Phänotypische und funktionelle Charakterisierung IL-17 produzierender CD8⁺ T-Zellen in der Multiplen Sklerose

Dissertation

Zur Erlangung der Würde des Doktors der Naturwissenschaften des Fachbereichs Biologie, der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften, der Universität Hamburg

> vorgelegt von Anne Willing aus Vreden

Hamburg 2013

Genehmigt vom Fachbereich Biologie der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften an der Universität Hamburg auf Antrag von Professor Dr. M. FRIESE Weiterer Gutachter der Dissertation: Professor Dr. C. LOHR Tag der Disputation: 12. Juli 2013

Hamburg, den 02. Juli 2013

Professor Dr. C. Lohr Vorsitzender des Fach-Promotionsausschusses Biologie

INHALTSVERZEICHNIS

1.	E	INLEITUNG	1
1.1.	A	ktivierung und Differenzierung von CD8 ⁺ T-Zellen	2
1.2.	N	1ultiple Sklerose – Epidemiologie, klinischer Verlauf und Ätiologie	4
1.3.	N	1ultiple Sklerose – Pathogenese und Therapie	5
1.4.	R	olle der CD8 ⁺ T-Zellen in der Pathogenese der Multiplen Sklerose	7
1.5.	R	olle von IL-17 und IL-17 produzierenden CD4 * T-Zellen in der Multiplen Sklerose	9
1.6.	С	D161 als Oberflächenmarker für IL-17 produzierende T-Zellen	10
1.7.	K	ontroverse über die funktionelle Identität IL-17 produzierender CD8 ⁺ T-Zellen	11
1.8.	N	<i>Iucosal-associated invariant T</i> (MAIT)-Zellen – eine T-Zell-Population mit Eigenschaften	des
	aı	ngeborenen Immunsystems	13
1.9.	Zi	elsetzung dieser Arbeit	15
2.	N	1ATERIAL UND METHODEN	17
2.1.	N	1aterial	17
2.	1.1.	Humanes Probenmaterial	17
2.	1.2.	Reagenzien	20
2.	1.3.	Puffer und Zellkulturmedien	23
2.	1.4.	Verbrauchsmaterialien	23
2.	1.5.	Geräte und Software	24
2.2.	N	1ethoden	25
2.	2.1.	Isolierung und Konservierung von Immunzellen	25
2.	2.2.	Zellkulturexperimente	27
2.	2.3.	Färbeprotokolle für durchflusszytometrische Analysen	29
2.	2.4.	Bestimmung des IL-18 Serumspiegels	31
2.	2.5.	Microarray Genexpressionsanalyse	31
2.	2.6.	Statistik	32
3.	E	RGEBNISSE	33
3.1.	ld	lentifizierung und Charakterisierung IL-17 produzierender CD8 ⁺ T-Zellen	33
3.	1.1.	Assoziation von IL-17 Produktion durch CD8 $^{+}$ T-Zellen mit verminderter CD8 β -Expression	33
3.	1.2.	Allgemeine Charakterisierung von CD8αα T-Zellen	36
3.	1.3.	MAIT-Zellen repräsentieren den Großteil der IL-17 produzierenden CD8 ⁺ T-Zellen	42
3.	1.4.	Reduzierte Proliferation von CD8 $^{\scriptscriptstyle +}$ MAIT-Zellen nach klassischer T-Zell-Rezeptor Stimulation	46

