn man die injizierten Zellen allein betrachtete – im Gegenteil, hier exprimierten die Cre⁺-Zellen anteilig eher mehr IL-17A. Insgesamt lässt sich aufgrund der vorliegenden Daten derzeit keine Schlussfolgerung in Bezug auf die Effekte von CD28 auf die Expression von IL-17A ziehen (**Abbildung 3-7**).

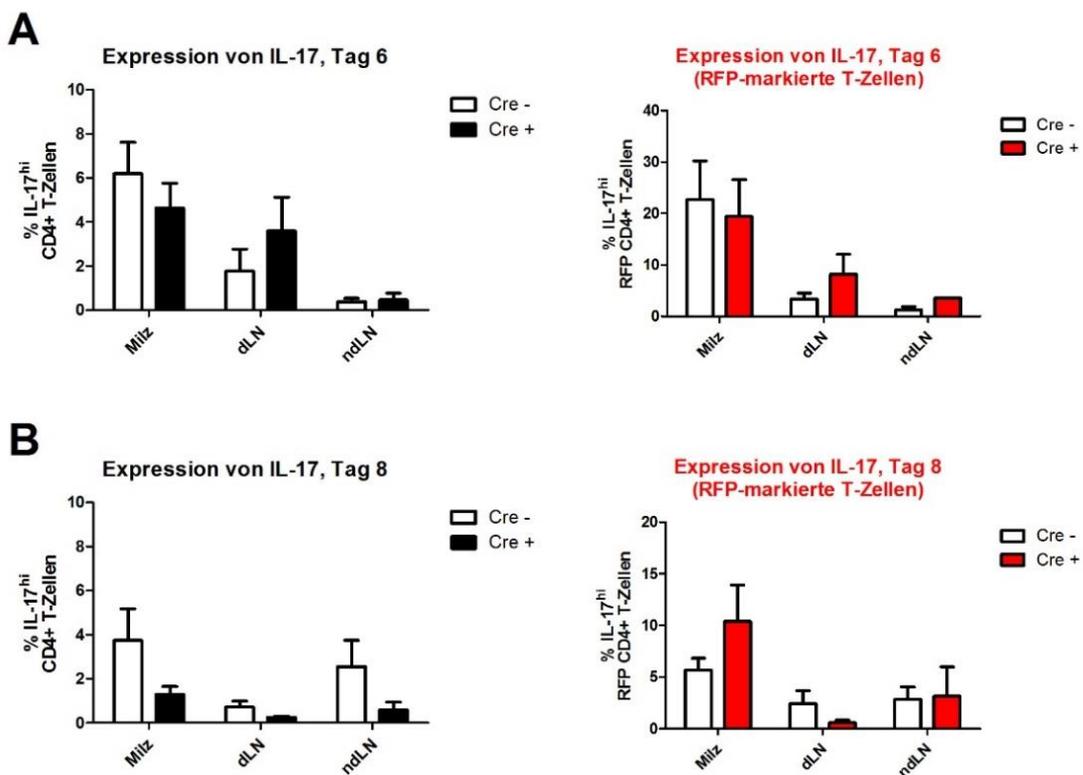


Abbildung 3-7: Effekte der Deletion von CD28 vor Symptombeginn auf die Expression von IL-17

MOG-spezifische T-Zellen aus Cre⁺- und Cre⁻-Mäusen wurden isoliert und in C57Bl/6J-Mäuse injiziert. Diese wurden mit je 50 µg MOG₃₅₋₅₅ immunisiert und in der Folge ab dem dritten Tag jeden zweiten Tag mit je 3 mg Tamoxifen behandelt. Am Tag 6 (A) und Tag 8 (B) wurden Zellen aus Milz, dLN und ndLN isoliert und mittels FACS hinsichtlich der Expression von IL-17 analysiert. Die Ergebnisse sind als Mittelwert ± Standardfehler dargestellt. Für die statistische Auswertung wurde ein ungepaarter t-Test durchgeführt. Wenn die Anzahl der analysierten Proben sehr gering war – wie bei den RFP-markierten Proben aus ndLN am Tag 6 – wurde keine statistische Auswertung durchgeführt ($n < 3$). Es sind ausschließlich signifikante Unterschiede mit Sternchen markiert. $p \leq 0,05 \rightarrow *$; $p \leq 0,01 \rightarrow **$; $p \leq 0,005 \rightarrow ***$

Milz: $n = 4 - 8$, dLN: $n = 3 - 6$, ndLN: $n = 1 - 6$

3.1.3.2 Analyse via PCR

Um die mittels Durchflusszytometrie erlangten Erkenntnisse bezüglich der Effekte von CD28 auf die Zytokinexpression genauer zu beleuchten, wurde mittels PCR die Regulation von Interferon- γ und IL-17A auf mRNA-Ebene untersucht. Dafür wurden C57Bl/6J-Mäuse nach einem Transfer von Cre⁺- oder Cre⁻-MOG-spezifischen T-Zellen immunisiert und am Tag 6 und 8 p. i. T-Zellen aus Milz und Lymphknoten (drainierend und nicht-drainierend) isoliert, um anschließend via FACS sortiert zu werden. Bei den so gewonnenen Zellen wurde im Anschluss die mRNA isoliert und diese in cDNA transkribiert, um schließlich eine qRT-PCR durchführen zu können.

Aufgrund der Komplexität des Versuchsaufbaus waren in den untersuchten Proben zum Teil nicht genügend Zellen für eine verlässliche Analyse der Genexpression enthalten, sodass nur wenige Resultate ausgewertet werden konnten. Daher können derzeit nur sehr eingeschränkt Aussagen zum Effekt der Deletion von CD28 vor Symptombeginn auf die Genexpression von Interferon- γ und IL-17A gemacht werden können (**Tabelle 3-1**).

Tabelle 3-1: Übersicht über die Anzahlen der Proben bei der Durchführung der qRT-PCR

Die erstgenannte Zahl beschreibt die Anzahl derjenigen PCRs, welche eine Aussage über die relative Expression des untersuchten Gens im Vergleich zum konstitutiv exprimierten Gen HPRT erlaubten. Die zweite Zahl benennt die Anzahl der Proben, bei denen Zellen sortiert wurden.

	Interferon- γ				IL-17A			
	Tag 6		Tag 8		Tag 6		Tag 8	
	Cre ⁻	Cre ⁺	Cre ⁻	Cre ⁺	Cre ⁻	Cre ⁺	Cre ⁻	Cre ⁺
Milz	2 / 2	2 / 2	2 / 2	2 / 2	1 / 2	1 / 2	1 / 2	0 / 2
dLN	2 / 2	1 / 1	1 / 2	2 / 2	2 / 2	1 / 1	1 / 2	0 / 2
ndLN	0 / 2	0 / 1	1 / 2	1 / 2	1 / 2	0 / 1	1 / 2	0 / 2

Die Analyse der Expression von Interferon- γ auf mRNA-Ebene deutet eine Veränderung in Bezug auf das Expressionsmuster zwischen den beiden Tagen an, je nachdem ob CD28 exprimiert wird oder nicht. Während die Ergebnisse am Tag 6 sehr ähnlich sind, zeigt sich am Tag 8 eine erste Tendenz zu einer reduzierten Expression von Interferon- γ bei iCD28ko-Mäusen (**Abbildung 3-8, A**).

Etwas anders stellt sich die Situation bei IL-17A dar: Hier scheint bereits am Tag 6 p. i. eine Diskrepanz zwischen den verschiedenen Kohorten zu bestehen. Insbesondere bei den aus der Milz isolierten Zellen zeigte sich in der Kontrollgruppe eine deutlich höhere Expression von IL-17A im Vergleich zu den Cre⁺-Zellen. Die Expression von IL-17A scheint im weiteren Verlauf bei den der Milz entnommenen Zellen der Kontrollgruppe abzuneh-

men, während die Expressionslevels der Lymphknoten-Proben stabil zu bleiben scheinen. Wie sich die Expressionsmuster von IL-17A bei den Cre⁺-Zellen entwickeln, ist noch zu untersuchen. Ebenso sind auch diese vorläufigen Ergebnisse noch zu verifizieren (Abbildung 3-8, B).

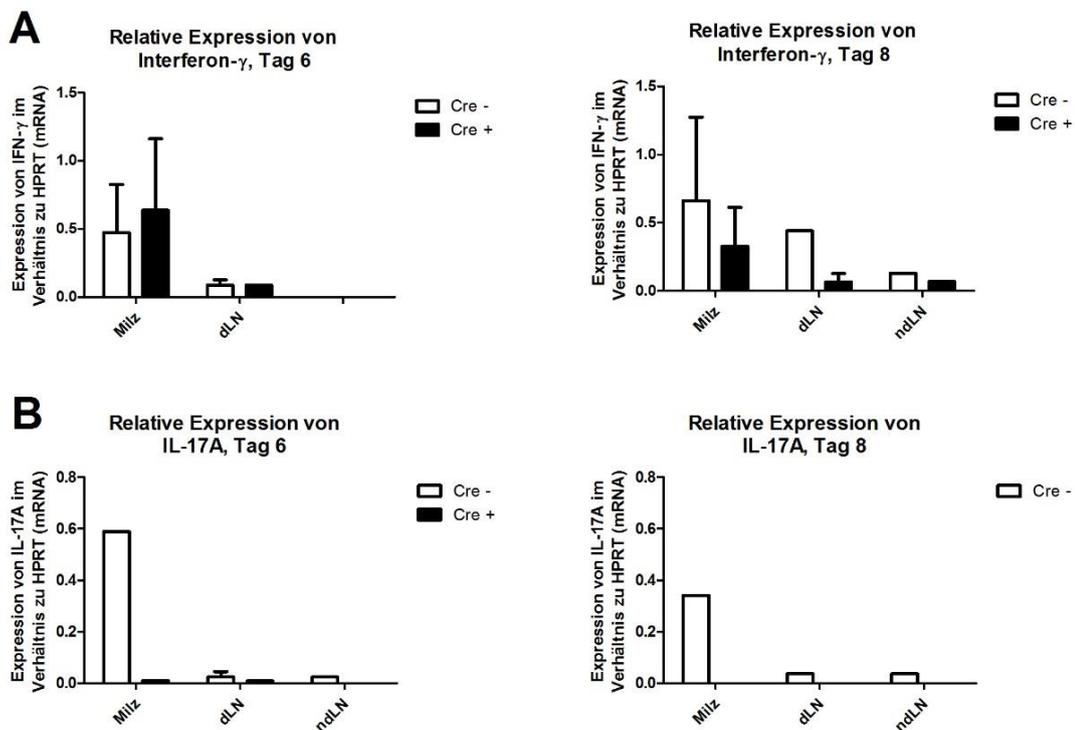


Abbildung 3-8: Effekte der Deletion von CD28 vor Symptombeginn auf die Genexpression von Interferon-γ (A) und IL-17A (B)

MOG-spezifische T-Zellen aus Cre⁺- und Cre⁻-Mäusen wurden isoliert und in C57Bl/6J-Mäuse injiziert. Diese wurden mit je 50 µg MOG₃₅₋₅₅ immunisiert und in der Folge ab dem dritten Tag jeden zweiten Tag mit je 3 mg Tamoxifen behandelt. Am Tag 6 und Tag 8 wurden Zellen aus Milz, dLN und ndLN isoliert und sortiert. Die nach RNA-Isolation und reverser Transkription gewonnene cDNA wurde mittels qRT-PCR auf die Expression des zu untersuchenden Genes im Verhältnis zum konstitutiv exprimierten Gen HPRT untersucht. Die Ergebnisse sind als Mittelwert ± Standardfehler dargestellt. Aufgrund der geringen Fallzahlen wurde keine statistische Auswertung durchgeführt.

n < 3

3.1.4 Proliferation

In weiteren Experimenten wurde untersucht, welche Auswirkungen die Deletion von CD28 auf die Proliferation von T-Zellen hat. Dafür wurden aus RFP-markierten

Cre⁺-Mäusen einerseits und – als Negativkontrolle – aus CD45.1-Mäusen T-Zellen isoliert wie unter 2.2.5 beschrieben. Diese zwei unterschiedlichen Typen MOG-spezifischer T-Zellen wurden nach Durchführung einer CFSE-Färbung (vgl. 2.2.7) in C57Bl/6J-Mäuse zwei Tage vor Immunisierung mit MOG₃₅₋₅₅ injiziert. Das bedeutet, dass in einer Maus sowohl T-Zellen vorliegen, die durch Tamoxifengabe CD28 verlieren können, als auch solche, bei denen dies nicht möglich ist. Dies erlaubt den direkten Vergleich der Proliferation in einem Tier, also ohne interindividuelle Unterschiede. In der Folge wurden die Tiere beginnend am Tag 3 p. i. mit Tamoxifen behandelt. Am Tag 6 und 8 p. i. wurden schließlich T-Zellen aus Milz, dLN und ndLN entnommen und isoliert, wobei es dank der Fluoreszenzmarkierung der Zellen möglich war, die injizierten, MOG-spezifischen T-Zellen isoliert zu betrachten.

Am Tag 6 p. i. zeigten sich in allen drei Herkunftsgeweben der analysierten T-Zellen ähnliche Ergebnisse: So war der Anteil der injizierten T-Zellen mit einem sehr schwachen CFSE-Signal – also derjenigen Zellen, die maximal proliferiert sind – bei den Cre⁺-T-Zellen ähnlich groß wie in der Kontrollgruppe. Aber auch bei Betrachtung des Anteils nicht proliferierter T-Zellen – also diejenigen, welche noch ein sehr starkes Signal reflektierten – zeigten sich in der Cre⁺-Kohorte vergleichbare Ergebnisse zu den Cre⁻-T-Zellen (**Abbildung 3-9**).

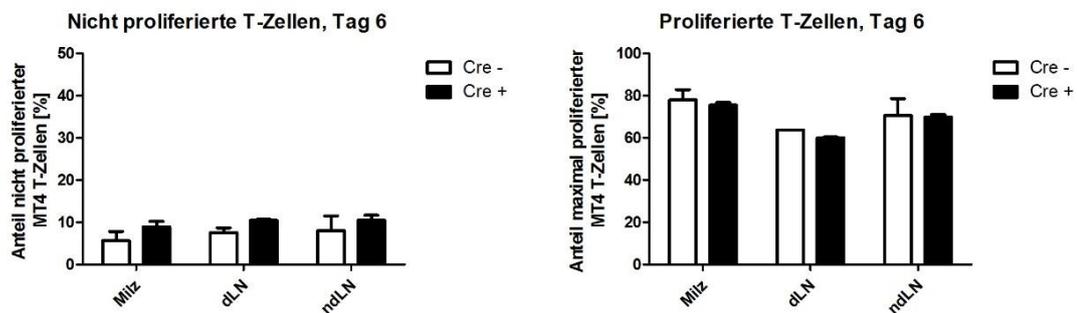


Abbildung 3-9: Proliferation von T-Zellen in Abhängigkeit von CD28 am Tag 6 p. i.

Zwei Tage vor Immunisierung mit MOG₃₅₋₅₅ wurden C57Bl/6J-Mäusen CFSE-markierte, MOG-spezifische T-Zellen injiziert, welche zur Hälfte RFP-markiert und Cre⁺ und zur anderen Hälfte CD45.1-markiert und Cre⁻ waren. Ab dem 3. Tag p. i. wurden die Tiere alternierend mit je 3 mg Tamoxifen behandelt. Am Tag 6 wurden Zellen aus Milz, dLN und ndLN isoliert und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die Ergebnisse sind als Mittelwert ± Standardfehler dargestellt. Aufgrund der geringen Fallzahlen wurde keine statistische Auswertung durchgeführt. $n = 2$

Diese Ergebnisse werden auch durch beispielhafte Histogramme bestimmter Gewebe verdeutlicht, in denen die Kurven für Cre⁺ und Cre⁻ fast deckungsgleich sind. Auffällig ist lediglich ein erhöhter Anteil an Cre⁻-Zellen, welche sich einmal geteilt haben (**Abbildung**

3-10). Am Tag 6 p. i. ist also noch kein deutlicher Unterschied im Hinblick auf das Proliferationsverhalten der T-Zellen in Abhängigkeit von der Gegenwart von CD28 zu erkennen.

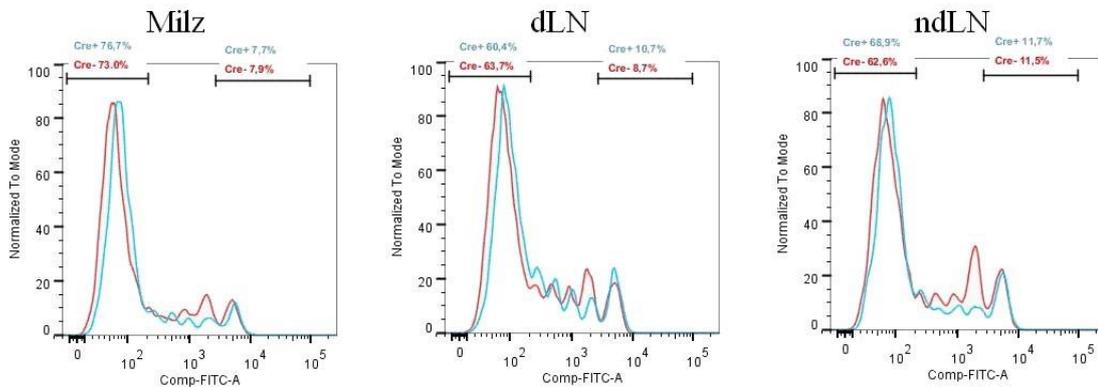


Abbildung 3-10: Proliferation von T-Zellen in Abhängigkeit von CD28 am Tag 6 p. i. im Histogramm

Zwei Tage vor Immunisierung mit MOG₃₅₋₅₅ wurden C57Bl/6J-Mäusen CFSE-markierte, MOG-spezifische T-Zellen injiziert, welche zur Hälfte RFP-markiert und Cre⁺ und zur anderen Hälfte CD45.1-markiert und Cre⁻ waren. Ab dem dritten Tag wurden die Tiere jeden zweiten Tag mit je 3 mg Tamoxifen behandelt. Am Tag 6 wurden Zellen aus Milz, dLN und ndLN isoliert und mittels Durchflusszytometrie analysiert.