3.2.	An	alyse von CD161 ^{hoch} CD8 ⁺ bzw. CD8 ⁺ MAIT-Zellen in der Multiplen Sklerose	8
3.2	.1.	Verminderte Frequenzen der CD161 ^{hoch} CD8 ⁺ T-Zellen im peripheren Blut von MS-Patienten	18
3.2	.2.	Verminderte Frequenz der CD161 ^{hoch} CD8 ⁺ bzw. CD8 ⁺ MAIT-Zellen im Liquor im Vergleich zum	
		peripheren Blut	52
3.2	.3.	Unveränderte Expression von Aktivierungsmarkern auf CD8 $^{+}$ MAIT-Zellen im peripheren Blut von	
		MS-Patienten	;3
3.3.	Ak	tivierung durch IL-18 als Mechanismus der Frequenzverminderung von CD8 ⁺ MAIT-Zellen	
	im	Blut von MS-Patienten	6
3.3	.1.	In vitro Aktivierung von CD8 ⁺ MAIT-Zellen durch IL-18	56
3.3	.2.	Zusammenhang zwischen CD8 ⁺ MAIT-Zell Frequenz und IL-18 Serumspiegel bei MS-Patienten	58
3.4.	Erl	nöhte IL-7R α Expression und IL-17 Produktion von CD8 $^{+}$ MAIT-Zellen bei MS-Patienten 6	0
4.	DI	SKUSSION6	3
5.	ΖL	JSAMMENFASSUNG7	3
6.	SL	IMMARY7	4
LITER	ΑΤι	JRVERZEICHNIS	5
DAN	KSA	GUNG8	6
ANH	ANG	ì8	7
Abküı	zun	gsverzeichnis	;7
Abbilo	dung	sverzeichnis	;9
Tabel	lenv	erzeichnis	0

1. EINLEITUNG

Im Laufe der Evolution haben sich vielfältige Abwehrmechanismen und Strategien entwickelt, durch die sich vielzellige Organismen vor eindringenden Pathogenen schützen. Klassischerweise werden die diversen Bestandteile des Immunsystems funktionell entweder dem angeborenen oder dem adaptiven Teil zugeordnet. Letzterer kommt ausschließlich bei Vertebraten vor und unterscheidet sich vom angeborenen Immunsystem in erster Linie durch seine breit gefächerte Antigespezifität und die Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses. Das immunologische Gedächtnis vermittelt bei einer zweiten Begegnung mit demselben Pathogen eine schnellere und effektivere spezifische Antwort.

Zentraler Bestandteil des adaptiven Immunsystems sind die B- und T-Zellen, die im Knochenmark aus einer gemeinsamen lymphatischen Vorläuferzelle hervorgehen und deren Reifung entweder im Knochenmark im Falle der B-Zellen oder im Thymus im Falle der T-Zellen stattfindet. B-Zellen sind die primären Effektorzellen der humoralen adaptiven Immunantwort, was bedeutet dass sie spezifische Antikörper gegen die Antigene von Pathogenen produzieren. T-Zellen hingegen vermitteln die so genannte zelluläre adaptive Immunität und können anhand der Expression von CD4 oder CD8 auf ihrer Oberfläche in zwei Hauptgruppen unterteilt werden. Während CD4⁺ T-Zellen hauptsächlich die Steuerung der Immunantwort übernehmen, sind CD8⁺ T-Zellen dafür zuständig direkt viral infizierte oder neoplastisch entartete Zellen zu töten. Eine zentrale Gemeinsamkeit der Bund T-Zellen besteht darin, dass ihre Antigenrezeptoren durch somatische DNA-Rekombination einzelner Gensegmente während der Reifung im Knochenmark bzw. Thymus entstehen. So wird eine große Vielfalt an Antigenspezifitäten erzeugt, wobei jede reife T- und B-Zelle letztendlich nur einen spezifischen Rezeptor trägt (Prinzip der Klonalität).

Im Gegensatz dazu erkennen die Zellen des angeborenen Immunsystems, zu denen Makrophagen, andere Granulozyten, dendritische Zellen und *natural killer* (NK)-Zellen gezählt werden, Pathogene mit Hilfe von so genannten Mustererkennungs-Rezeptoren, die über die Keimbahn als vollständige Gene vererbt werden und jeweils spezifisch für konservierte Strukturen sind, die von einem breiten Spektrum an Erregern exprimiert werden.