Beispielhaft sind hier Graphen der drei Gewebetypen einer Maus dargestellt. Die Graphen sind als Häufigkeit gegen die Intensität des CFSE-Signals aufgetragen. Dabei sind die einzelnen Populationen, welche eine gleiche Anzahl an Zellteilungen durchgeführt haben, deutlich zu erkennen. Der Peak mit dem stärksten Signal steht jeweils stellvertretend für die nicht proliferierten Zellen (durch Prozentwerte quantifiziert), während der höchste Peak mit dem schwächsten Signal für die maximal proliferierten Zellen steht (ebenfalls durch Prozentwerte quantifiziert).

Bei der Aufbereitung am Tag 8 p. i. zeigten sich veränderte Verhältnisse: Während der jeweilige Anteil in den verschiedenen Gewebetypen bei den Cre⁻-T-Zellen auf ähnlichem Niveau stagnierte wie am Tag 6, änderten sich die Verhältnisse bei den Cre⁺-T-Zellen. Es zeigt sich eine klare Tendenz zu einem vergrößerten Anteil nicht proliferierter Zellen in allen Gewebetypen. Bei Betrachtung der maximal proliferierten Zellen ergibt sich das gegenteilige Bild. Hier sind die Werte bei den Cre⁺-T-Zellen verringert, auch wenn lediglich bei den nicht-drainierenden Lymphknoten statistische Signifikanz erreicht wird (**Abbildung 3-11**).

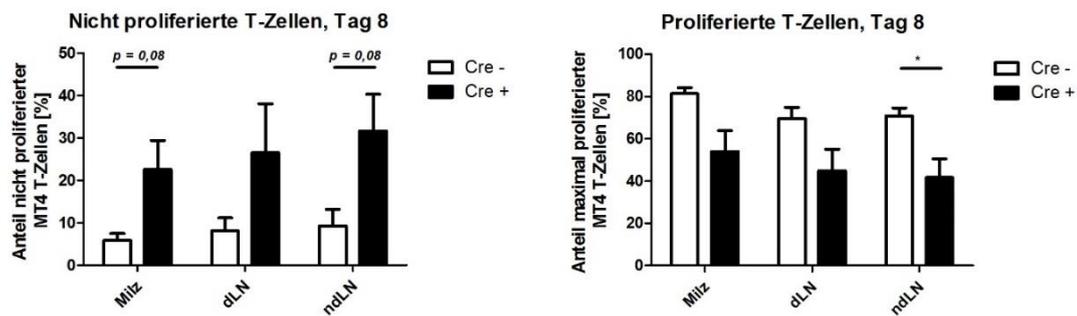


Abbildung 3-11: Proliferation von T-Zellen in Abhängigkeit von CD28 am Tag 8 p. i.

Zwei Tage vor Immunisierung mit MOG₃₅₋₅₅ wurden C57Bl/6J-Mäusen CFSE-markierte, MOG-spezifische T-Zellen injiziert, welche zur Hälfte RFP-markiert und Cre⁺ und zur anderen Hälfte CD45.1-markiert und Cre⁻ waren. Ab dem dritten Tag wurden die Tiere jeden zweiten Tag mit je 3 mg Tamoxifen behandelt. Am Tag 8 wurden Zellen aus Milz, dLN und ndLN isoliert und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardfehler dargestellt. Für die statistische Auswertung wurde ein ungepaarter t-Test durchgeführt. Es sind ausschließlich signifikante Unterschiede mit Sternchen markiert. $p \leq 0,05 \rightarrow *$; $p \leq 0,01 \rightarrow **$; $p \leq 0,005 \rightarrow ***$. $n = 3$

Folgerichtig ist in beispielhaften Histogrammen zu erkennen, dass bei Cre⁻-T-Zellen ein deutlicher Trend hin zu einer höheren Frequenz von Zellteilungen erkennbar ist (**Abbildung 3-12**). Die Deletion von CD28 führt also am Tag 8 p. i. zu einer verringerten Proliferationsrate von MOG-spezifischen CD4⁺-T-Zellen.

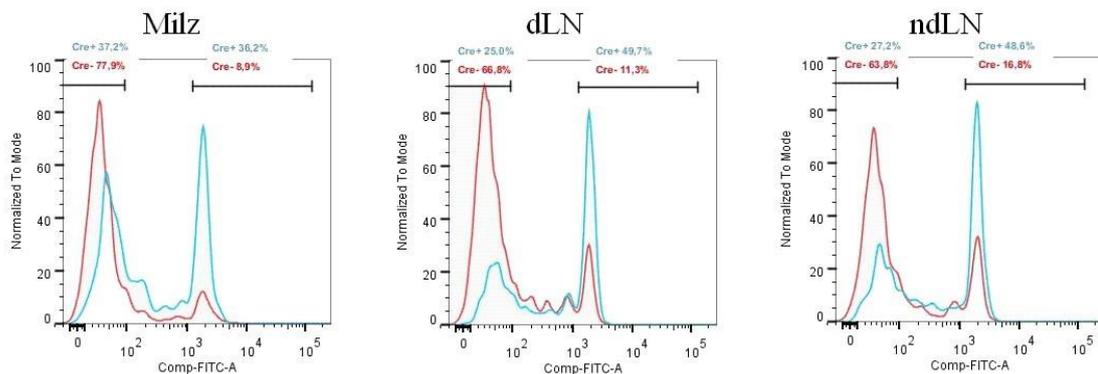


Abbildung 3-12: Proliferation von T-Zellen in Abhängigkeit von CD28 am Tag 8 p. i. im Histogramm

Zwei Tage vor Immunisierung mit MOG₃₅₋₅₅ wurden C57Bl/6J-Mäusen CFSE-markierte, MOG-spezifische T-Zellen injiziert, welche zur Hälfte RFP-markiert und Cre⁺ und zur anderen Hälfte CD45.1-markiert und Cre⁻ waren. Ab dem dritten Tag wurden die Tiere jeden zweiten Tag mit je 3 mg Tamoxifen behandelt. Am Tag 8 wurden Zellen aus Milz, dLN und ndLN isoliert und mittels Durchflusszytometrie analysiert.

Beispielhaft sind hier Graphen der drei Gewebetypen einer Maus dargestellt. Die Graphen sind als Häufigkeit gegen die Intensität des CFSE-Signals aufgetragen. Dabei sind die einzelnen Populationen, welche eine gleiche Anzahl an Zellteilungen durchgeführt haben, deutlich zu erkennen. Der Peak mit dem stärksten Signal steht jeweils stellvertretend für die nicht proliferierten Zellen (durch Prozentwerte quantifiziert), während der höchste Peak mit dem schwächsten Signal für die maximal proliferierten Zellen steht (ebenfalls durch Prozentwerte quantifiziert).

3.2 Deletion von CD28 am Höhepunkt der EAE

Die folgenden Experimente setzen sich mit den Auswirkungen der Deletion von CD28 am Höhepunkt der EAE auseinander. Ein wichtiger Aspekt war dabei, die Auswirkung der Deletion von CD28 auf den klinischen Verlauf der EAE in Mäusen mit verschiedenen genetischen Modifikationen zu untersuchen: Zunächst wurde ein Experiment zum klinischen Verlauf in Mäusen mit einem gewöhnlichen, polyklonalen T-Zellrepertoire durchgeführt, bei denen jedoch in den T-Zellen durch Tamoxifengabe eine Deletion von CD28 induziert werden kann, wie in Abschnitt 1.5 beschrieben. Außerdem wurden Versuche mit OT II-Mäusen durchgeführt, die T-Zellen mit Rezeptoren besitzen, die spezifisch gegen Ovalbumin gerichtet sind, also ein weitgehend eingeschränktes T-Zellrepertoire besitzen. Diese Tiere wurden mit MOG-spezifischen T-Lymphozyten supplementiert, in denen CD28 durch Tamoxifengabe deletiert werden konnte. Außerdem wurde analysiert, welchen Effekt die Deletion von CD28 auf die Aktivierung und die Apoptosewahrscheinlichkeit

von CD4⁺-T-Zellen hat. In einem letzten Versuch wurde schließlich untersucht wie regulatorische T-Zellen durch die Deletion von CD28 beeinflusst werden.

In den Versuchen wurde den Tieren am Tag 12, 14 und 16 p. i. je 3 mg Tamoxifen verabreicht. Bei den klinischen Versuchen wurden die Tiere – beginnend am Tag 10 p. i. – jeden Tag gewogen und in Bezug auf klinische Symptome einer EAE gescort (vgl. 2.2.2). Für die anderen Experimente wurden den Tieren am Tag 18 p. i. Milz und Lymphknoten (drainierend und nicht-drainierend) entnommen und diese für die Durchflusszytometrie aufbereitet. Bei den Experimenten zu den regulatorischen T-Zellen wurde zusätzlich auch das Rückenmark der Tiere analysiert (**Abbildung 3-13**).

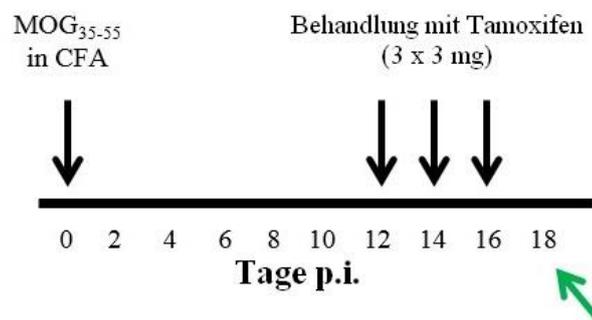


Abbildung 3-13: Schema der Versuche zur Beurteilung der Deletion von CD28 am Höhepunkt der EAE

Die Mäuse wurden mit MOG₃₅₋₅₅ immunisiert, wie unter Material und Methoden beschrieben. Am Tag 12, 14 und 16 p. i. wurde den Mäusen je 3 mg Tamoxifen verabreicht. Die Aufbereitung der Zellen erfolgte am Tag 18 nach Immunisierung.

3.2.1 Klinische Beurteilung in iCD28ko-Mäusen

Um feststellen zu können, welche Auswirkungen die Deletion von CD28 nach dem Auftreten erster Krankheitssymptome auf den weiteren klinischen Verlauf einer EAE hat, wurden Cre⁺- und Cre⁻iCD28ko-Mäuse immunisiert und mit Tamoxifen an den Tagen 12, 14 und 16 p. i. behandelt, sodass mit einer Deletion von CD28 ab dem 15. Tag p. i. zu rechnen ist. Dabei zeigte sich in zwei unterschiedlichen Experimenten gleichermaßen, dass die Kontrollgruppe mit den Cre⁻-Tieren einen üblichen Krankheitsverlauf mit Symptombeginn um Tag 11 p. i. zeigte. Bei den Cre⁺-Tieren zeigte sich erwartungsgemäß anfangs ein ähnlicher Verlauf – auch diese Mäuse entwickelten nach etwa elf Tagen die ersten Krankheitssymptome. Mit beginnender Tamoxifengabe und daraus resultierend verringerter CD28-Expression verbesserte sich jedoch rasch der klinische Zustand dieser Tiere, bis schließlich nur noch leichte Residuen erkennbar waren (**Abbildung 3-14**). Die Deletion von CD28 am Höhepunkt der EAE führt also zu einer deutlichen Milderung der klinischen Symptomatik.

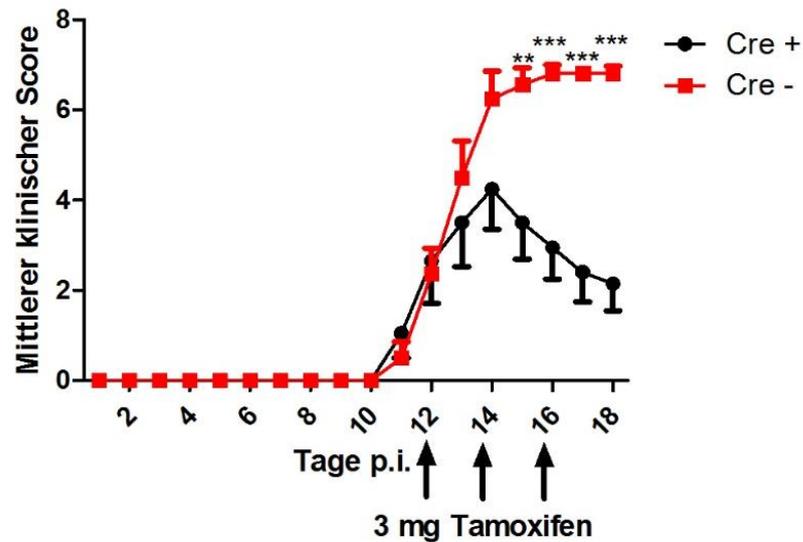


Abbildung 3-14: Klinischer Verlauf der EAE in iCD28ko-Mäusen

Die Tiere wurden nach Immunisierung mit 50 μg MOG₃₅₋₅₅, sowie einer Behandlung mit Tamoxifen (3 mg an jedem zweiten Tag) beginnend am Tag 12 p. i. im Hinblick auf klinische Symptome einer EAE gescort. Insgesamt wurden zehn Cre⁺- mit acht Cre⁻-Tieren verglichen. Die Ergebnisse sind als mittlerer klinischer Score (\pm Standardfehler) gegen die Tage nach Immunisierung aufgetragen. Für die statistische Auswertung wurde ein Mann-Whitney-U-Test durchgeführt. Es sind ausschließlich signifikante Unterschiede mit Sternchen markiert. $p \leq 0,05 \rightarrow *$; $p \leq 0,01 \rightarrow **$; $p \leq 0,005 \rightarrow ***$.

Cre⁺: $n = 10$, Cre⁻: $n = 8$

3.2.2 Aktivierte und naive T-Zellen

Ähnlich wie bei der Deletion von CD28 vor Symptombeginn ist es auch bei der CD28-Deletion am Höhepunkt der EAE interessant zu erfahren, über welchen Mechanismus der mildere klinische Verlauf vermittelt wird. Daher wurde untersucht, welche Auswirkungen die Deletion von CD28 auf das Expressionsmuster von CD44 und CD62L hat – sprich, wie sich das Verhältnis aktivierter und naiver T-Zellen ändert. Hierfür wurden am Tag 18 p. i. die T-Zellen aus Milz und Lymphknoten (drainierend und nicht-drainierend) isoliert und mittels Durchflusszytometrie im Hinblick auf CD44 und CD62L analysiert.

Bei der Analyse zeigten sich in den aus Milz und dLN isolierten CD4⁺-T-Zellen deutliche Unterschiede zwischen den Cre⁺-T-Zellen und der Kontrollgruppe. Der Anteil naiver CD4⁺-T-Zellen war in Abwesenheit von CD28 deutlich gesteigert. Betrachtet man die Population aktivierter CD4⁺-T-Zellen so fällt auf, dass dieser Anteil bei den Cre⁺-Proben deutlich geringer ist. Hier ist der Effekt sogar so deutlich, dass er in der Gesamtheit aller T-Zellen erkennbar ist. Bei den nicht-drainierenden Lymphknoten hingegen waren keine signifikanten Unterschiede, sondern lediglich leichte Trends in die gleiche Richtung zu er-

kennen (**Abbildung 3-15**). Die Deletion von CD28 am Höhepunkt der EAE führt also zu einer deutlich reduzierten Expression von Aktivierungsmarkern, wie z. B. CD44.

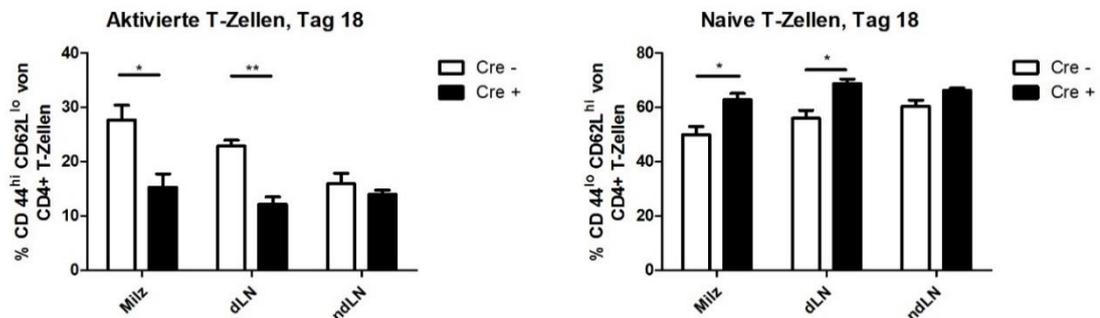


Abbildung 3-15: Effekte der CD28-Deletion am Höhepunkt der EAE auf Aktivierungsmarker von T-Zellen

Jeweils drei Cre⁻- und Cre⁺-Tiere wurden am Tag 18 p. i. nach der Immunisierung mit MOG₃₅₋₅₅ und Behandlung mit drei Dosen à 3 mg Tamoxifen beginnend am Tag 12 p. i. aufbereitet. Dafür wurden aus Milz, dLN und ndLN T-Zellen isoliert und mittels Durchflusszytometrie hinsichtlich der Expression von CD44 und CD62L analysiert. Die Ergebnisse sind als Mittelwert ± Standardfehler dargestellt. Für die statistische Auswertung wurde ein ungepaarter t-Test durchgeführt. Es sind ausschließlich signifikante Unterschiede mit Sternchen markiert. $p \leq 0,05 \rightarrow *$; $p \leq 0,01 \rightarrow **$; $p \leq 0,005 \rightarrow ***$.

$n = 3$

3.2.3 Apoptotische T-Zellen

In einem weiteren Versuch wurde untersucht, welche Auswirkungen die Deletion von CD28 am Höhepunkt auf die Apoptosewahrscheinlichkeit der T-Zellen hat. Dazu wurden die Zellen nach Aufbereitung am Tag 18 p. i. nach einer Zweifach-Färbung mit Annexin V und 7-AAD mittels Durchflusszytometrie analysiert. Diese beiden Farbstoffe binden an das Membranmolekül Phosphatidylserin. Dieses Molekül wird in vitalen Zellen aktiv durch Flippasen auf der zytosolischen Seite der Zellmembran gehalten. Entsprechend reagieren lebendige, nicht-apoptotische Zellen auf beide Färbungen negativ. Geht eine Zelle in die Apoptose, fällt dieser Mechanismus weg. Phosphatidylserin kann vermehrt auf die extrazelluläre Seite der Zellmembran gelangen und dient auf diese Weise Makrophagen als sog. *Eat me*-Signal (Verhoven et al. 1995). Frühapoptotische Zellen reagieren positiv auf die Färbung mit Annexin V und negativ auf die Färbung mit 7-AAD, während spätapoptotische oder auch vollständig nekrotische Zellen auf beide Färbungen positiv reagieren. Auf diese Weise lässt sich also nicht nur der Anteil apoptotischer Zellen quantifizieren, sondern auch genauer differenzieren, wie weit dieser Prozess bereits fortgeschritten ist.

Bei der Analyse der Zellen in Hinblick auf die Apoptose insgesamt, also bei Betrachtung des Anteils Annexin V-positiver T-Zellen, zeigte sich insbesondere bei den aus den dLN isolierten T-Zellen deutliche Unterschiede. In den Cre⁺-Tieren wurden signifikant mehr Zellen apoptotisch als in der Kontrollgruppe. Bei den anderen beiden Geweben (Milz & ndLN) waren leichte Tendenzen in die gleiche Richtung zu erkennen, jedoch ohne, dass dies signifikant wurde (**Abbildung 3-16, A**).

Betrachtet man nun zusätzlich die Ergebnisse der Färbung mit 7-AAD, so zeigt sich ein sehr deutliches Bild. Der Anteil frühapoptotischer Zellen war bei den Cre⁻-Tieren in Milz und Lymphknoten (dLN & ndLN) konstant niedrig. Bei den Cre⁺-Proben ist dieser hingegen deutlich höher, wobei die Unterschiede durchweg signifikant sind. Am deutlichsten ist die Diskrepanz bei den aus der Milz isolierten T-Zellen.

Ganz anders stellt sich die Situation bei den spätapoptotischen Zellen dar. Hier sind keine signifikanten Unterschiede zwischen den Cre⁺-Zellen und der Kontrollgruppe zu erkennen, auch lässt sich kein Trend in die eine oder andere Richtung erkennen (**Abbildung 3-16, B**). Die Deletion von CD28 am Höhepunkt der EAE führt also zu einem deutlich erhöhten Anteil apoptotischer Zellen. Dies gilt insbesondere für solche Zellen, die noch nicht positiv auf die Färbung mit 7-AAD reagieren, also frühapoptotisch sind.

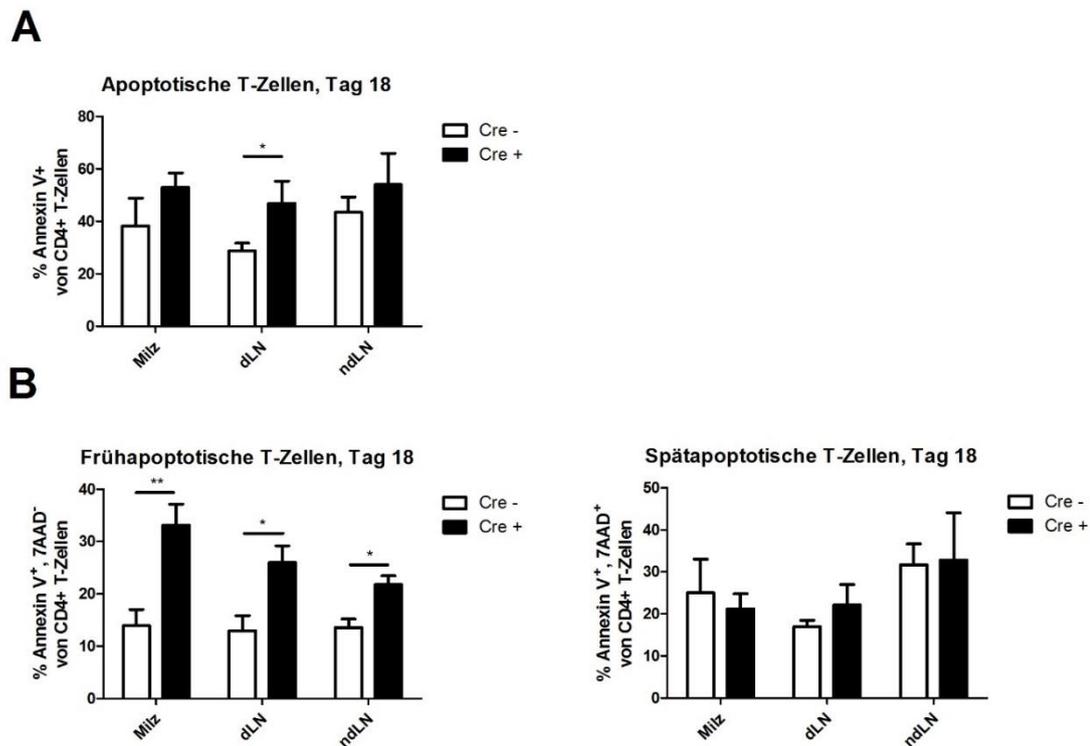


Abbildung 3-16: Effekte der CD28-Deletion am Höhepunkt der EAE auf die Apoptose

Fünf Cre⁻- und drei Cre⁺-Tiere wurden nach Immunisierung mit MOG₃₅₋₅₅ beginnend am Tag 12 p. i. mit je drei Dosen Tamoxifen behandelt. Am Tag 18 p. i. wurden aus Milz, dLN und ndLN T-Zellen isoliert und nach Färbung mit Annexin V und 7-AAD mittels Durchflusszytometrie analysiert. Gezeigt sind einerseits die Ergebnisse der Annexin V-Färbung alleine (A), sowie die der kombinierten Färbung von Annexin V und 7-AAD (B). Die Ergebnisse sind als Mittelwert ± Standardfehler dargestellt. Für die statistische Auswertung wurde ein ungepaarter t-Test durchgeführt. Es sind ausschließlich signifikante Unterschiede mit Sternchen markiert. $p \leq 0,05 \rightarrow *$; $p \leq 0,01 \rightarrow **$; $p \leq 0,005 \rightarrow ***$.

Cre⁻: $n = 5$, Cre⁺: $n = 3$

3.2.4 Regulatorische T-Zellen

Wie in Abschnitt 1.3.2 beschrieben, spielt CD28 in der Entwicklung regulatorischer T-Zellen eine bedeutsame Rolle. Aus diesem Grund ist es interessant zu untersuchen, ob die Deletion von CD28 auch über eine Beeinflussung der Entwicklung regulatorischer T-Zellen zu einem milderem Krankheitsverlauf führt. Dafür wurden nach Tamoxifengabe beginnend am Tag 12 p. i. T-Zellen aus vorgenannten Geweben (Milz, dLN & ndLN), aber auch aus dem Rückenmark der untersuchten Tiere isoliert. Dabei wurden wieder Cre⁺- mit Cre⁻-Tieren verglichen. Die so erhaltenen T-Zellen wurden mittels Durchflusszytometrie hinsichtlich ihrer Expression von CD25 und FoxP3 untersucht. Diese beiden Moleküle

erlauben die Identifizierung regulatorischer T-Zellen. Insbesondere FoxP3 spielt eine wichtige Rolle bei der Entwicklung und Funktion regulatorischer T-Zellen (Fontenot et al. 2003).

Bei der Analyse zeigten sich in allen vier Gewebetypen ähnliche Verhältnisse. Der Anteil an T_{Reg}-Zellen war bei den aus Cre⁻-Mäusen isolierten T-Lymphozyten durchweg leicht erhöht, jedoch ohne statistische Signifikanz zu erreichen. Bei den aus der Milz isolierten Zellen war der Anteil sowohl in Cre⁺-Mäusen als auch in der Kontrollgruppe leicht verringert (Abbildung 3-17).

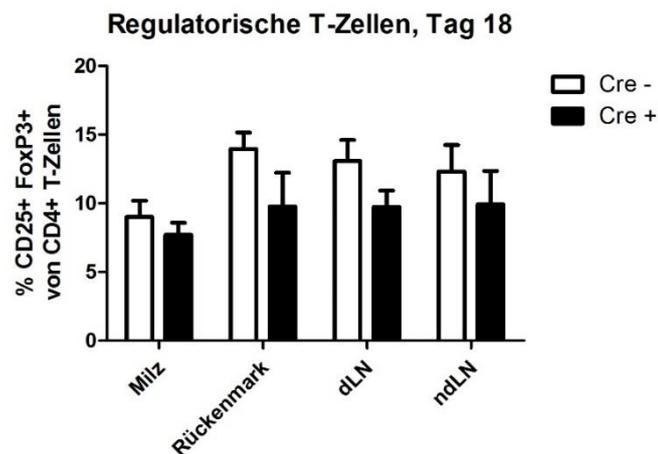


Abbildung 3-17: Effekte der Deletion von CD28 am Höhepunkt der EAE auf T_{Reg}-Zellen

Die Tiere wurden nach Immunisierung mit MOG₃₅₋₅₅ und nachfolgender Tamoxifengabe ab Tag 12 p. i. am Tag 18 aufbereitet. Dabei wurden T-Zellen aus Milz, Rückenmark und Lymphknoten isoliert und mittels Durchflusszytometrie hinsichtlich ihrer Expression von CD25 und FoxP3 analysiert. Die Ergebnisse sind als Mittelwert ± Standardfehler dargestellt. Für die statistische Auswertung wurde ein ungepaarter t-Test durchgeführt, dabei sind ausschließlich signifikante Unterschiede mit Sternchen markiert. $p \leq 0,05 \rightarrow *$; $p \leq 0,01 \rightarrow **$; $p \leq 0,005 \rightarrow ***$.

Cre⁻: $n = 4 - 7$, Cre⁺: $n = 3 - 6$

Diese Ergebnisse legen nahe, dass ein potentiell erhöhter Anteil an T_{Reg}-Zellen eher nicht der Mechanismus ist, über den ein milderer Krankheitsverlauf bei Cre⁺-Mäusen vermittelt wird.

3.3 Klinische Beurteilung in OT II-Mäusen

Um untersuchen zu können, ob die Deletion von CD28 auch dann zu einem veränderten klinischen Verlauf führt, wenn diese ausschließlich in den MOG-spezifischen T-Lymphozyten abläuft, wurden Transferversuche mit OT II-Mäusen als Empfängertieren durchgeführt. Diese Tiere entwickeln nach Immunisierung mit MOG₃₅₋₅₅ keine EAE. Nach Injektion MOG-spezifischer T-Zellen und anschließender Tamoxifengabe lässt sich daher eine Aussage über die klinische Relevanz der Deletion von CD28 spezifisch in enzephalitogenen T-Zellen treffen.

Zur Durchführung wurden T-Lymphozyten aus 2D2-Mäusen isoliert, also aus transgenen Mäusen, die ausschließlich T-Zellen besitzen, deren TCR spezifisch für MOG ist. Diese Zellen waren entweder Cre⁺ oder Cre⁻ und wurden dann OT II-Mäusen injiziert, welche zwei Tage später mit je 50 µg MOG₃₅₋₅₅ immunisiert wurden. Beginnend am Tag 3 p. i. wurden die Tiere an jedem zweiten Tag mit 3 mg Tamoxifen behandelt und ab dem 10. Tag p. i. im Hinblick auf klinische Symptome gescort (**Abbildung 3-18, A**).

Die Tiere beider Gruppen zeigten bis zum 15. Tag p. i. keinerlei Symptome. In der Folge zeigte sich ein sehr variabler Verlauf: Bei den Cre⁺ erkrankte nur eine von sechs Mäusen, bei den Cre⁻-Tieren hingegen betrug die Prävalenz vier von sechs. Während einzelne Tiere also über den gesamten Beobachtungszeitraum keine Zeichen einer EAE entwickelten, zeigte sich bei anderen Tieren vor allem in der Kontrollgruppe verspätet ein rasch progredienter Krankheitsverlauf (**Abbildung 3-18, B**).

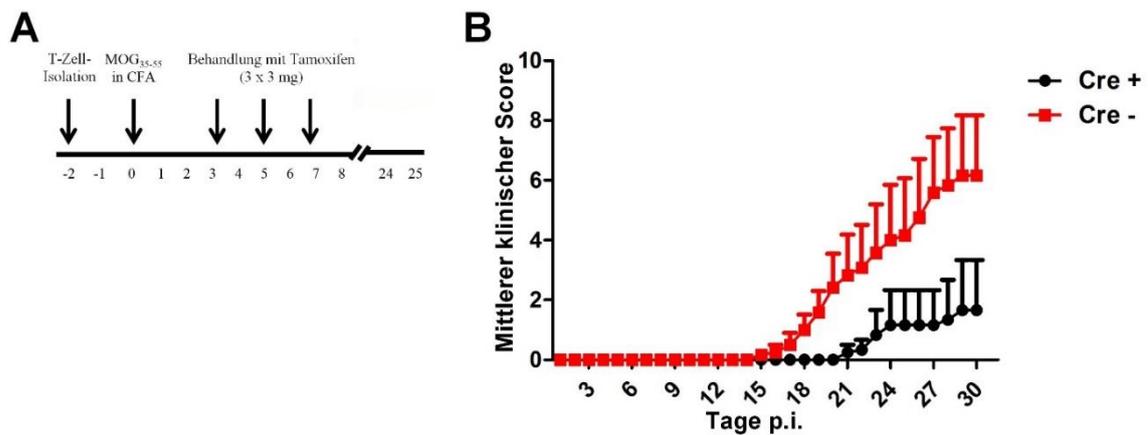


Abbildung 3-18: Klinischer Verlauf in OT II-Mäusen nach T-Zell-Transfer

(A) Die Tiere wurden zwei Tage nach dem Transfer MOG-spezifischer T-Zellen mit je 50 µg MOG₃₅₋₅₅ immunisiert. Beginnend am Tag 3 p. i. wurden die Tiere mit je 3 mg Tamoxifen behandelt und der klinische Verlauf beobachtet. (B) Jeweils sechs Cre⁺- und Cre⁻-Tiere wurden – wie im Schema (A) beschrieben – behandelt und beginnend am Tag 10 p. i. im Hinblick auf klinische Zeichen einer EAE gescort. Die Ergebnisse sind als mittlerer klinischer Score (\pm Standardfehler) gegen die Tage nach Immunisierung aufgetragen. Für die statistische Auswertung wurde ein Mann-Whitney-U-Test durchgeführt. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede.

$n = 6$

Dieses Modell ist dahingehend unzureichend, dass einerseits die Inzidenz nicht 100% beträgt und es andererseits erst deutlich verspätet zum Auftreten klinischer Symptome gekommen ist. Aus diesem Grunde wurden in einem nächsten Versuch zusätzlich MOG-spezifische B-Zellen isoliert und den Mäusen – gemeinsam mit den schon im vorigen Versuch transferierten MOG-spezifischen T-Zellen – injiziert. Das weitere Vorgehen war analog zum vorigen Protokoll, wie in **Abbildung 3-18** (A) beschrieben.

Dieser zusätzliche Transfer MOG-spezifischer B-Zellen sollte die Unterschiede im klinischen Verlauf in Abhängigkeit von der Expression von CD28 verdeutlichen. Aus vorhergehenden Untersuchungen war bereits bekannt, dass MOG-spezifische B-Zellen in diesem Modell die eigentlich T-Zell-vermittelte EAE noch zusätzlich verstärken (Barr et al. 2012; Flach et al. 2016).

Bei der klinischen Beurteilung zeigte sich von Beginn an ein deutlicher Unterschied zwischen den beiden Kohorten. Bei den Cre⁻-Tieren entwickelte sich früh eine rasch progrediente, fulminant verlaufende EAE mit einer Inzidenz von 100%. Die Cre⁺-Tiere hingegen waren fast vollständig geschützt. Lediglich vereinzelt traten erst ab dem 24. Tag p. i. milde Krankheitssymptome auf (**Abbildung 3-19**). Die Deletion von CD28 in transferierten, MOG-spezifischen T-Lymphozyten führt also ebenfalls zu einem deutlich abgemilderten Krankheitsverlauf.

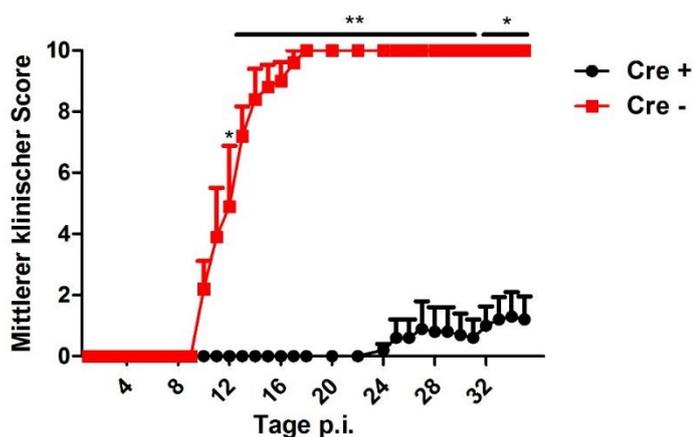


Abbildung 3-19: Klinischer Verlauf in OT II-Mäusen nach B- & T-Zell-Transfer

Jeweils fünf Cre⁺- und Cre⁻-Tiere wurden zwei Tage nach dem Transfer MOG-spezifischer B- und T-Zellen mit je 50 µg MOG₃₅₋₅₅ immunisiert. Beginnend am Tag 3 p. i. wurden die Tiere mit je 3 mg Tamoxifen behandelt und beginnend am Tag 10 p. i. im Hinblick auf klinische Zeichen einer EAE gescort. Die Ergebnisse sind als mittlerer klinischer Score (\pm Standardfehler) gegen die Tage nach Immunisierung aufgetragen. Für die statistische Auswertung wurde ein Mann-Whitney-U-Test durchgeführt. Es sind ausschließlich signifikante Unterschiede mit Sternchen markiert. $p \leq 0,05 \rightarrow *$; $p \leq 0,01 \rightarrow **$; $p \leq 0,005 \rightarrow ***$.

$n = 5$

4 Diskussion

Die genaue Pathogenese von MS ist – trotz umfangreicher Forschungsarbeiten in den vergangenen Jahrzehnten – bis heute nur unzureichend geklärt. Ebenso wie bei dem Tiermodell, der EAE, ist nicht vollständig bekannt, was bei einzelnen Individuen zur Manifestation der Erkrankung führt, während andere gesund bleiben. Sicher ist jedoch, dass dabei das sog. zweite Signal bei der Aktivierung naiver T-Zellen eine entscheidende Rolle spielt. Von besonderer Bedeutung ist dabei die CD28-vermittelte Ko-Stimulation. Durch diese wird einerseits eine kompetente Immunabwehr sichergestellt, andererseits aber auch die Entstehung autoimmuner Krankheiten vermittelt, was durch zahlreiche Studien *in vivo* bestätigt werden konnte (Tada et al. 1999; Gogishvili et al. 2012). Insbesondere in der Pathogenese der EAE ist die CD28-vermittelte Ko-Stimulation von entscheidender Bedeutung (Oliveira-dos-Santos et al. 1999; Perrin et al. 1999a; Srinivasan et al. 2002).