Die Eigenschaften der genannten Rezeptoren vermitteln grundlegende Unterschiede in der Funktion der beiden Bestandteile des Immunsystems. Während das angeborene Immunsystem in der Lage ist schnell und von Geburt an Schutz gegen eine Vielzahl von Erregern zu vermitteln, hat das adaptive Immunsystem die Fähigkeit eine große Diversität unbekannter Antige zu erkennen und in Form eines immunologischen Gedächtnisses abzuspeichern¹.

1

1.1. Aktivierung und Differenzierung von CD8⁺ T-Zellen

Die Aktivierung naiver T-Zellen im Rahmen einer Immunantwort geschieht in den peripheren lymphatischen Organen, den Lymphknoten, der Milz und den mit Schleimhäuten assoziierten lymphatischen Geweben, wo sie mit spezialisierten antigenpräsentierenden Zellen (APZ), wie zum Beispiel dendritischen Zellen, Makrophagen oder auch B-Zellen, zusammentreffen. Dabei erkennen die T-Zellen über ihren T-Zell-Rezeptor (TZR) kurze Peptidabschnitte von Antigenen, die im Komplex mit major histocompatibility complex (MHC)-Molekülen auf der Oberfläche der APZ präsentiert werden. Dazu müssen die Antigene zunächst innerhalb der APZ proteolytisch prozessiert werden und die Peptide auf die entsprechenden MHC-Moleküle geladen werden². Im Falle der CD4⁺ T-Zellen sind dies MHC-Klasse-II-Moleküle, die ausschließlich von professionellen APZ exprimiert werden und mit Antigenen beladen werden, die zuvor von diesen aus der Umgebung aufgenommen wurden. CD8⁺ T-Zellen erkennen hingegen Peptide im Komplex mit MHC-Klasse-I-Molekülen, die auf dem klassischen Wege nur Peptide intrazellulär exprimierter, endogener Antigene komplexieren und auf nahezu allen kernhaltigen Körperzellen vorkommen. Das CD8-Molekül dient bei der Interaktion des TZR mit dem MHC-Klasse-I-Peptid-Komplex als Ko-Rezeptor, der an konservierte Regionen des MHC-Moleküls bindet. Erst durch gleichzeitige Interaktion von CD8 und dem TZR mit dem MHC-Klasse-I-Peptid-Komplex kommt es zur optimalen Aktivierung von CD8⁺ T-Zellen. Für die primäre Aktivierung naiver CD8⁺ T-Zellen ist es darüber hinaus notwendig, dass das Antigen von einer spezialisierten APZ zusammen mit weiteren ko-stimulatorischen Signalen präsentiert wird. Wenn die APZ nicht selbst das Antigen exprimiert (z.B. durch virale Infektion), müssen dazu Antigene, die aus der Umgebung aufgenommen wurden, auf MHC-Klasse-I-Moleküle gelangen. Dieser Prozess, der erstmals 1976 als Kreuzpräsentation (engl. cross-presentation) beschrieben wurde^{3,4}, ist bis heute auf subzellulärer Ebene noch nicht vollständig verstanden.

Neben der Stimulation des TZR durch den MHC-Klasse-I-Peptid-Komplex (Signal 1) bedarf es **weiterer Signale zur Aktivierung naiver CD8⁺ T-Zellen**, die von den APZ geliefert werden, sobald diese selbst im Rahmen einer Infektion bzw. Entzündung aktiviert worden sind und reifen⁵. Zum einen sind dies durch Zell-Zell-Kontakt vermittelte ko-stimulatorische Signale, wie zum Beispiel die Hochregulation von CD80 und CD86 (B7) bzw. CD70 auf den APZ, die als Liganden für CD28 bzw. CD27 auf den T-Zellen dienen (Signal 2). Zum anderen tragen pro-inflammatorische Zytokine wie Interleukin (IL)-12 und Typ I Interferon (IFN), die von den APZ sezerniert werden, zur Aktivierung bei (Signal 3)^{6,7}. Die Maturierung der APZ ist demnach ein zentraler Schritt bei der Aktivierung des adaptiven Immunsystems. Diese kann sowohl durch Zytokine, wie Tumornekrosefaktor (TNF)- α und Granulozyten-Makrophagen-koloniestimulierendem Faktor (GM-CSF)⁵, als auch über so genannte Mustererkennungsrezeptoren, die zum Beispiel bakterielle Strukturmotive wie Lipopolysaccharide (LPS) erkennen, induziert werden⁸. Ein Beispiel hierfür sind die *Toll-like*-Rezeptoren (TLR), die