4.1 Die induzierbare Deletion von CD28 stellt ein sinnvolles Werkzeug zur Untersuchung der Bedeutung von CD28 in der EAE dar

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Bedeutung CD28-vermittelter Ko-Stimulation in verschiedenen Phasen der EAE. Dabei lag ein besonderer Schwerpunkt auf der genauen Analyse, welche Auswirkungen die Blockade CD28-vermittelter Ko-Stimulation auf die Expression von Aktivierungsmarkern, die Produktion von Zytokinen sowie die Proliferation und Apoptosewahrscheinlichkeit von T-Zellen hat. Um diese Fragestellungen genau untersuchen zu können, wurde mit induzierbaren CD28-knockout-Mäusen gearbeitet (Feil et al. 1996; Seibler et al. 2003; Gogishvili et al. 2012). Diese haben den Vorteil, dass sie eine zeitlich definierte Deletion von CD28 erlauben. So fällt das Expressionslevel von CD28 – wie in Abschnitt 1.6.1 beschrieben – vier bis fünf Tage nach Behandlungsbeginn mit Tamoxifen auf das Niveau von CD28^{-/-}-Mäusen.

Ein weiterer bedeutsamer Vorteil dieser Methode ist, dass sie die Reifung der T-Zellen im Thymus nicht beeinträchtigt. Auch wenn für konventionelle CD28-knockout-Mäuse beschrieben wurde, dass die Entwicklung von T-Zellen im Thymus hinsichtlich der Expression u. a. von CD4 und CD8 auch in Abwesenheit von CD28 normal verläuft (Shahinian et al. 1993), so ist nicht auszuschließen, dass stattdessen andere ko-stimulatorische Signalwege den Wegfall der CD28-vermittelten Ko-Stimulation kompensieren. Dies führt möglicherweise zu einem veränderten Verhalten der T-Zellen hinsichtlich Affinität bzw. Avidität des TCR. Ebenso ist es denkbar, dass die Abwesenheit von CD28 zu diesem frühen Zeitpunkt ein anderes T-Zell-Repertoire hervorbringt. Durch eine derart veränderte Differenzierung

und Aktivierung der Lymphozyten ergibt sich eine deutlich eingeschränkte Aussagekraft des konventionellen CD28-Knockouts in Bezug auf die Auswirkungen einer Deletion von CD28 auf das Verhalten aktivierter Lymphozyten und die daraus resultierenden klinischen Folgen.

Des Weiteren wird, im Gegensatz zum konventionellen Knockout, durch den induzierbaren Knockout mittels Tamoxifen nicht nur Exon 2, welches für die extrazelluläre Komponente, sondern zusätzlich auch das für die Transmembran-Komponente von CD28 kodierende Exon 3 (Harper et al. 1991) deletiert. Auf diese Weise wird eine akzidentelle, periphere Aktivierung des Signalwegs von CD28 durch die räumliche Nähe der aktivierenden Kinasen ausgeschlossen. Diese erscheint insbesondere möglich, da eine suffiziente Synthese der Transmembran-Komponente zur Folge hätte, dass das Protein an die richtige Stelle innerhalb der Zelle transportiert wird. Des Weiteren könnte möglicherweise auch durch eine Dimerisierung von CD28 die Signalkaskade in Gang gesetzt werden.

Gleichzeitig ist es wichtig, auch die Negativkontrollen – also jene Mäuse, bei denen CD28 nicht deletiert wird – mit Tamoxifen zu behandeln, da unter einer Behandlung mit Tamoxifen ein abgeschwächter klinischer Verlauf der EAE und eine reduzierte Demyelinisierungsrate beschrieben wurden (Bebo et al. 2009). Auf diese Weise wird eine optimale Vergleichbarkeit der beiden Kohorten gewährleistet.

4.2 Auswirkungen der Deletion von CD28 vor Symptombeginn

4.2.1 Die Deletion von CD28 führt zu einer deutlichen Reduktion aktivierter T-Zellen

Um die Auswirkungen der CD28-vermittelten Ko-Stimulation auf die Expression von Aktivierungsmarkern zu untersuchen, wurde die Deletion von CD28 vor Symptombeginn induziert und am Tag 6 p. i. und am Tag 8 p. i. die Expression von CD25 und CD69 einerseits sowie CD44 und CD62L andererseits untersucht. Dabei zeigte sich eine reduzierte Expression von CD25 nach acht Tagen in Abwesenheit von CD28, wobei unklar bleibt, welche Subpopulation der T-Zellen für diesen Unterschied verantwortlich ist, möglicherweise sind dies T_{Reg} -Zellen. Von Salomon et al. (2000) wurde beschrieben, dass die CD28-vermittelte Ko-Stimulation für die Differenzierung in regulatorische T-Zellen essentiell ist. Auf mögliche Auswirkungen der Deletion von CD28 auf die Homöostase der T_{Reg} -Zellen werde ich in Abschnitt 4.3.4 genauer eingehen. CD25 ist aber nicht nur ein Marker für regulatorische T-Zellen, sondern wird außerdem auch auf aktivierten Effektor-T-Zellen hochreguliert (Malek 2008; Secor et al. 2009). Die vorliegenden Ergebnisse können also einen ersten Hinweis darauf geben, dass der Anteil aktivierter T-Zellen abnimmt. Diese Ergebnisse sind in Übereinstimmung mit der Beobachtung, dass die Expression von CD25

ebenso wie die des dazugehörigen Liganden IL-2 durch CD28 induziert wird (Chen & Flies 2013).

Bei Betrachtung der unterschiedlichen Expressionslevels von CD69 fiel weder am Tag 6 p. i. noch am Tag 8 p. i. ein signifikanter Unterschied zwischen den iCD28ko-Mäusen und der Kontrollgruppe auf. Es ist seit Längerem bekannt, dass CD69 schon sehr früh nach Aktivierung der T-Zellen auf der Oberfläche exprimiert wird (Testi et al. 1989a). Diese Expression ist jedoch nur vorübergehend. Das Maximum der Expression von CD69 wird 18 - 24 Stunden nach Aktivierung erreicht und in der Folge geht die Expression von CD69 wieder zurück (Testi et al. 1989a). Es war daher zu erwarten, dass zum Entnahmezeitpunkt sechs bzw. acht Tage nach Immunisierung kein Unterschied in Bezug auf die Expression von CD69 in Abhängigkeit von CD28 erkennbar ist.

Im Gegensatz dazu zeigt sich am Tag 8 p. i. ein deutlich gesteigertes Expressionslevel von CD44 in der Kontrollgruppe. Als klassischer Aktivierungsmarker verstärkt die Expression von CD44 über eine gesteigerte Langlebigkeit der T-Zellen das klinische Erscheinungsbild der EAE (Ghazi-Visser et al. 2013) und dient der Identifizierung von Gedächtniszellen (Budd et al. 1987). Gleichzeitig ist CD44 aber auch ein wichtiges Adhäsionsmolekül, welches die Impermeabilität der Blut-Hirn-Schranke vermittelt. Auf diese Weise kann ein Knockout von CD44 über ein relatives Übergewicht der T_H17-Zellen sogar zu einer Aggravation der EAE führen (Flynn et al. 2013). Insgesamt scheint aber die proinflammatorische Rolle von CD44 bedeutsamer zu sein. So zeigten Guan et al. (2011), dass die Expression von CD44 auf CD4⁺-T-Zellen essentiell für die Entwicklung der EAE ist. Die funktionelle Bedeutung von CD44 in der Genese autoinflammatorischer Prozesse wird verdeutlicht durch die Beobachtung, dass die Bindung an CD44 mit einer Aktivierung der Phosphoinositid-3-Kinase (welche ebenfalls in der Signalkaskade von CD28 eine Rolle spielt) assoziiert ist (Baaten et al. 2013).

Konsistent dazu sind die Expressionsanalysen von CD62L: so wie CD44 in Abwesenheit von CD28 herunterreguliert wird, ist die Expression von CD62L in den Tieren der Kontrollgruppe am Tag 8 p. i. deutlich reduziert. CD62L ist wichtig für die Migration naiver T-Zellen in die Lymphknoten, spielt aber in der Effektorphase der EAE keine Rolle mehr (Baaten et al. 2013). Dies verdeutlicht, dass sich CD62L – insbesondere bei gleichzeitiger Betrachtung der Expression von CD44 – hervorragend als Marker für die Aktivierung von T-Zellen, sowie für die Bildung von Gedächtniszellen eignet. Insgesamt zeigen die vorliegenden Ergebnisse deutlich, dass die Abwesenheit CD28-vermittelter Ko-Stimulation zu einer signifikanten Reduktion aktivierter T-Zellen (CD44^{high} CD62L^{low}) und entsprechend erhöhten Anteilen naiver T-Zellen (CD44^{low} CD62L^{high}) führt. Besonders schön ist dabei die Bedeutung der Kinetik der CD28-Deletion (vgl. 1.6.1) erkennbar: So sind am Tag 6 p. i. Unterschiede in den beiden Gruppen lediglich angedeutet zu erkennen, während am Tag 8 p. i. – also wenn CD28 weitestgehend von der Zelloberfläche verschwunden ist – die Diskrepanz zwischen der Kontrollgruppe und den iCD28ko-Mäusen sehr deutlich zutage tritt.

4.2.2 Die Deletion von CD28 führt möglicherweise zu einer reduzierten Zytokinproduktion

Neben den Auswirkungen einer Deletion von CD28 auf das Verhältnis aktivierter und naiver Zellen war von Interesse, wie sich die Produktion der Zytokine Interferon- γ und IL-17 in Abwesenheit von CD28 verändert. Dabei zeigte sich in Bezug auf Interferon- γ ein Trend in Richtung einer reduzierten Expression in den iCD28ko-Mäusen. Die Ergebnisse für IL-17 waren hingegen recht widersprüchlich. Ebenso wurden PCRs durchgeführt, um das Niveau der Genexpression beurteilen können. Diese zeigten ebenfalls eine leichte Tendenz zu einer reduzierten Genexpression in Abwesenheit von CD28, jedoch sind diese Ergebnisse bis dato nur vorläufig und müssen bestätigt werden. Es scheint allerdings so, dass insbesondere diese beiden Zytokine in der Pathogenese der EAE eine wichtige Rolle spielen. So wurde beobachtet, dass Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke Rezeptoren u. a. für IL-17 besitzen, die es IL-17 ermöglichen, die Durchlässigkeit der Blut-Hirn-Schranke zu steigern. Aufgrund dieser gesteigerten Durchlässigkeit in Anwesenheit von T_H17 -Zellen fällt es $CD4^+$ -T-Zellen leichter in das ZNS zu migrieren (Kebir et al. 2007).

Des Weiteren wurde beschrieben, dass die Produktion von IL-17 v. a. durch Gliazellen in aktiven Läsionen mit der Krankheitsaktivität von MS korreliert (Tzartos et al. 2008) – eine Beobachtung, die sich auch im Tiermodell bestätigte (Gold & Lühder 2008). Ebenso zeigte sich bei MS-Patienten sowohl im Serum als auch im Liquor ein erhöhter Anteil an Zellen, die IL-17 mRNA exprimieren (Matusevicius et al. 1999). Interessant ist auch die Betrachtung lokaler Unterschiede: Ein Übergewicht von IL-17-produzierenden T_H17 -Zellen im Vergleich zu T_H1 -Zellen in den Meningen führt zu einer Infiltration des Parenchyms mit Inflammation im Gehirn, während es sonst in erster Linie zu einer Entzündungsreaktion im Rückenmark kam. Dies wird dadurch erklärt, dass durch T_H17 -Zellen produziertes IL-17 die Rekrutierung inflammatorischer Zellen in das Gehirn erleichtert, aber in Bezug auf die Induktion der Entzündung im Rückenmark nicht so bedeutsam zu sein scheint. Hierbei spielen offenbar T_H1 -Zellen eine wichtigere Rolle (Goverman 2009). Dies würde dann allerdings auch nahelegen, dass IL-17 unter Umständen in der Pathogenese der EAE nicht entscheidend ist.

Jedoch zeigte sich bei einer Behandlung von Mäusen mit Anti-IL-17-Antikörpern eine weniger ausgeprägte EAE-Symptomatik, ohne jedoch die Entstehung der EAE völlig unterdrücken zu können. IL-17 scheint vor allem in der akuten Entzündung für das klinische Outcome von Bedeutung zu sein (Mardiguian et al. 2013; Knier et al. 2015). Darüber hinaus zeigten sich auch bei der Multiplen Sklerose positive Effekte nach einer Behandlung mit Secukinumab, einem monoklonalen anti-IL-17-Antikörper. In einer klinischen Studie führte die Behandlung mit Secukinumab zu einer signifikant erniedrigten Anzahl neu aufgetretener Läsionen im Vergleich zur Placebo-Gruppe (Havrdová et al. 2016). Weiters scheint die Blockade von IL-17 auch das Ablaufen von Reparaturprozessen nach abgelaufener Neuroinflammation zu erleichtern (Kolbinger et al. 2016).

Im Gegensatz dazu ist die Expression von Interferon- γ für die Induktion von Inflammation im Rückenmark entscheidend, während es im Gehirn anti-inflammatorisch wirkt (Lees et al. 2008). Insbesondere scheint von Bedeutung zu sein, dass Interferon- γ in der EAE durch eine Induktion von *Tight Junction*-Proteinen die Integrität der Blut-Hirn-Schranke sicherstellt (Ni et al. 2014). Ähnlich wie bei IL-17 wurde auch die Expression von Interferon- γ in Monozyten, Mikroglia und Astrozyten mit der Krankheitsaktivität von MS assoziiert (Shabgah et al. 2014). Außerdem wurde beschrieben, dass Neuronen durch Interferon- γ die Expression von MHC I-Molekülen auf der Zelloberfläche hochregulieren, was sie anfälliger für die Apoptoseinduktion durch zytotoxische CD8⁺-T-Zellen macht (Frieze & Fugger 2005). Dieses „enigmatische Paradoxon“ der Wirkung von Interferon- γ wird verdeutlicht durch die Beobachtung, dass es bei der EAE in Gliazellen in niedrigen Dosen protektiv wirkt, während hohe Dosen zu einer Aggravation der Symptomatik führen (Ottum et al. 2015).

Bei der MS zeigte sich eher eine pro-inflammatorische Wirkung von Interferon als die Gabe von rekombinantem Interferon- γ zu einer Aggravation klinischer Symptome führte (Panitch et al. 1987). Damit übereinstimmend führte die Gabe von Interferon- γ -Antikörpern bei Patienten mit SP-MS zu einer signifikanten Verbesserung ihrer klinischen Symptomatik (Skurkovich et al. 2001). Außerdem zeigte sich eine positive Korrelation zwischen den Expressionslevels von Interferon- γ in V δ 1-T-Lymphozyten und axonalem Schaden sowie Inflammation (Singh et al. 2017).

Insgesamt ist die exakte Bedeutung dieser beiden Zytokine in der Pathogenese der EAE nicht abschließend geklärt. Sicher scheint jedoch, dass sowohl IL-17 als auch Interferon- γ einen großen Beitrag zur Entzündungsreaktion leisten. So führt die Hemmung der Produktion von IL-17 und Interferon- γ zu einem deutlich abgeschwächten klinischen Verlauf der EAE (Timilshina et al. 2017). Von besonderer Bedeutung für die Pathogenese der Neuroinflammation scheinen dabei jene Zellen zu sein, die sowohl Interferon- γ als auch IL-17 exprimieren (Korn & Kallies 2017).

Neben weiteren Experimenten zur genaueren Beurteilung dieser beiden Zytokine in der Entstehung der Neuroinflammation scheint auch die Untersuchung von GM-CSF lohnenswert: So zeigte sich in älteren Studien, dass in Abwesenheit von GM-CSF keine EAE induziert werden kann (McQualter et al. 2001; Codarri et al. 2011). Dieses Zytokin scheint also als zentraler Mediator in der Vermittlung der Autoinflammation zu fungieren (Becher et al. 2016). Jedoch konnten Pierson & Goverman (2017) zeigen, dass auch bei GM-CSF-defizienten Mäusen eine EAE induziert werden kann, indem die Aktivität von IL-17 das Fehlen von GM-CSF kompensiert. Beide Proteine unterstützen eine neutrophile Akkumulation im ZNS, was als essentiell für die Induktion von zentralnervöser Autoimmunität angesehen wird.

In der Zusammenschau lässt sich also folgern, dass für die Induktion von Neuroinflammation ein Zusammenspiel von Interferon- γ , IL-17 und GM-CSF bedeutsam ist und dement-

sprechend eine suffiziente Therapie möglicherweise an all diesen Angriffspunkten gleichzeitig ansetzen muss (Pierson & Goverman 2017).

4.2.3 Die Proliferationsrate MOG-spezifischer CD4⁺-T-Zellen ist bei Deletion von CD28 reduziert

Zur genaueren Untersuchung der Auswirkungen einer Deletion von CD28 vor Symptombeginn wurde in weiteren Versuchen die Proliferationsrate MOG-spezifischer CD4⁺-T-Zellen untersucht. Dabei konnte die Aussagekraft der durchgeführten Experimente dadurch gesteigert werden, dass das Verhalten der verschiedenen Zellpopulationen (Cre⁺ und Cre⁻) gleichzeitig in einem Individuum beobachtet werden konnte, indem durch die unterschiedliche Fluoreszenzmarkierung (vgl. 3.1.4) diese sicher voneinander abgegrenzt werden konnten. Mit diesem geschickten Ansatz ist es also möglich, das Proliferationsverhalten MOG-spezifischer T-Zellen in Abhängigkeit von CD28 ohne interindividuelle Unterschiede, die die Resultate möglicherweise verfälschen könnten, zu analysieren. Daher ist, trotz der relativ niedrigen Fallzahlen (Tag 6 p. i.: n = 2, Tag 8 p. i.: n = 3), eine fundierte Aussage möglich. Ähnlich wie bei den Aktivierungsmarkern (vgl. 4.2.1) ist auch hier wieder die Bedeutung der Kinetik der Deletion von CD28 erkennbar: So zeigten sich am Tag 6 p. i. mit der beginnenden Reduktion der Expression von CD28 im Vergleich der nicht- bzw. maximal proliferierten Zellen keine Unterschiede – allenfalls in den Histogrammen war ein Unterschied in Bezug auf die Zellen, die sich einmal geteilt hatten, erkennbar. Am Tag 8 p. i. hingegen zeigten sich deutliche Unterschiede. Der Anteil proliferierter Zellen war in Abwesenheit von CD28 deutlich reduziert. Dies zeigt sich besonders deutlich in den beispielhaft angeführten Histogrammen (vgl. **Abbildung 3-10** & **Abbildung 3-12**).

Diese Ergebnisse sind konsistent mit der Beobachtung, dass die Antikörper-vermittelte Blockade der Interaktion zwischen B7 und CD28 zu einer reduzierten Proliferation MBP-spezifischer T-Zellen *in vivo* führt (Perrin et al. 1995; Racke et al. 1995). Des Weiteren ist bekannt, dass die Abwesenheit ko-stimulatorischer Signale während des Primings die klonale Expansion antigen-spezifischer T-Zellen deutlich beeinträchtigt (Guðmundsdóttir et al. 1999).

Interessant ist hingegen, dass der Anteil proliferierter Cre⁺-Zellen am Tag 8 p. i. niedriger ist als am Tag 6. Diese Beobachtung verdient genauere Untersuchungen im Hinblick auf die Frage, ob neue Zellen in die verschiedenen Gewebetypen (Milz und Lymphknoten) eingewandert sind und falls ja, woher diese Zellen kommen. Möglicherweise ist das Priming der T-Zellen am Tag 6 p. i. noch nicht vollständig abgeschlossen, sodass zu diesem Zeitpunkt auch die Migration der Zellen noch nicht beendet sein kann. Eine weitere Erklärung könnte sein, dass die proliferierten T-Zellen die Lymphknoten schon wieder verlassen haben. Dies würde auch die prozentuale Zunahme der nicht-proliferierten Zellen erklären. Außerdem ist darüber hinaus noch völlig unklar, aus welchem Grund diese Zellen nicht

proliferiert sind. Genauer zu untersuchen wäre zusätzlich noch, welcher Subpopulation diese Zellen angehören, um so einschätzen zu können, welchen Effekt sie auf die Pathogenese der Neuroinflammation haben.

Des Weiteren wäre interessant zu erfahren, woher die Zellen in die verschiedenen Gewebetypen migriert sind. Die Migration von T-Zellen ist auch insgesamt ein Sachverhalt, der für diese Arbeit nicht untersucht wurde, aber in Zusammenhang mit den Auswirkungen der CD28-vermittelten Ko-Stimulation von Bedeutung ist. Es wurde beschrieben, dass ein wichtiger Mechanismus der Wirksamkeit von Glukokortikoiden in der Therapie von EAE und MS die Beeinflussung der Migration von T-Zellen durch eine veränderte Attraktion zu verschiedenen Chemokinen darstellt (Schweingruber et al. 2014). Darüber hinaus scheint die Migrationsfähigkeit autoreaktiver T-Zellen bei Deletion von CD28 eingeschränkt zu sein (Eckert 2014). Um das Gesamtbild in Bezug auf die Bedeutung von CD28 für die Vermittlung der Neuroinflammation zu vervollständigen, wäre es sinnvoll, auch dieses Teilgebiet weiter zu untersuchen.

Weiterführende Experimente sollten sich außerdem mit der Zytokinproduktion der proliferierten Zellen beschäftigen, um zu untersuchen, ob sich diese in einem vergleichbaren Verhältnis wie die Proliferation ändert. Gleichwohl steigt damit natürlich auch die Komplexität in der Durchführung dieses ohnehin schon recht vielschichtigen Experimentes. Des Weiteren wäre interessant zu beobachten, wie sich das Proliferationsverhalten zytotoxischer CD8⁺-T-Zellen in Abwesenheit von CD28 ändert und ob diese sich ähnlich verhalten wie die CD4⁺-T-Zellen.

4.3 Auswirkungen der Deletion von CD28 am Höhepunkt der EAE

4.3.1 CD28 spielt eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der klinischen Symptomatik

Zur Beurteilung der Bedeutung von CD28 am Höhepunkt der klinischen Manifestation der EAE wurde in weiteren Versuchen ein späterer Zeitpunkt für die Deletion von CD28 gewählt. Auf diese Weise war es möglich, ein normales Priming der T-Zellen sowie eine suffiziente klinische Manifestation der EAE zu gewährleisten und spezifisch die Rolle von CD28 beim Unterhalten der Entzündungsreaktion zu beurteilen. Dabei wurde in einem ersten Versuch eine EAE in iCD28ko-Mäusen induziert, bei welchen durch Tamoxifengabe eine Deletion von CD28 induziert werden kann (vgl. 1.5) und diese mit Cre⁻-Mäusen verglichen. Dabei zeigte sich initial etwa bis zum Tag 14 p. i. in beiden Gruppen ein fast identischer Krankheitsverlauf. In den folgenden Tagen zeigte sich bei den Tieren der Kontrollgruppe ein gleichbleibender klinischer Zustand, während sich die iCD28ko-Mäuse zeitlich zusammenhängend mit dem Verlust der Expression von CD28 auf der Zelloberfläche

rasch erholten und schon wenige Tage nach Deletion von CD28 nur noch leichte Residuen erkennbar waren.

Der Verlust von CD28 auf aktivierten T-Zellen führt also auch noch nach stattgefundenem Priming der T-Zellen zu einer deutlich reduzierten Immunantwort und zeigt, dass dieser Mechanismus einen vielversprechenden Ansatz darstellt, eine stattfindende Autoimmunerkrankung zu kontrollieren und die klinischen Auswirkungen, z. B. von MS zu reduzieren. Aus diesem Grunde erfolgten weitere Experimente, um die genauen Mechanismen, wie diese reduzierte klinische Symptomatik nach Deletion von CD28 vermittelt wird, zu untersuchen. Dies geschah im Hinblick auf Aktivierungsmarker, Apoptose und mögliche Effekte regulatorischer T-Zellen, wie es in den folgenden Abschnitten diskutiert wird.

4.3.2 Die CD28-vermittelte Ko-Stimulation führt zu einem größeren Anteil aktivierter T-Zellen

Um genauer eingrenzen zu können, über welchen Mechanismus CD28 die klinische Symptomatik aufrechterhält, wurde außerdem die Expression von CD44 und CD62L am Tag 18 p. i. untersucht. Wie unter 4.2.1 beschrieben eignen sich diese beiden Oberflächenproteine sehr gut zur Identifizierung aktivierter und naiver T-Zellen. Dabei zeigte sich eine deutliche Diskrepanz in Abhängigkeit von der Expression von CD28: Während bei der Negativkontrolle der Anteil aktivierter T-Zellen insbesondere in den drainierenden Lymphknoten deutlich erhöht war, konnten bei den iCD28ko-Mäusen größere Anteile naiver T-Zellen gemessen werden.

Zusammengefasst zeigten diese Versuche, dass die CD28-vermittelte Ko-Stimulation nicht nur für die Initiation der Neuroinflammation bedeutsam ist, sondern darüber hinaus auch in wesentlichem Maße zur Unterhaltung der Entzündungsreaktion und weiteren Aktivierung der T-Lymphozyten beiträgt. Dies wird unterstützt durch die Beobachtung, dass CD28 auch nach dem Priming für eine suffiziente Produktion von IL-2, sowie für eine adäquate Akquisition und damit für die Expansion aktivierter CD4⁺-T-Zellen erforderlich ist (Linterman et al. 2014). Auch zeigte sich, dass die CD28-vermittelte Ko-Stimulation für die Entwicklung von Gedächtniszellen und damit einer verstärkten Immunantwort bei erneuter Antigenpräsentation wichtig ist (Ndlovu et al. 2014).

Ein weiterer interessanter Aspekt bei der Auswertung dieser Experimente ist außerdem der Vergleich der Anteile aktivierter und naiver Zellen am Tag 6 p. i. und am Tag 8 p. i. einerseits sowie am Tag 18 p. i. andererseits. Dabei zeigten sich zum frühen Zeitpunkt etwas niedrigere Anteile naiver T-Zellen in den Tieren der Negativkontrolle, während sich der Anteil naiver T-Zellen in den Cre⁺-Mäusen am Tag 8 p. i. auf einem vergleichbaren Niveau wie am Tag 18 p. i. bewegte. Insgesamt fällt auf, dass die Unterschiede zwischen den beiden Kohorten am Tag 18 p. i. deutlicher sind als zu den früheren Zeitpunkten. Für eine genauere Analyse des zeitlichen Verlaufs der Auswirkungen der Deletion von CD28 wäre

daher interessant, wie sich das Verhältnis aktivierter und naiver T-Zellen zueinander an den dazwischenliegenden Tagen entwickelt. Eine Aufbereitung zu Beginn der klinischen Symptomatik erscheint daher sinnvoll, um genauer beurteilen zu können, ob die CD28-vermittelte Ko-Stimulation zu jedem Zeitpunkt zum Erhalt der Entzündungsreaktion gleichermaßen erforderlich ist.

4.3.3 Die Deletion von CD28 führt zu einer gesteigerten Apoptose

Um genauer zu untersuchen, auf welche Art und Weise CD28 zum Erhalt der Entzündungsreaktion – wie im vorigen Abschnitt beschrieben – beiträgt, wurde untersucht, welche Auswirkungen die Deletion von CD28 am Höhepunkt der EAE auf die Apoptosewahrscheinlichkeit CD4⁺-T-Zellen hat. Dies erscheint als möglicher Mechanismus plausibel, da CD28 die Expression anti-apoptotischer Faktoren wie Bcl-xL induziert, wie in Abschnitt 1.3.1 beschrieben.

Für diese Experimente wurde mittels Färbung mit Annexin V die Anzahl apoptotischer Zellen insgesamt beurteilt, darüber hinaus aber auch durch Färbung mit 7-AAD genauer differenziert, in welcher Phase der Apoptose sich die Zellen jeweils befinden. Dabei zeigte sich bei der Betrachtung aller apoptotischen Zellen, dass die Deletion von CD28 zu einer gesteigerten Induktion der Apoptose führt, besonders deutlich erkennbar in den drainierenden Lymphknoten. Interessant ist aber vor allem auch die genaue Differenzierung mittels 7-AAD: Hier zeigte sich, dass die Anteile spätapoptotischer Zellen in beiden Gruppen gleich waren und der Unterschied zwischen den beiden Kohorten ausschließlich in Bezug auf die frühapoptotischen Zellen signifikant war. Hierbei war in allen Ursprungsgeweben (Milz & Lymphknoten) eine deutlich reduzierte Apoptoserate in den Tieren der Negativkontrolle erkennbar, welche in den verschiedenen Geweben relativ konstant bei 15% der CD4⁺-T-Zellen lag. Die Rate apoptotischer Zellen in den Cre⁺-Mäusen war deutlich erhöht. Dies legt also nahe, dass die Deletion von CD28 in dieser Phase pro-apoptotisch wirkt.

Diese Ergebnisse sind insofern ein wenig überraschend, da die (vorläufigen) Ergebnisse vorheriger Versuche zeigten, dass die Menge der CD4⁺-T-Zellen im Rückenmark in Cre⁺- und Cre⁻-Mäusen nach Induktion einer EAE ähnlich ist (Eckert 2014). Dieser scheinbare Widerspruch lässt sich möglicherweise dadurch erklären, dass der Unterschied vor allem bei den frühapoptotischen Zellen erkennbar war und sich diese Differenz möglicherweise noch nicht auf die absolute Zellzahl im Rückenmark ausgewirkt hat. Es scheint auf jeden Fall sinnvoll, die Anzahl CD4⁺-T-Zellen histologisch genau zu bestimmen und durch Färbung mit Annexin V und 7-AAD eine Aussage bezüglich der Apoptoserate in den T-Zellen im Rückenmark treffen zu können.

Insgesamt scheint es plausibel, dass die Deletion von CD28 zu einer gesteigerten Apoptoserate führt, da die CD28-vermittelte Ko-Stimulation eine reduzierte Expression von

CD95L (oder auch FasL) bewirkt, welcher über die Bindung an seinen Rezeptor Apoptose vermittelt (Kirchhoff et al. 2000). Durch eine reduzierte Expression dieses Proteins wird also die Überlebenswahrscheinlichkeit von Zellen gesteigert.

Des Weiteren führt eine Deletion von CD28 auch nach Beginn der klinischen Symptomatik – und dementsprechend auch nach stattgehabten Priming – zu einer Abnahme der Expression des anti-apoptotischen Moleküls Bcl-xL und von ICOS, einem ko-stimulatorischen Molekül der CD28-Familie (Linterman et al. 2014).

Zusammenfassend lässt sich daher folgern, dass die Aufrechterhaltung der Neuroinflammation durch Hemmung der Apoptose durch CD28-vermittelte Ko-Stimulation gut vorstellbar ist, sodass weitere Experimente zu den genauen Mechanismen, über welche CD28 die Apoptoserate reduziert, sinnvoll erscheinen. Dies gilt auch im Hinblick auf die zeitliche Komponente, um genauer beurteilen zu können, ob es zu einem späteren Zeitpunkt als im durchgeführten Versuch zu einem gesteigerten Anteil spätapoptotischer Zellen und in der Folge zu Unterschieden in der Zellzahl CD4⁺-T-Zellen im Rückenmark kommt, was nach den bis dato vorliegenden Ergebnissen zu erwarten ist.

4.3.4 Regulatorische T-Zellen sind wahrscheinlich nicht verantwortlich für einen milderen Krankheitsverlauf in Abwesenheit von CD28

Um den Effekt einer Deletion von CD28 auf die Homöostase von regulatorischen T-Zellen zu untersuchen, wurde der Anteil regulatorischer T-Zellen nach Tamoxifengabe ab Tag 12 p. i. nach bekanntem Schema in Cre⁺- und Cre⁻-Tieren untersucht. Im Gegensatz zu den vorherigen Versuchen wurde neben Gewebe aus Milz und Lymphknoten auch Rückenmarksgewebe untersucht. Dabei zeigte sich in allen vier Gewebetypen eine leichte Tendenz in Richtung eines erhöhten Anteils regulatorischer T-Zellen bei den Tieren der Negativkontrolle. Diese Unterschiede waren jedoch so gering, dass in keinem Gewebe statistische Signifikanz erreicht wurde.

Diese Resultate legen nahe, dass der Anteil regulatorischer T-Zellen bei Deletion von CD28 erniedrigt zu sein scheint und dementsprechend T_{Reg}-Zellen eher nicht zu einer reduzierten klinischen Symptomatik in Abwesenheit beitragen. Der reduzierte Anteil regulatorischer T-Zellen lässt sich dadurch erklären, dass der CD28-vermittelte Signalweg auch für die Entwicklung dieses Zelltyps essentiell ist (Salomon et al. 2000). Dementsprechend führt CD28 unter bestimmten Bedingungen durch Induktion von T_{Reg}-Zellen zu einer abgeschwächten Autoimmunreaktion. So führte die Abwesenheit von CD28 im Tierversuch zur Aggravation von Diabetes Typ I bei gleichzeitig deutlich reduziertem Anteil regulatorischer T-Zellen (Salomon et al. 2000). Bei weiterführenden Versuchen mit diesem Tiermodell zeigte sich, dass CD28 zwar in der Initiation des Typ I-Diabetes bedeutsam ist, die klinische Symptomatik aber gleichzeitig durch eine CD28-vermittelte Proliferation regulatorischer T-Zellen kontrolliert wurde. Dies zeigt, dass die Rolle von CD28 in Bezug auf

Autoinflammation ambivalent ist und die klinische Symptomatik von einer kostimulatorisch kontrollierten Balance von T_{Reg}-Zellen und Effektor-T-Zellen abhängig ist (Bour-Jordan et al. 2004). In einer Phase I-Studie wurden kürzlich die gute Verträglichkeit einer daraufhin entwickelten Immuntherapie mit autologen polyklonalen T_{Reg}-Zellen für Patienten mit Typ I-Diabetes sichergestellt und weitergehende Studien angekündigt (Bluestone et al. 2015). Auch in Bezug auf EAE zeigte sich, dass CD28-defiziente T_{Reg}-Zellen ihre Fähigkeit verlieren, die Klinik der EAE effektiv zu unterdrücken (Zhang et al. 2013). Bei aus MS-Patienten isolierten T_{Reg}-Zellen zeigte sich, dass diese zwar in Bezug auf ihre Anzahl nicht vermindert, aber in ihrer immunosuppressiven Funktion eingeschränkt sind (Costantino et al. 2008; Baecher-Allan et al. 2011).

Die Auswirkungen der CD28-vermittelten Ko-Stimulation auf das Verhältnis von regulatorischen und Effektor-T-Zellen sind relativ komplex. So zeigte sich bei ersten Versuchen mit CD28-Superagonisten *in vivo*, dass es zwar initial zu einer polyklonalen T-Zell-Aktivierung kommt, diese jedoch schnell durch eine ausgeprägte Proliferation und Aktivierung regulatorischer T-Zellen eingedämmt wird und so zu einer klinischen Verbesserung in Tiermodellen autoinflammatorischer Erkrankungen, wie zum Beispiel bei mesangioproliferativer Glomerulonephritis, führt (Lin & Hünig 2003; Hünig 2007; Miyasato et al. 2011). Die Auswirkungen dieses Superagonisten auf die Homöostase regulatorischer T-Zellen in der EAE und schließlich auch die klinischen Auswirkungen in diesem Tiermodell sind bisher noch nicht abschließend geklärt, jedoch konnten Beyersdorf et al. (2005) zeigen, dass die Verabreichung sehr niedriger Dosen eines CD28-Superagonisten bei Ratten zu einer Expansion regulatorischer T-Zellen führte, ohne dass es zu einer generalisierten T-Zell-Aktivierung gekommen wäre. Darüber hinaus zeigten T_{Reg}-Zellen, die aus so behandelten Tieren isoliert wurden, eine ausgeprägte entzündungshemmende Aktivität und waren bei den Empfängertieren in der Lage, die klinische Manifestation einer EAE zu verhindern.