ursprünglich in der Taufliege entdeckt und erstmals im Jahre 1997 auch beim Menschen beschrieben wurden⁹.

Über die drei oben beschriebenen und von APZ vermittelten Signale hinaus, unterstützen **CD4⁺ T-Zellen** die Aktivierung von naiven CD8⁺ T-Zellen^{6,10}. Diese kann zum einen indirekt über eine Interaktion zwischen CD4⁺ T-Zellen und APZ erfolgen. So wurde 1998 von drei Gruppen parallel gezeigt, dass CD4⁺ T-Zellen APZ zur Aktivierung von CD8⁺ T-Zellen lizenzieren können, und dass dieses durch Interaktion zwischen CD40 seitens der APZ und CD40L seitens der CD4⁺ T-Zelle vermittelt wird ¹¹⁻¹³. Darüber hinaus gibt es Hinweise, dass eine direkte Interaktion zwischen CD4⁺ tr-Zellen über CD40/CD40L stattfindet und ebenfalls zur Aktivierung von CD8⁺ T-Zellen beitragen kann¹⁴. Des Weiteren scheint die Freisetzung von IL-2 durch CD4⁺ T-Zellen während der erstmaligen Immunantwort die Effektivität einer sekundären CD8⁺ T-Zellen auch unabhängig von der Hilfe durch CD4⁺ T-Zellen stattfinden kann, scheint diese dennoch für die Entwicklung eines funktionellen CD8⁺ Gedächtnis-T-Zell-Pools entscheidend zu sein^{16,17}.

Nach effektiver Aktivierung in den peripheren lymphatischen Organen kommt es zu einer massiven klonalen Expansion, im Rahmen derer aus einer einzelnen naiven CD8 * T-Zelle Subpopulationen mit verschiedensten Effektorfunktionen hervorgehen können^{18,19}. Die Effektor-T-Zellen wandern über die Blutbahn in die betroffenen Gewebe ein und werden dort durch infizierte Zellen reaktiviert, die sie entweder direkt töten und/oder durch die sie zur Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen, wie IFN- γ und TNF- α , angeregt werden. CD8⁺ T-Zellen können allerdings neben den beschriebenen zytotoxischen und pro-inflammatorischen Effektorfunktionen auch regulatorisch wirken, indem sie zum Beispiel aktivierte CD4 * T-Zellen töten oder antiinflammatorische Zytokine wie IL-10 und *transforming growth factor* (TGF)- β ausschütten²⁰. Im Gegensatz zu den regulatorischen CD4⁺ T-Zellen, welche große Mengen an CD25 auf ihrer Oberfläche tragen (CD25^{hoch}) und FOXP3⁺ sind, konnte für die regulatorisch wirkenden CD8⁺ T-Zellen bisher noch kein gemeinsamer Marker identifiziert werden. Verschiedene, jedoch nicht exklusive Oberflächenmarker, die vermehrt auf regulatorischen CD8⁺ T-Zellen exprimiert zu sein scheinen, wie zum Beispiel CD122 oder CD8 $\alpha\alpha$ -Homodimere, wurden in der Vergangenheit beschrieben^{21,22}. Abgesehen von der möglichen Existenz einer eigenständigen regulatorischen CD8⁺ T-Zell-Population wurde kürzlich mehrfach beschrieben, dass CD8⁺ T-Zellen auf dem Höhepunkt der Immunantwort transient IL-10 produzieren – vermutlich ein Mechanismus zur autokrinen Selbstlimitierung²³⁻²⁶. Nachdem das Pathogen erfolgreich bekämpft wurde, kommt es zur Kontraktion der Effektor-T-Zell-Population, so dass nur ca. 5% der anfänglich expandierten Zellen als Gedächtnis-T-Zellen verbleiben und im Falle einer späteren Infektionen mit dem gleichen Pathogen für eine schnellere adaptive Immunantwort zur Verfügung stehen²⁷. Wie die Transition von Effektorzellen in Gedächtnis-Zellen vermittelt wird und welche Teilpopulation letztendlich als Gedächtnis-Zellen persistiert, ist Gegenstand aktueller Forschung²⁸. Eine hohe Expression der IL-7-Rezeptor-α-Untereinheit (IL-7Rα) sowie die transiente Expression von CD8αα-Homodimeren scheinen beispielsweise in der Maus Effektor-T-Zellen, die sich zu Gedächtnis-T-Zellen entwickeln, zu markieren^{29,30}. Wenn allerdings das Antigen, welches die CD8⁺ Effektor-T-Zellen erkennen, nicht beseitigt werden kann, wie im Falle einer chronischen Virusinfektion oder einer Immunantwort gegen körpereigene Antigene (Autoimmunreaktion), kann es durch eine permanente Reaktivierung der Zellen zu einer immunpathologischen Schädigung des Gewebes kommen³¹.

1.2. Multiple Sklerose – Epidemiologie, klinischer Verlauf und Ätiologie

Eine solche permanente Aktivierung autoreaktiver T-Zellen ist zentraler Bestandteil der Pathogenese der Multiplen Sklerose (MS). Bei dieser Autoimmunerkrankung wandern T-Zellen in das zentrale Nervensystem (ZNS) ein und es entstehen entzündliche Läsionen, die neben der Immuninfiltration durch die Demyelinisierung und die Transsektion von Axonen gekennzeichnet sind³². Für gewöhnlich wird MS im jungen Erwachsenenalter erstmals diagnostiziert. Laut eines Berichts der *World Health Organization* (WHO) lag die weltweite **Prävalenz** der Erkrankung 2008 bei 30/100.000, wobei die Prävalenz in Europa und Deutschland mit 80/100.000 bzw. 149/100.000 deutlich über dem weltweiten Durchschnitt lag. Die Erkrankung betrifft in etwa doppelt so viele Frauen wie Männer.

Aufgrund der multilokulären entzündlichen Schädigung des ZNS zählen zu den Symptomen der MS vielfältige und heterogen auftretende neurologische Defizite, von sensorischen und motorischen Funktionsstörungen bis hin zu visuellen und kognitiven Einschränkungen. Die meisten MS-Patienten zeigen einen schubförmig remittierenden **Krankheitsverlauf** (*relapsing remitting* MS, RRMS), der durch akut auftretende Schübe und Remissionsphasen, in denen sich die neurologischen Symptome zunächst vollkommen zurückbilden, gekennzeichnet ist. Im späteren Krankheitsverlauf nach 10 bis 35 Jahren gehen dann ca. 65% dieser Patienten in eine sekundär progrediente Phase (SPMS) über, in der die neurologischen Defizite akkumulieren. In dieser Phase nimmt die entzündliche Komponente der Erkrankung ab, während es vermehrt zu Neurodegeneration kommt. Circa 20% der MS-Patienten leiden hingegen von Anfang an unter einem Krankheitsverlauf, der sich durch eine kontinuierliche Verschlechterung und die Abwesenheit von Schüben auszeichnet, der so genannten primär progredienten MS (PPMS)³².