Dass sich diese Beobachtungen aus den präklinischen Versuchen nicht auch beim Menschen zeigten (vgl. 1.3.2), sondern es hierbei zu einer massiven Freisetzung proinflammatorischer Zytokine kam, liegt an einem ungünstigen Verhältnis regulatorischer und Effektor-T-Zellen beim Menschen im Gegensatz zum Tiermodell (Hünig 2012). Außerdem verlieren T-Zellen von Makaken – bei denen die Substanz ebenfalls getestet wurde – anders als humanen T-Zellen, während ihrer Differenzierung zu Effektorzellen die Expression von CD28 (Eastwood et al. 2010). Glücklicherweise konnte aber inzwischen eine Dosis gefunden werden, die zu einer fast vollständigen Reduktion der Produktion proinflammatorischer Zytokine bei gleichbleibender T_{Reg}-Zell-Aktivierung führt – eine Wirkung, die durch Gabe von Glukokortikoiden weiter unterstützt werden kann (Tabares et al. 2014). Auf diese Weise ist es also möglich, durch Aktivierung eines CD28-abhängigen Signalwegs, eine verlässliche Entzündungshemmung zu erreichen.

Gerade angesichts der dramatischen Ereignisse vor etwa zehn Jahren scheint es im Lichte dieser Ergebnisse sinnvoll, weiter zu untersuchen wie sich das Zusammenspiel zwischen

CD28 bzw. IL-2 einerseits sowie regulatorischen T-Zellen andererseits darstellt und welche Konsequenzen sich daraus in Bezug auf den Verlauf der EAE (und schließlich auch bei MS) ergeben. Die vorliegenden Ergebnisse dieser Arbeit liefern jedoch keinen Hinweis auf eine mögliche Einflussnahme regulatorischer T-Zellen auf den klinischen Verlauf der EAE in Abhängigkeit von CD28. Dies ist konsistent zu den Resultaten vorheriger Versuche im Institut für Multiple-Sklerose-Forschung (Eckert 2014).

Gleichwohl darf die Bedeutung regulatorischer T-Zellen in Bezug auf die Kontrolle zerebraler Inflammation nicht unterschätzt werden. Möglicherweise sind sie eher für die Wiederherstellung der Homöostase im ZNS beim Abklingen der Entzündungsreaktion verantwortlich (Korn & Kallies 2017).

4.4 Die Deletion von CD28 ausschließlich in transferierten T-Lymphozyten führt zu einem deutlich abgeschwächten Krankheitsverlauf

Um beurteilen zu können, ob die Deletion von CD28 auch dann zu einer milderen Klinik führt, wenn diese ausschließlich in MOG-spezifischen T-Zellen erfolgt (und nicht in anderen Zellen, welche normalerweise CD28 exprimieren), wurde außerdem ein Transfer MOG-spezifischer T-Zellen in OT II-Mäuse durchgeführt. Diese Tiere besitzen ausschließlich T-Zellen mit Rezeptoren gegen Ovalbumin, entwickeln also nach Immunisierung mit MOG₃₅₋₅₅ keine EAE. Beginnend am Tag 3 p. i. wurde den Tieren beider Kohorten Tamoxifen verabreicht. Dabei zeigte sich initial nur eine verzögerte Krankheitsmanifestation mit unvollständiger Inzidenz, sodass in einem weiteren Versuch zusätzlich MOG-spezifische B-Zellen injiziert wurden, um durch die T-Zell-B-Zell-Interaktion eine suffiziente Autoimmunreaktion zu gewährleisten. Bei diesem Versuch zeigte sich zwischen den beiden verschiedenen Kontrollgruppen ein dramatisch verschiedener Krankheitsverlauf: Während sämtliche Tiere der Negativkontrolle beginnend am Tag 10 p. i. rasch eine fulminante EAE entwickelten, waren die Cre⁺-Mäuse, welche CD28 verloren, fast vollständig geschützt.

Diese Ergebnisse sind interessant, da auch andere Populationen einen Beitrag zur Pathogenese der EAE liefern. So ist beispielsweise die Rolle von NK-Zellen in der Pathogenese nicht abschließend geklärt. In früheren Publikationen wurde den NK-Zellen eher eine protektive Rolle in Bezug auf Entwicklung einer EAE zugeschrieben, als die Antikörpervermittelte Depletion von NK-Zellen zu einer Aggravation der EAE führte (Zhang et al. 1997; Xu et al. 2005). Ebenso wurden NK-Zellen in Bezug auf Multiple Sklerose eher als protektiv eingeschätzt (Takahashi et al. 2004). Dungan et al. (2014) zeigten jedoch, dass die NK-Zell-vermittelte Sekretion von Interferon- γ für die Migration enzephalitogener T-Lymphozyten in das ZNS eine Schlüsselrolle spielt, also NK-Zellen eher proinflammato-

risch wirken. Die Rolle von NK-Zellen in Bezug auf die Pathogenese der EAE ist daher ambivalent. Auch diese Zellen exprimieren CD28, deshalb war es interessant zu erfahren, welche klinischen Auswirkungen eine Deletion von CD28 spezifisch in den MOG-spezifischen T-Lymphozyten hat.

Die im zweiten Versuch zusätzlich injizierten B-Zellen sind dabei vermutlich in erster Linie für die Aktivierung der ZNS-reaktiven T-Lymphozyten von Bedeutung – zumindest stellte sich diese Rolle in vergangenen Studien zu B-Zellen bei EAE als entscheidend dar (Pierson et al. 2014; Flach et al. 2016). Auch zeigte sich bei MS-Patienten, dass die Wirksamkeit von Therapien mit gegen B-Zellen gerichteten Antikörpern wie Rituximab nicht von Autoantikörper-Titern abhängig ist, was diese These unterstützt (Hauser et al. 2008).

Diese Ergebnisse unterstreichen die Bedeutung der enzephalitogenen T-Lymphozyten für die klinische Manifestation der EAE. Es lässt sich daher folgern, dass die CD28-vermittelte Ko-Stimulation in MOG-spezifischen Lymphozyten für die beschriebene Symptomatik in den OT II-Mäusen essentiell ist.

Entsprechend ließe sich in weiteren Experimenten analog zu den anderen Versuchen dieser Arbeit (vgl. Abschnitt 3.1) untersuchen, welcher Mechanismus bei Transfer und gezielter Deletion von CD28 in MOG-spezifischen T-Zellen für die mildere Klinik verantwortlich ist. Außerdem wäre interessant zu beobachten, wie sich der klinische Verlauf bei Transfer MOG-spezifischer T-Zellen in OT II-Mäusen mit Deletion von CD28 am Höhepunkt der EAE darstellt.

5 Zusammenfassung

Die CD28-vermittelte Ko-Stimulation ist äußerst wichtig in der Pathogenese der EAE. Um dies in verschiedenen Phasen zu untersuchen, wurden iCD28ko-Mäuse benutzt, die eine Deletion von CD28 erlauben, ohne die T-Zell-Reifung im Thymus zu beeinflussen.

Bei einer Deletion von CD28 vor Symptombeginn zeigte sich eine deutliche Abnahme des Anteils aktivierter T-Zellen, während die Expression früher Aktivierungsmarker auf gleichem Niveau wie in der Kontrollgruppe war. Die Auswirkungen einer Deletion von CD28 zum gleichen Zeitpunkt auf die Produktion pro-inflammatorischer Zytokine sind bis dato noch nicht abschließend geklärt und insbesondere im Hinblick auf die mRNA-Synthese der verschiedenen Zytokine (Interferon- γ & IL-17, aber auch GM-CSF) weiter zu untersuchen.

Außerdem konnte gezeigt werden, dass ein Verlust von CD28 zu einer reduzierten Proliferationsrate MOG-spezifischer T-Zellen führt. Dabei zeigte sich weiter, dass das Priming von T-Zellen möglicherweise länger dauert als bisher angenommen, da die Rate proliferierter Zellen in Abwesenheit von CD28 am Tag 8 p. i. niedriger war als zwei Tage zuvor.

Auch in der Effektorphase spielt CD28 für die Aufrechterhaltung der klinischen Symptomatik eine wichtige Rolle. Die Deletion von CD28 bei Induktion einer EAE in iCD28ko-Mäusen führte zu einem milderen Krankheitsverlauf und einem geringeren Anteil aktivierter T-Zellen. Die mildere Klinik bei Deletion von CD28 wird dabei möglicherweise durch eine Induktion der Apoptose aktivierter T-Lymphozyten vermittelt, wobei der genaue Mechanismus noch zu untersuchen ist. Des Weiteren ist die mildere Klinik in Abhängigkeit von CD28 eher nicht durch eine Induktion regulatorischer T-Zellen vermittelt.

Schließlich konnte gezeigt werden, dass die CD28-vermittelte Ko-Stimulation in MOG-spezifischen T-Lymphozyten für die Pathogenese der EAE essentiell ist, da die Deletion von CD28 spezifisch in diesen Zellen die Entwicklung klinischer Symptome verhinderte.

Auch wenn die genauen Mechanismen, wie CD28 zur Entstehung der EAE beiträgt und wie es die Entzündungsreaktion unterhält, noch nicht abschließend geklärt werden konnten, fanden sich potentielle Erklärungen, weshalb die Funktion autoreaktiver T-Zellen in Abwesenheit von CD28 beeinträchtigt ist. Besonders bedeutsam sind dabei die Erkenntnisse, dass 1. CD28 auch nach dem Priming der T-Zellen für eine suffiziente Aktivierung erforderlich ist, 2. die Proliferationsrate in Abwesenheit von CD28 deutlich reduziert ist, 3. die CD28-vermittelte Ko-Stimulation auch zur Aufrechterhaltung der Neuroinflammation erforderlich ist und dieses 4. auch durch eine Hemmung der Apoptose erreicht wird.

Die Konsistenz dieser Beobachtungen in Bezug auf die Rolle des ko-stimulatorischen Moleküls CD28 in verschiedenen Phasen der EAE bestätigt die Grundannahme, dass die Hemmung von CD28 einen vielversprechenden therapeutischen Ansatz darstellt und die Grundlage für weitere Experimente ist, um diesen Sachverhalt genauer zu untersuchen.

6 Literaturverzeichnis

- Aktas O, Ingwersen J, Kieseier BC, Küry P, Hohlfeld R, Hartung H-P (2011): Orales Fingolimod bei Multipler Sklerose. *Nervenarzt* 82, 215–225
- Ascherio A, Munger KL (2007): Environmental risk factors for multiple sclerosis. Part I: the role of infection. *Ann Neurol* 61, 288–299
- Ayache SS, Creange A, Farhat WH, Zouari HG, Mylius V, Ahdab R, Abdellaoui M, Lefaucheur J-P (2014): Relapses in multiple sclerosis: effects of high-dose steroids on cortical excitability. *Eur J Neurol* 21, 630–636
- Baaten BJG, Cooper AM, Swain SL, Bradley LM (2013): Location, location, location: the impact of migratory heterogeneity on T cell function. *Front Immunol* 4, 311
- Babbe H, Roers A, Waisman A, Lassmann H, Goebels N, Hohlfeld R, Friese M, Schröder R, Deckert M, Schmidt S (2000): Clonal expansions of CD8(+) T cells dominate the T cell infiltrate in active multiple sclerosis lesions as shown by micromanipulation and single cell polymerase chain reaction. *J Exp Med* 192, 393–404
- Baecher-Allan CM, Costantino CM, Cvetanovich GL, Ashley CW, Beriou G, Dominguez-Villar M, Hafler DA (2011): CD2 costimulation reveals defective activity by human CD4+CD25(hi) regulatory cells in patients with multiple sclerosis. *J Immunol* 186, 3317–3326
- Barnden MJ, Allison J, Heath WR, Carbone FR (1998): Defective TCR expression in transgenic mice constructed using cDNA-based alpha- and beta-chain genes under the control of heterologous regulatory elements. *Immunol Cell Biol* 76, 34–40
- Barr TA, Shen P, Brown S, Lampropoulou V, Roch T, Lawrie S, Fan B, O'Connor RA, Anderton SM, Bar-Or A (2012): B cell depletion therapy ameliorates autoimmune disease through ablation of IL-6-producing B cells. *J Exp Med* 209, 1001–1010
- Barrat F, Haegel H, Louise A, Vincent-Naulleau S, Boulouis HJ, Neway T, Ceredig R, Pilet C (1995): Quantitative and qualitative changes in CD44 and MEL-14 expression by T cells in C57BL/6 mice during aging. *Res Immunol* 146, 23–34
- Bartholomäus I, Kawakami N, Odoardi F, Schläger C, Miljkovic D, Ellwart JW, Klinkert, Wolfgang E F, Flügel-Koch C, Issekutz TB, Wekerle H (2009): Effector T cell interactions with meningeal vascular structures in nascent autoimmune CNS lesions. *Nature* 462, 94–98
- Bayas A, Rieckmann P (2000): Managing the adverse effects of interferon-beta therapy in multiple sclerosis. *Drug Saf* 22, 149–159

- Bebo BFJ, Dehghani B, Foster S, Kurniawan A, Lopez FJ, Sherman LS (2009): Treatment with selective estrogen receptor modulators regulates myelin specific T-cells and suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis. *Glia* 57, 777–790
- Becher B, Tugues S, Greter M (2016): GM-CSF: From Growth Factor to Central Mediator of Tissue Inflammation. *Immunity* 45, 963–973
- Bedoya SK, Lam B, Lau K, Larkin J3 (2013): Th17 cells in immunity and autoimmunity. *Clin Dev Immunol* 2013, 986789
- Bettelli E, Pagany M, Weiner HL, Linington C, Sobel RA, Kuchroo VK (2003): Myelin oligodendrocyte glycoprotein-specific T cell receptor transgenic mice develop spontaneous autoimmune optic neuritis. *J Exp Med* 197, 1073–1081
- Beyersdorf N, Gaupp S, Balbach K, Schmidt J, Toyka KV, Lin C-H, Hanke T, Hünig T, Kerkau T, Gold R (2005): Selective targeting of regulatory T cells with CD28 superagonists allows effective therapy of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med* 202, 445–455
- Bluestone JA, Buckner JH, Fitch M, Gitelman SE, Gupta S, Hellerstein MK, Herold KC, Lares A, Lee MR, Li K (2015): Type 1 diabetes immunotherapy using polyclonal regulatory T cells. *Sci Transl Med* 7, 315ra189
- Boise LH, Minn AJ, Noel PJ, June CH, Accavitti MA, Lindsten T, Thompson CB (1995): CD28 costimulation can promote T cell survival by enhancing the expression of Bcl-XL. *Immunity* 3, 87–98
- Boomer JS, Green JM (2010): An enigmatic tail of CD28 signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2, a002436
- Bour-Jordan H, Salomon BL, Thompson HL, Szot GL, Bernhard, Bluestone JA (2004): Costimulation controls diabetes by altering the balance of pathogenic and regulatory T cells. *J Clin Invest* 114, 979–987
- Bour-Jordan H, Esensten JH, Martinez-Llordella M, Penaranda C, Stumpf M, Bluestone JA (2011): Intrinsic and extrinsic control of peripheral T-cell tolerance by costimulatory molecules of the CD28/B7 family. *Immunol Rev* 241, 180–205
- Bretscher P, Cohn M (1970): A theory of self-nonself discrimination. *Science* 169, 1042–1049
- Browne P, Chandraratna D, Angood C, Tremlett H, Baker C, Taylor BV, Thompson AJ (2014): Atlas of Multiple Sclerosis 2013: A growing global problem with widespread inequity. *Neurology* 83, 1022–1024
- Budd RC, Cerottini JC, Horvath C, Bron C, Pedrazzini T, Howe RC, MacDonald HR (1987): Distinction of virgin and memory T lymphocytes. Stable acquisition of the Pgp-1 glycoprotein concomitant with antigenic stimulation. *J Immunol* 138, 3120–3129

- Caporro M, Disanto G, Gobbi C, Zecca C (2014): Two decades of subcutaneous glatiramer acetate injection: current role of the standard dose, and new high-dose low-frequency glatiramer acetate in relapsing-remitting multiple sclerosis treatment. *Patient Prefer Adherence* 8, 1123–1134
- Chen AI, McAdam AJ, Buhlmann JE, Scott S, Lupher, M L Jr, Greenfield EA, Baum PR, Fanslow WC, Calderhead DM, Freeman GJ (1999): Ox40-ligand has a critical costimulatory role in dendritic cell:T cell interactions. *Immunity* 11, 689–698
- Chen L, Flies DB (2013): Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. *Nat Rev Immunol* 13, 227–242
- Chitnis T, Najafian N, Abdallah KA, Dong V, Yagita H, Sayegh MH, Khoury SJ (2001): CD28-independent induction of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Clin Invest* 107, 575–583
- Codarri L, Gyölvézi G, Tosevski V, Hesske L, Fontana A, Magnenat L, Suter T, Becher B (2011): ROR γ drives production of the cytokine GM-CSF in helper T cells, which is essential for the effector phase of autoimmune neuroinflammation. *Nat Immunol* 12, 560–567
- Compston A (1988): The 150th anniversary of the first depiction of the lesions of multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 51, 1249–1252
- Compston A, Coles A (2008): Multiple sclerosis. *Lancet* 372, 1502–1517
- Corry DB, Reiner SL, Linsley PS, Locksley RM (1994): Differential effects of blockade of CD28-B7 on the development of Th1 or Th2 effector cells in experimental leishmaniasis. *J Immunol* 153, 4142–4148
- Costantino CM, Baecher-Allan C, Hafler DA (2008): Multiple sclerosis and regulatory T cells. *J Clin Immunol* 28, 697–706
- Cox BC, Liu Z, Mellado Lagarde MM, Zuo J (2012): Conditional Gene Expression in the Mouse Inner Ear Using Cre-loxP. *J Assoc Res Otolaryngol* 13, 295–322
- Curtsinger JM, Mescher MF (2010): Inflammatory cytokines as a third signal for T cell activation. *Curr Opin Immunol* 22, 333–340
- Daikh D, Wofsy D, Imboden JB (1997): The CD28-B7 costimulatory pathway and its role in autoimmune disease. *J Leukoc Biol* 62, 156–162
- DGN-Leitlinie Multiple Sklerose (2014): DGN-Leitlinie Diagnostik und Therapie der Multiplen Sklerose. *Akt Neurol* 41, 326–327
- Dietel M, Fauci AS: *Harrisons Innere Medizin*. 18. Auflage; ABW Wissenschaftsverlag, Berlin 2012