Es wird angenommen, dass ein komplexes Zusammenspiel aus multiplen genetisch prädisponierenden und umweltbedingten Faktoren zur Entstehung der Erkrankung beiträgt. Für eine genetische Komponente spricht eine familiäre Häufung der Erkrankung, die bereits in frühen epidemiologischen Studien beschrieben wurde. Bei Verwandten ersten Grades einer betroffenen Person liegt das Risiko ebenfalls zu erkranken mit 3% bis 5% in etwa 30 bis 50 mal über dem Risiko innerhalb der Gesamtbevölkerung³³. Bei Stiefgeschwistern oder adoptierten Kindern besteht hingegen kein erhöhtes MS-Risiko, was dafür spricht, dass für die familiäre Häufung eher genetische als umweltbedingte Faktoren ursächlich sind^{34,35}. Diese Hypothese unterstützend liegt bei eineiigen Zwillingen die Konkordanzrate bei 25%, während sie bei zweieiigen Zwillingen nur 5% beträgt³⁶. In genomweiten Assoziationsstudien wurden zudem zahlreiche mit MS assoziierte Einzelnukleotid-Polymorphismen identifiziert, die zum Großteil innerhalb oder in der Nähe von Genen lokalisiert sind, die für Proteine mit einer funktionellen Rolle im Immunsystem kodieren^{37,38}. Diese unterstützen die Annahme, dass eine Fehlregulation des Immunsystems ursächlich verantwortlich für die Entstehung der MS ist. Die stärkste und vielfach bestätigte Assoziation liegt im Bereich des humanen MHC-Klasse II Lokus, Human Leukocyte Antigen (HLA)-Klasse II. Weitere Beispiele sind die alpha-Untereinheiten des IL-2 Rezeptors und des IL-7 Rezeptors. Die Vielzahl der assoziierten Genvarianten sowie die relativ moderaten Effekte, die die einzelne Genvarianten vermitteln, sprechen für eine hohe Komplexität der genetischen Komponente der MS³⁹. Um den Beitrag einzelner MS-assoziierter Polymorphismen an der Pathogenese aufzuklären, werden in aktuellen Studien deren funktionelle Konsequenzen untersucht⁴⁰.

Die auch bei homozygoten Zwillingen niedrige Konkordanzrate von 25%³⁶ sowie die globale Verteilung mit steigender Prävalenz bei zunehmendem Breitengrad deuten darauf hin, dass neben der genetischen Prädisposition **Umweltfaktoren** einen Einfluss auf das Entstehen einer MS-Erkrankung haben. Diskutiert werden beispielsweise Virusinfektionen, Sonneneinstrahlung, Vitamin-D-Mangel und psychischer Stress⁴¹. Tritt zum Beispiel eine symptomatische Infektion mit dem Epstein-Barr Virus (EBV, Infektiöse Mononukleose) mit Erreichen der Pubertät oder später ein, erhöht sich das MS Risiko^{42,43}. Ein Zusammenhang zwischen Vitamin-D-Mangel und der Entstehung von MS wird indirekt durch epidemiologische Studien nahegelegt, die sich beispielsweise mit der globalen Verteilung der MS beschäftigen⁴⁴. Da Vitamin D durch Sonneneinstrahlung in der Haut produziert wird, könnte Vitamin-D-Mangel im Zusammenhang mit der zunehmenden Prävalenz bei zunehmendem Breitengrad stehen. Zudem hat Vitamin-D-Gabe im Mausmodell der MS protektive, immunregulatorische Effekte⁴⁵.

1.3. Multiple Sklerose – Pathogenese und Therapie

Ebenso wie die Auslöser der Erkrankung sind die Mechanismen der **Pathogenese** der MS unzureichend verstanden. Eine zentrale Rolle bei der Entstehung der entzündlichen Läsionen spielt die Einwanderung vermutlich autoreaktiver T-Zellen in das ZNS. Immuninfiltration aus der Peripherie in das ZNS wird unter physiologischen Bedingungen durch die Blut-Hirn-Schranke (BHS) und Blut-