- Dungan LS, McGuinness NC, Boon L, Lynch MA, Mills KHG (2014): Innate IFN-gamma promotes development of experimental autoimmune encephalomyelitis: A role for NK cells and M1 macrophages. *Eur J Immunol* 44, 2903–2917
- Eastwood D, Findlay L, Poole S, Bird C, Wadhwa M, Moore M, Burns C, Thorpe R, Stebbings R (2010): Monoclonal antibody TGN1412 trial failure explained by species differences in CD28 expression on CD4+ effector memory T-cells. *Br J Pharmacol* 161, 512–526
- Eckert N: The role of the co-stimulatory molecule CD28 during different phases of the Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. Master Thesis Göttingen 2014
- Eliasdóttir OJ, Olafsson E, Kjartansson O (2011): Incidence of multiple sclerosis in Iceland, 2002-2007: a population-based study. *Mult Scler* 17, 909–913
- Feil R, Brocard J, Mascrez B, LeMeur M, Metzger D, Chambon P (1996): Ligand-activated site-specific recombination in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 10887–10890
- Flach A-C, Litke T, Strauß J, Haberl M, Gomez CC, Reindl M, Saiz A, Fehling H-J, Wienands J, Odoardi F (2016): Autoantibody-boosted T-cell reactivation in the target organ triggers manifestation of autoimmune CNS disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113, 3323–3328
- Flynn KM, Michaud M, Madri JA (2013): CD44 deficiency contributes to enhanced experimental autoimmune encephalomyelitis: a role in immune cells and vascular cells of the blood-brain barrier. *Am J Pathol* 182, 1322–1336
- Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY (2003): Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol* 4, 330–336
- Frauwirth KA, Riley JL, Harris MH, Parry RV, Rathmell JC, Plas DR, Elstrom RL, June CH, Thompson CB (2002): The CD28 signaling pathway regulates glucose metabolism. *Immunity* 16, 769–777
- Friese MA, Fugger L (2005): Autoreactive CD8+ T cells in multiple sclerosis: a new target for therapy? *Brain* 128, 1747–1763
- Fröhlich M, Gogishvili T, Langenhorst D, Lühder F, Hünig T (2016): Interrupting CD28 costimulation before antigen rechallenge affects CD8(+) T-cell expansion and effector functions during secondary response in mice. *Eur J Immunol* 46, 1644–1655
- Ghazi-Visser L, Laman JD, Nagel S, van Meurs M, van Riel D, Tzankov A, Frank S, Adams H, Wolk K, Terracciano L (2013): CD44 variant isoforms control experimental autoimmune encephalomyelitis by affecting the lifespan of the pathogenic T cells. *FASEB J* 27, 3683–3701
- Girvin AM, Dal Canto, M C, Rhee L, Salomon B, Sharpe A, Bluestone JA, Miller SD (2000): A critical role for B7/CD28 costimulation in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neurosci* 20, 1023–1031

- lomyelitis: a comparative study using costimulatory molecule-deficient mice and monoclonal antibody blockade. *J Immunol* 164, 136–143
- Girvin AM, Dal Canto, Mauro C, Miller SD (2002): CD40/CD40L interaction is essential for the induction of EAE in the absence of CD28-mediated co-stimulation. *J Autoimmun* 18, 83–94
- Gogishvili T, Lühder F, Kirstein F, Nieuwenhuizen NE, Goebbels S, Beer-Hammer S, Pfeffer K, Reuter S, Taube C, Brombacher F (2012): Interruption of CD28-mediated co-stimulation during allergen challenge protects mice from allergic airway disease. *J Allergy Clin Immunol* 130, 1394-403.e4
- Gogishvili T, Lühder F, Goebbels S, Beer-Hammer S, Pfeffer K, Hünig T (2013): Cell-intrinsic and -extrinsic control of Treg-cell homeostasis and function revealed by induced CD28 deletion. *Eur J Immunol* 43, 188–193
- 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
- Gold R, Lühder F (2008): Interleukin-17--extended features of a key player in multiple sclerosis. *Am J Pathol* 172, 8–10
- Goverman J (2009): Autoimmune T cell responses in the central nervous system. *Nat Rev Immunol* 9, 393–407
- Guan H, Nagarkatti PS, Nagarkatti M (2011): CD44 Reciprocally regulates the differentiation of encephalitogenic Th1/Th17 and Th2/regulatory T cells through epigenetic modulation involving DNA methylation of cytokine gene promoters, thereby controlling the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 186, 6955–6964
- Guðmundsdóttir H, Wells AD, Turka LA (1999): Dynamics and requirements of T cell clonal expansion in vivo at the single-cell level: effector function is linked to proliferative capacity. *J Immunol* 162, 5212–5223
- Guo F, Iclozan C, Suh W-K, Anasetti C, Yu X-Z (2008): CD28 Controls Differentiation of Regulatory T Cells from Naive CD4 T Cells1. *J Immunol* 181, 2285–2291
- Hadgkiss EJ, Jelinek GA, Weiland TJ, Pereira NG, Marck CH, van der Meer, Dania M (2015): The association of diet with quality of life, disability, and relapse rate in an international sample of people with multiple sclerosis. *Nutr Neurosci* 18, 125–136
- Hafler DA (2004): Multiple sclerosis. *J Clin Invest* 113, 788–794
- Harding FA, McArthur JG, Gross JA, Raulat DH, Allison JP (1992): CD28-mediated signalling co-stimulates murine T cells and prevents induction of anergy in T-cell clones. *Nature* 356, 607–609

- 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
- Harper K, Balzano C, Rouvier E, Mattei MG, Luciani MF, Golstein P (1991): CTLA-4 and CD28 activated lymphocyte molecules are closely related in both mouse and human as to sequence, message expression, gene structure, and chromosomal location. *J Immunol* 147, 1037–1044
- Hartung H-P, Aktas O, Menge T, Kieseier BC (2014): Immune regulation of multiple sclerosis. *Handb Clin Neurol* 122, 3–14
- 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
- Havrdová E, Belova A, Goloborodko A, Tisserant A, Wright A, Wallstroem E, Garren H, Maguire RP, Johns DR (2016): Activity of secukinumab, an anti-IL-17A antibody, on brain lesions in RRMS: results from a randomized, proof-of-concept study. *J Neurol* 263, 1287–1295
- Hoepner R, Faissner S, Salmen A, Gold R, Chan A (2014): Efficacy and side effects of natalizumab therapy in patients with multiple sclerosis. *J Cent Nerv Syst Dis* 6, 41–49
- Höer A, Schiffhorst G, Zimmermann A, Fischaleck J, Gehrmann L, Ahrens H, Carl G, Sigel K-O, Osowski U, Klein M (2014): Multiple sclerosis in Germany: data analysis of administrative prevalence and healthcare delivery in the statutory health system. *BMC Health Serv Res* 14, 381
- Hofstetter HH, Shive CL, Forsthuber TG (2002): Pertussis toxin modulates the immune response to neuroantigens injected in incomplete Freund's adjuvant: induction of Th1 cells and experimental autoimmune encephalomyelitis in the presence of high frequencies of Th2 cells. *J Immunol* 169, 117–125
- Hufschmidt A, Lücking CH, Rauer S (Hrsg.): *Neurologie compact: Für Klinik und Praxis*. 6., überarb. und erw. Auflage; Thieme, Stuttgart/New York 2013
- Hughes A-M, Lucas RM, McMichael AJ, Dwyer T, Pender MP, van der Mei, I, Taylor BV, Valery P, Chapman C, Coulthard A (2013): Early-life hygiene-related factors affect risk of central nervous system demyelination and asthma differentially. *Clin Exp Immunol* 172, 466–474
- Hünig T (2007): Manipulation of Regulatory T-Cell Number and Function with CD28-Specific Monoclonal Antibodies. *Adv Immunol* 95, 111–148
- Hünig T (2012): The storm has cleared: lessons from the CD28 superagonist TGN1412 trial. *Nature reviews. Immunology* 12, 317–318

- Inglese M (2006): Multiple sclerosis: new insights and trends. *AJNR Am J Neuroradiol* 27, 954–957
- Jafari N, Hintzen RQ (2011): The association between cigarette smoking and multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 311, 78–85
- Janeway C, Murphy KP: *Janeway Immunologie*. 7. Auflage; Akad. Verl., Heidelberg 2009
- Kebir H, Kreymborg K, Ifergan I, Dodelet-Devillers A, Cayrol R, Bernard M, Giuliani F, Arbour N, Becher B, Prat A (2007): Human TH17 lymphocytes promote blood-brain barrier disruption and central nervous system inflammation. *Nat Med* 13, 1173–1175
- Kerstan A, Hünig T (2004): Cutting edge: distinct TCR- and CD28-derived signals regulate CD95L, Bcl-xL, and the survival of primary T cells. *J Immunol* 172, 1341–1345
- Khan N, Smith MT (2014): Multiple sclerosis-induced neuropathic pain: pharmacological management and pathophysiological insights from rodent EAE models. *Inflammopharmacology* 22, 1–22
- Khoury SJ, Akalin E, Chandraker A, Turka LA, Linsley PS, Sayegh MH, Hancock WW (1995): CD28-B7 costimulatory blockade by CTLA4Ig prevents actively induced experimental autoimmune encephalomyelitis and inhibits Th1 but spares Th2 cytokines in the central nervous system. *J Immunol* 155, 4521–4524
- Khoury SJ, Rochon J, Ding L, Byron M, Ryker K, Tosta P, Gao W, Freedman MS, Arnold DL, Sayre PH (2016): ACCLAIM: A randomized trial of abatacept (CTLA4-Ig) for relapsing-remitting multiple sclerosis. *Mult Scler* 23, 686–695
- King CL, Xianli J, June CH, Abe R, Lee KP (1996): CD28-deficient mice generate an impaired Th2 response to *Schistosoma mansoni* infection. *Eur J Immunol* 26, 2448–2455
- Kip M, Zimmermann A, Bleß H-H: *Epidemiologie der Multiplen Sklerose*. In: Kip M, Schönfelder T, Bleß H-H (Hrsg.): *Weißbuch Multiple Sklerose: Versorgungssituation in Deutschland*. Springer Open, Berlin/Heidelberg 2016, 13–21
- Kirchhoff S, Müller WW, Li-Weber M, Krammer PH (2000): Up-regulation of c-FLIPshort and reduction of activation-induced cell death in CD28-costimulated human T cells. *Eur J Immunol* 30, 2765–2774
- Kivisäkk P, Imitola J, Rasmussen S, Elyaman W, Zhu B, Ransohoff RM, Khoury SJ (2009): Localizing central nervous system immune surveillance: meningeal antigen-presenting cells activate T cells during experimental autoimmune encephalomyelitis. *Ann Neurol* 65, 457–469
- Knier B, Rothhammer V, Heink S, Puk O, Graw J, Hemmer B, Korn T (2015): Neutralizing IL-17 protects the optic nerve from autoimmune pathology and prevents retinal nerve fiber layer atrophy during experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Autoimmun* 56, 34–44

- Kolbinger F, Huppertz C, Mir A, Di Padova F (2016): IL-17A and Multiple Sclerosis: Signaling Pathways, Producing Cells and Target Cells in the Central Nervous System. *Curr drug targets* 17, 1882–1893
- Korn T, Kallies A (2017): T cell responses in the central nervous system. *Nat Rev Immunol* 17, 179–194
- Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK (2009): IL-17 and Th17 Cells. *Annu Rev Immunol* 27, 485–517
- Krummel MF, Allison JP (1995): CD28 and CTLA-4 have opposing effects on the response of T cells to stimulation. *J Exp Med* 182, 459–465
- Kuiper HM, Jong R de, Brouwer M, Lammers K, Wijdenes J, van Lier RA (1994): Influence of CD28 co-stimulation on cytokine production is mainly regulated via interleukin-2. *Immunology* 83, 38–44
- Kurtzke JF (1983): Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology* 33, 1444–1452
- Lebar R, Lubetzki C, Vincent C, Lombrail P, Boutry JM (1986): The M2 autoantigen of central nervous system myelin, a glycoprotein present in oligodendrocyte membrane. *Clin Exp Immunol* 66, 423–434
- Lees JR, Golumbek PT, Sim J, Dorsey D, Russell JH (2008): Regional CNS responses to IFN-gamma determine lesion localization patterns during EAE pathogenesis. *J Exp Med* 205, 2633–2642
- Leitlinie Multiple Sklerose: s. DGN-Leitlinie 2014
- Lin C-H, Hünig T (2003): Efficient expansion of regulatory T cells in vitro and in vivo with a CD28 superagonist. *Eur J Immunol* 33, 626–638
- Linker RA, Stadelmann C, Diem R, Bähr M, Brück W, Gold R (2005): Recent advances in pathogenesis and therapy of multiple sclerosis. *Fortschr Neurol Psychiatr* 73, 715–727
- Linterman MA, Denton AE, Divekar DP, Zvetkova I, Kane L, Ferreira C, Veldhoen M, Clare S, Dougan G, Espeli M (2014): CD28 expression is required after T cell priming for helper T cell responses and protective immunity to infection. *eLife* 3
- Lock C, Hermans G, Pedotti R, Brendolan A, Schadt E, Garren H, Langer-Gould A, Strober S, Cannella B, Allard J (2002): Gene-microarray analysis of multiple sclerosis lesions yields new targets validated in autoimmune encephalomyelitis. *Nat Med* 8, 500–508
- Luche H, Weber O, Nageswara Rao T, Blum C, Fehling HJ (2007): Faithful activation of an extra-bright red fluorescent protein in "knock-in" Cre-reporter mice ideally suited for lineage tracing studies. *Eur J Immunol* 37, 43–53
- Malek TR (2008): The biology of interleukin-2. *Annu Rev Immunol* 26, 453–479

- Mardiguian S, Serres S, Ladds E, Campbell SJ, Wilainam P, McFadyen C, McAteer M, Choudhury RP, Smith P, Saunders F (2013): Anti-IL-17A treatment reduces clinical score and VCAM-1 expression detected by in vivo magnetic resonance imaging in chronic relapsing EAE ABH mice. *Am J Pathol* 182, 2071–2081
- Markovic-Plese S, Cortese I, Wandinger KP, McFarland HF, Martin R (2001): CD4+CD28- costimulation-independent T cells in multiple sclerosis. *J Clin Invest* 108, 1185–1194
- Marrie RA (2004): Environmental risk factors in multiple sclerosis aetiology. *Lancet Neurol* 3, 709–718
- Martinez-Llordella M, Esensten JH, Bailey-Bucktrout SL, Lipsky RH, Marini A, Chen J, Mughal M, Mattson MP, Taub DD, Bluestone JA (2013): CD28-inducible transcription factor DEC1 is required for efficient autoreactive CD4+ T cell response. *J Exp Med* 210, 1603–1619
- Matusevicius D, Kivisäkk P, He B, Kostulas N, Ozenci V, Fredrikson S, Link H (1999): Interleukin-17 mRNA expression in blood and CSF mononuclear cells is augmented in multiple sclerosis. *Mult Scler* 5, 101–104
- McQualter JL, Darwiche R, Ewing C, Onuki M, Kay TW, Hamilton JA, Reid HH, Bernard CC (2001): Granulocyte macrophage colony-stimulating factor: a new putative therapeutic target in multiple sclerosis. *J Exp Med* 194, 873–882
- Mendel I, Kerlero de Rosbo N, Ben-Nun A (1995): A myelin oligodendrocyte glycoprotein peptide induces typical chronic experimental autoimmune encephalomyelitis in H-2b mice: fine specificity and T cell receptor V beta expression of encephalitogenic T cells. *Eur J Immunol* 25, 1951–1959
- Miyasato K, Takabatake Y, Kaimori J, Kimura T, Kitamura H, Kawachi H, Li X-K, Hunig T, Takahara S, Rakugi H (2011): CD28 superagonist-induced regulatory T cell expansion ameliorates mesangioproliferative glomerulonephritis in rats. *Clin Exp Nephrol* 15, 50–57
- Mohammad MG, Hassanpour M, Tsai VWW, Li H, Ruitenberg MJ, Booth DW, Serrats J, Hart PH, Symonds GP, Sawchenko PE (2012): Dendritic cells and multiple sclerosis: disease, tolerance and therapy. *Int J Mol Sci* 14, 547–562
- Munn DH, Shafizadeh E, Attwood JT, Bondarev I, Pashine A, Mellor AL (1999): Inhibition of T cell proliferation by macrophage tryptophan catabolism. *J Exp Med* 189, 1363–1372
- Murugaiyan G, da Cunha AP, Ajay AK, Joller N, Garo LP, Kumaradevan S, Yosef N, Vaidya VS, Weiner HL (2015): MicroRNA-21 promotes Th17 differentiation and mediates experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Clin Invest* 125, 1069–1080
- Ndlovu H, Darby M, Froelich M, Horsnell W, Lühder F, Hünig T, Brombacher F (2014): Inducible deletion of CD28 prior to secondary nipposstrongylus brasiliensis infection im-

- pairs worm expulsion and recall of protective memory CD4(+) T cell responses. *PLoS pathogens* **10**, e1003906
- Newell KA, He G, Guo Z, Kim O, Szot GL, Rulifson I, Zhou P, Hart J, Thistlethwaite JR, Bluestone JA (1999): Cutting edge: blockade of the CD28/B7 costimulatory pathway inhibits intestinal allograft rejection mediated by CD4+ but not CD8+ T cells. *J Immunol* **163**, 2358–2362
- Ni C, Wang C, Zhang J, Qu L, Liu X, Lu Y, Yang W, Deng J, Lorenz D, Gao P (2014): Interferon-gamma safeguards blood-brain barrier during experimental autoimmune encephalomyelitis. *Am J Pathol* **184**, 3308–3320
- Nogai A, Siffrin V, Bonhagen K, Pfueller CF, Hohnstein T, Volkmer-Engert R, Brück W, Stadelmann C, Kamradt T (2005): Lipopolysaccharide Injection Induces Relapses of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis in Nontransgenic Mice via Bystander Activation of Autoreactive CD4+ Cells. *J Immunol* **175**, 959–966
- O'Connor KC, Appel H, Bregoli L, Call ME, Catz I, Chan JA, Moore NH, Warren KG, Wong SJ, Hafler DA (2005): Antibodies from inflamed central nervous system tissue recognize myelin oligodendrocyte glycoprotein. *J Immunol* **175**, 1974–1982
- Oliveira-dos-Santos AJ, Ho A, Tada Y, Lafaille JJ, Tonegawa S, Mak TW, Penninger JM (1999): CD28 costimulation is crucial for the development of spontaneous autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* **162**, 4490–4495
- Ottum PA, Arellano G, Reyes LI, Iruretagoyena M, Naves R (2015): Opposing Roles of Interferon-Gamma on Cells of the Central Nervous System in Autoimmune Neuroinflammation. *Front Immunol* **6**, 539
- Palmer CS, Ostrowski M, Balderson B, Christian N, Crowe SM (2015): Glucose metabolism regulates T cell activation, differentiation, and functions. *Front Immunol* **6**, 1
- Panitch HS, Hirsch RL, Schindler J, Johnson KP (1987): Treatment of multiple sclerosis with gamma interferon: Exacerbations associated with activation of the immune system. *Neurology* **37**, 1097–1102
- Perrin PJ, Scott D, Quigley L, Albert PS, Feder O, Gray GS, Abe R, June CH, Racke MK (1995): Role of B7:CD28/CTLA-4 in the induction of chronic relapsing experimental allergic encephalomyelitis. *J Immunol* **154**, 1481–1490
- Perrin PJ, June CH, Maldonado JH, Ratts RB, Racke MK (1999a): Blockade of CD28 during in vitro activation of encephalitogenic T cells or after disease onset ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* **163**, 1704–1710
- Perrin PJ, Lavi E, Rumbley CA, Zekavat SA, Phillips SM (1999b): Experimental autoimmune meningitis: a novel neurological disease in CD28-deficient mice. *Clin Immunol* **91**, 41–49

- Pierson ER, Goverman JM (2017): GM-CSF is not essential for experimental autoimmune encephalomyelitis but promotes brain-targeted disease. *JCI insight* **2**, e92362
- Pierson ER, Stromnes IM, Goverman JM (2014): B cells promote induction of experimental autoimmune encephalomyelitis by facilitating reactivation of T cells in the central nervous system. *J Immunol* **192**, 929–939
- Polman CH, Reingold SC, Banwell B, Clanet M, Cohen Jeffrey A, Filippi M, Fujihara K, Havrdová E, Hutchinson M, Kappos L (2011): Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria. *Ann Neurol* **69**, 292–302
- Pugliatti M, Rosati G, Carton H, Riise T, Drulovic J, Vécsei L, Milanov I (2006): The epidemiology of multiple sclerosis in Europe. *Eur J Neurol* **13**, 700–722
- Racke MK, Scott DE, Quigley L, Gray GS, Abe R, June CH, Perrin PJ (1995): Distinct roles for B7-1 (CD-80) and B7-2 (CD-86) in the initiation of experimental allergic encephalomyelitis. *J Clin Invest* **96**, 2195–2203
- Racke MK, Ratts RB, Arredondo L, Perrin PJ, Lovett-Racke A (2000): The role of costimulation in autoimmune demyelination. *J Neuroimmunol* **107**, 205–215
- Ramgolam VS, Markovic-Plese S (2010): Interferon-beta inhibits Th17 cell differentiation in patients with multiple sclerosis. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* **10**, 161–167
- Richards RG, Sampson FC, Beard SM, Tappenden P (2002): A review of the natural history and epidemiology of multiple sclerosis: implications for resource allocation and health economic models. *Health Technol Assess* **6**, 1–73
- Rieckmann P (2006): Immunomodulatorische Stufentherapie der Multiplen Sklerose. Aktuelle Therapieempfehlungen (September 2006). *Nervenarzt* **77**, 1506–1518
- Rivers TM, Sprunt DH, Berry GP (1933): Observations on attempts to produce acute disseminated encephalomyelitis in monkeys. *J Exp Med* **58**, 39–53
- Rudulier CD, McKinstry KK, Al-Yassin GA, Kroeger DR, Bretscher PA (2014): The number of responding CD4 T cells and the dose of antigen conjointly determine the TH1/TH2 phenotype by modulating B7/CD28 interactions. *J Immunol* **192**, 5140–5150
- Sadovnick AD, Ebers GC, Dyment DA, Risch NJ (1996): Evidence for genetic basis of multiple sclerosis. The Canadian Collaborative Study Group. *Lancet* **347**, 1728–1730
- Salomon B, Lenschow DJ, Rhee L, Ashourian N, Singh B, Sharpe A, Bluestone JA (2000): B7/CD28 costimulation is essential for the homeostasis of the CD4+CD25+ immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes. *Immunity* **12**, 431–440
- Scalfari A, Neuhaus A, Degenhardt A, Rice GP, Muraro PA, Daumer M, Ebers GC (2010): The natural history of multiple sclerosis: a geographically based study 10: relapses and long-term disability. *Brain* **133**, 1914–1929

- Scalfari A, Neuhaus A, Daumer M, Deluca GC, Muraro PA, Ebers GC (2013): Early relapses, onset of progression, and late outcome in multiple sclerosis. *JAMA Neurol* 70, 214–222
- Schweiggruber N, Fischer HJ, Fischer L, van den Brandt J, Karabinskaya A, Labi V, Villinger A, Kretzschmar B, Huppke P, Simons M (2014): Chemokine-mediated redirection of T cells constitutes a critical mechanism of glucocorticoid therapy in autoimmune CNS responses. *Acta neuropathol* 127, 713–729
- Schweitzer AN, Sharpe AH (1998): Studies using antigen-presenting cells lacking expression of both B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) show distinct requirements for B7 molecules during priming versus restimulation of Th2 but not Th1 cytokine production. *J Immunol* 161, 2762–2771
- Scott LJ, Figgitt DP (2004): Mitoxantrone: a review of its use in multiple sclerosis. *CNS Drugs* 18, 379–396
- Secor ER, JR, Singh A, Guernsey LA, McNamara JT, Zhan L, Maulik N, Thrall RS (2009): Bromelain treatment reduces CD25 expression on activated CD4+ T cells in vitro. *Int immunopharmacol* 9, 340–346
- Seibler J, Zevnik B, Kuter-Luks B, Andreas S, Kern H, Hennek T, Rode A, Heimann C, Faust N, Kauselmann G (2003): Rapid generation of inducible mouse mutants. *Nucleic Acids Res* 31, e12
- Shabgah AG, Fattahi E, Shahneh FZ (2014): Interleukin-17 in human inflammatory diseases. *Postepy Dermatol Alergol* 31, 256–261
- Shahinian A, Pfeffer K, Lee KP, Kundig TM, Kishihara K, Wakeham A, Kawai K, Ohashi PS, Thompson CB, Mak TW (1993): Differential T cell costimulatory requirements in CD28-deficient mice. *Science* 261, 609–612
- Shen FW, Saga Y, Litman G, Freeman G, Tung JS, Cantor H, Boyse EA (1985): Cloning of Ly-5 cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82, 7360–7363
- Shibaki A, Katz SI (2002): Induction of skewed Th1/Th2 T-cell differentiation via subcutaneous immunization with Freund's adjuvant. *Exp Dermatol* 11, 126–134
- Singh AK, Novakova L, Axelsson M, Malmeström C, Zetterberg H, Lycke J, Cardell SL (2017): High Interferon-gamma Uniquely in Vdelta1 T Cells Correlates with Markers of Inflammation and Axonal Damage in Early Multiple Sclerosis. *Front Immunol* 8, 260
- Skurkovich S, Boiko A, Beliaeva I, Buglak A, Alekseeva T, Smirnova N, Kulakova O, Tchehonin V, Gurova O, Deomina T (2001): Randomized study of antibodies to IFN-gamma and TNF-alpha in secondary progressive multiple sclerosis. *Mult Scler* 7, 277–284
- Smith-Garvin JE, Koretzky GA, Jordan MS (2009): T cell activation. *Annu Rev Immunol* 27, 591–619

- Srinivasan M, Gienapp IE, Stuckman SS, Rogers CJ, Jewell SD, Kaumaya, Pravin T P, Whitacre CC (2002): Suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis using peptide mimics of CD28. *J Immunol* 169, 2180–2188
- Storch MK, Stefferl A, Brehm U, Weissert R, Wallstrom E, Kerschensteiner M, Olsson T, Linington C, Lassmann H (1998): Autoimmunity to myelin oligodendrocyte glycoprotein in rats mimics the spectrum of multiple sclerosis pathology. *Brain Pathol* 8, 681–694
- Straus Farber R, Harel A, Lublin F (2016): Novel Agents for Relapsing Forms of Multiple Sclerosis. *Annu Rev Med* 67, 309–321
- Stuke K, Flachenecker P, Zettl UK, Elias WG, Freidel M, Haas J, Pitschnau-Michel D, Schimrigk S, Rieckmann P (2009): Symptomatology of MS: results from the German MS Registry. *J Neurol* 256, 1932–1935
- Suntharalingam G, Perry MR, Ward S, Brett SJ, Castello-Cortes A, Brunner MD, Panoskaltis N (2006): Cytokine storm in a phase 1 trial of the anti-CD28 monoclonal antibody TGN1412. *N Engl J Med* 355, 1018–1028
- Szwed M (2014): Mitoxantrone--an anthraquinone antibiotic with antitumor activity applied for the treatment of multiple sclerosis. *Postepy Hig Med Dosw (Online)* 68, 198–208
- Tabares P, Berr S, Römer PS, Chuvpilo S, Matskevich AA, Tyrsin D, Fedotov Y, Einsele H, Tony H-P, Hünig T (2014): Human regulatory T cells are selectively activated by low-dose application of the CD28 superagonist TGN1412/TAB08. *Eur J Immunol* 44, 1225–1236
- Tada Y, Nagasawa K, Ho A, Morito F, Ushiyama O, Suzuki N, Ohta H, Mak TW (1999): CD28-deficient mice are highly resistant to collagen-induced arthritis. *J Immunol* 162, 203–208
- Takahashi K, Aranami T, Endoh M, Miyake S, Yamamura T (2004): The regulatory role of natural killer cells in multiple sclerosis. *Brain* 127, 1917–1927
- Taneja V, Taneja N, Behrens M, Griffiths MM, Luthra HS, David CS (2005): Requirement for CD28 may not be absolute for collagen-induced arthritis: study with HLA-DQ8 transgenic mice. *J Immunol* 174, 1118–1125
- Testi R, Phillips JH, Lanier LL (1989a): Leu 23 induction as an early marker of functional CD3/T cell antigen receptor triggering. Requirement for receptor cross-linking, prolonged elevation of intracellular Ca⁺⁺ and stimulation of protein kinase C. *J Immunol* 142, 1854–1860
- Testi R, Phillips JH, Lanier LL (1989b): T cell activation via Leu-23 (CD69). *J Immunol* 143, 1123–1128

- Thouvenot E, Orsini M, Daures J-P, Camu W (2015): Vitamin D is associated with degree of disability in patients with fully ambulatory relapsing-remitting multiple sclerosis. *Eur J Neurol* 22, 564–569
- Timilshina M, Kang Y, Dahal I, You Z, Nam TG, Kim KJ, Jeong BS, Chang JH (2017): BJ-3105, a 6-Alkoxy-pyridin-3-ol Analog, Impairs T Cell Differentiation and Prevents Experimental Autoimmune Encephalomyelitis Disease Progression. *PloS One* 12, e0168942
- Tran EH, Prince EN, Owens T (2000): IFN-gamma shapes immune invasion of the central nervous system via regulation of chemokines. *J Immunol* 164, 2759–2768
- Tuohy VK, Lu ZJ, Sobel RA, Laursen RA, Lees MB (1988): A synthetic peptide from myelin proteolipid protein induces experimental allergic encephalomyelitis. *J Immunol* 141, 1126–1130
- Tzartos JS, Friese MA, Craner MJ, Palace J, Newcombe J, Esiri MM, Fugger L (2008): Interleukin-17 production in central nervous system-infiltrating T cells and glial cells is associated with active disease in multiple sclerosis. *Am J Pathol* 172, 146–155
- Verhoven B, Schlegel RA, Williamson P (1995): Mechanisms of phosphatidylserine exposure, a phagocyte recognition signal, on apoptotic T lymphocytes. *J Exp Med* 182, 1597–1601
- Vogel I, Kasran A, Cremer J, Kim Y-J, Boon L, Van Gool, Stefaan W, Ceuppens JL (2015): CD28/CTLA-4/B7 costimulatory pathway blockade affects regulatory T-cell function in autoimmunity. *Eur J Immunol* 45, 1832–1841
- Webb LM, Walmsley MJ, Feldmann M (1996): Prevention and amelioration of collagen-induced arthritis by blockade of the CD28 co-stimulatory pathway: requirement for both B7-1 and B7-2. *Eur J Immunol* 26, 2320–2328
- Wucherpfennig KW (2001): Mechanisms for the induction of autoimmunity by infectious agents. *J Clin Invest* 108, 1097–1104
- Xu W, Fazekas G, Hara H, Tabira T (2005): Mechanism of natural killer (NK) cell regulatory role in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* 163, 24–30
- Yednock TA, Cannon C, Fritz LC, Sanchez-Madrid F, Steinman L, Karin N (1992): Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis by antibodies against alpha 4 beta 1 integrin. *Nature* 356, 63–66
- Zamvil S, Nelson P, Trotter J, Mitchell D, Knobler R, Fritz R, Steinman L (1985): T-cell clones specific for myelin basic protein induce chronic relapsing paralysis and demyelination. *Nature* 317, 355–358
- Zhang B, Yamamura T, Kondo T, Fujiwara M, Tabira T (1997): Regulation of experimental autoimmune encephalomyelitis by natural killer (NK) cells. *J Exp Med* 186, 1677–1687

Zhang R, Huynh A, Whitcher G, Chang J, Maltzman JS, Turka LA (2013): An obligate cell-intrinsic function for CD28 in Tregs. *J Clin Invest* 123, 580–593

DANKSAGUNG

Vor allen anderen möchte ich mich bei meinem Betreuer, PD Dr. Fred Lühder, bedanken – für ein spannendes Promotionsthema, eine enge und unterstützende Betreuung sowie ein angenehmes Klima der Zusammenarbeit, das stets offen war für Nachfragen meinerseits. Prof. Dr. Alexander Flügel danke ich für die Möglichkeit, im Institut für Multiple-Sklerose-Forschung meine Doktorarbeit zu schreiben.

Ein besonderer Dank geht an die Mitarbeiter im IMSF – Ihr habt mir Tag und Nacht zur Seite gestanden und dafür gesorgt, dass ich mich bei Euch sehr wohl gefühlt habe. Insbesondere an Dr. Anne Flach, die mit schier endloser Geduld in der Lage war, mir die nötigen Methoden und experimentellen Abläufe auf adäquatem Niveau näher zu bringen.

Außerdem danke ich Dr. Tanja Litke und Nadine Eckert für die Unterstützung – vor allem zu Beginn – und das Zur-Verfügung-Stellen ihrer Daten. Ein besonderer Dank gilt Judith Strauß, die auch nach Abschluss der Experimente meine erste Anlaufstelle war und zu jeder Zeit für Fragen und Probleme jeglicher Art offen war.

Des Weiteren möchte ich allen weiteren Mitarbeitern im IMSF für die vielfältige Unterstützung bei der Durchführung der Experimente danken – vor allem Martina Weig, die mir bei den Experimenten eine unverzichtbare Hilfe war.

Dr. Sara Khadjeh danke ich für die Unterstützung bei den ersten Gehversuchen im Labor und für die Erkenntnis, worauf bei der Auswahl eines Promotionsthemas zu achten ist.

Allen Weiteren, die auf ihre Art und Weise ihren Beitrag zu dieser Arbeit geleistet haben, möchte ich ebenfalls danken – so zum Beispiel meiner Familie und meinen Freunden, allen voran Janina Dege – die mir unterstützend zur Seite standen und für Diskussionen über mein Thema und die sinnvolle Durchführung dieser Arbeit stets zur Verfügung standen.

Zu guter Letzt möchte ich mich noch bei den wichtigsten Mitwirkenden meiner Arbeit bedanken: Danke liebe C57Bl/6J (inklusive aller genetischer Varianten) dafür, dass ich Euch – ungefragt – für meine Versuche benutzen konnte. Sorry dafür!

Fáfræðin er haf og þekking okkar er fleki á þessu.

(Die Unwissenheit ist ein Meer und unser Wissen ein Floß darauf.)

LEBENS LAUF

Am 20. Oktober 1988 wurde ich als drittes Kind meiner Eltern, Theresia Hufschmidt und Dr. rer. nat. Michael Hufschmidt, in Hamburg geboren.

Von 1995 bis 1998 besuchte ich die katholische Grundschule Eberhofweg (heute: Katharina-von-Siena-Schule) in Hamburg. Im Anschluss war ich bis zum Erwerb der Allgemeinen Hochschulreife Schüler am Gymnasium Heidberg, Hamburg.

Nach Abschluss meiner Schulausbildung absolvierte ich meinen Zivildienst in der interdisziplinären Notaufnahme im Klinikum Nord, Hamburg.

Von Oktober 2008 bis September 2009 studierte ich Physik (B.Sc.) an der Georg-August-Universität Göttingen. Zum Wintersemester 2009/10 nahm ich an der Georg-August-Universität das Studium der Humanmedizin auf. Im Herbst 2011 absolvierte ich den 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung. In der Zeit von Januar bis Juni 2013 war ich für ein Auslandssemester an der Háskóli Íslands in Reykjavík, Island, und begann im April 2014 meine medizinische Promotion am Institut für Multiple-Sklerose-Forschung Göttingen bei Herrn PD Dr. Fred Lühder.

Nach Bestehen des 2. Abschnitts der Ärztlichen Prüfung im Herbst 2015 absolvierte ich das Praktische Jahr in der Inneren Medizin am Städtischen Klinikum Wolfenbüttel (November 2015 – März 2016), in der Chirurgie der Universitätsmedizin Göttingen (März – Juni 2016) und in der Prof.-Hess-Kinderklinik am Klinikum Bremen-Mitte (Juni – Oktober 2016).

Mein Medizinstudium konnte ich am 7. Dezember 2016 mit Bestehen des 3. Abschnitts der Ärztlichen Prüfung erfolgreich abschließen, woraufhin mir im Januar 2017 die Approbation als Arzt erteilt wurde.