Liquor-Schranke (BLS, im Bereich des sog. Plexus choroideus), bestehend aus speziellen durch tight junctions fest miteinander verbundenen Endothelzellen, streng kontrolliert. Ausschließlich aktivierte Effektor-Gedächtnis-T-Zellen exprimieren entsprechende Adhäsionsmoleküle und und Chemokinrezeptoren, um die BHS bzw. BLS passieren zu können⁴⁶. Wie bereits in Abschnitt 1.1. beschrieben, erfordert die primäre Aktivierung naiver T-Zellen eine Präsentation des entsprechenden Antigens durch professionelle APZ in den peripheren lymphatischen Organen. Die Präsentation von ZNS-Autoantigenen in den zervikalen Lymphknoten stellt eine Möglichkeit dar, wie es zur peripheren Aktivierung von ZNS-Autoantigen spezifischen T-Zellen kommen kann⁴⁷. Allerdings müsste dies im Kontext einer Entzündung stattfinden (siehe Abschnitt 1.1.). Darüber hinaus kann es im Rahmen einer viralen Infektion durch verschiedene Mechanismen zur peripheren Aktivierung ZNS-Autoantigen spezifischer T-Zellen kommen⁴⁸. Diese beinhalten zum einen die so genannte molekulare Mimikry, die auf der Kreuzreaktivität virus-spezifischer T-Zellen mit Autoantigenen beruht und erstmals 1985 beschrieben wurde⁴⁹. Kreuzreaktivität EBV spezifischer T-Zellen von MS-Patienten gegen Myelinantigene wurde bereits beschrieben und könnte im Zusammenhang mit der in Kapitel 1.2. beschriebenen Korrelation zwischen MS und EBV-Infektionen stehen^{50–52}. Des Weiteren wurde in einem transgenen Mausmodel gezeigt, dass CD8⁺ T-Zellen, die zwei TZR mit unterschiedlicher Spezifität einerseits für Myelinproteine und andererseits für virale Epitope exprimieren, in der Peripherie durch eine Infektion mit dem entsprechenden Virus aktiviert werden und daraufhin eine ZNS-Autoimmunerkrankung induzieren können⁵³. Peripher aktivierte T-Zellen können beispielsweise durch die Expression des Chemokinrezeptors CCR6 über den Plexus choroideus, der den Liganden CCL21 exprimiert, ins ZNS einwandern⁵⁴. Im Mausmodell der MS, der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE), wird so vermutlich die erste Welle der ZNS-Entzündung ausgelöst, was dann in der Folge durch die Sekretion inflammatorischer Signalmoleküle zur Infiltration weiterer T-Zellen über die durchlässig werdende BHS führt⁵⁴. Die genauen Mechanismen, wie es zur ZNS-Infiltration Autoantigen-spezifischer T-Zellen in der MS kommt, sind jedoch noch nicht aufgeklärt.

Es wird angenommen, dass die entzündlichen Prozesse in MS-Läsionen zunächst zur Demyelinisierung und schließlich zum Untergang von Axonen und Neuronen führen. Allerdings gibt es auch Hinweise aus histopathologischen Untersuchungen, dass die Schädigung von Axonen in MS-Läsionen unabhängig von deren Demyelinisierung stattfinden kann⁵⁵. Der axonale Schaden korrelierte in dieser und anderen Studien mit dem Grad der Entzündung^{55–57}. Dies könnte bedeuten, dass die entzündlichen Prozesse in MS-Läsionen nicht nur durch Demyelinisierung zur axonalen Degeneration beitragen, sondern auch eine direkte Schädigung der Axone vermitteln können. Diese Hypothese wird durch Befunde im Mausmodell unterstützt^{58,59}. Im Gegensatz zur Betrachtung der MS als entzündliche Erkrankung, die durch Autoimmunreaktionen induziert wird, gibt es auch die Hypothese, dass es sich um eine primär neurodegenerative Erkrankung handelt, die eine sekundäre

Immunantwort hervorruft⁶⁰. Diese Sichtweise wird beispielsweise durch epidemiologische Studien unterstützt, in denen gezeigt wurde, dass die Akkumulation neurologischer Defizite nicht vom vorherigen Auftreten von Schüben mit entzündlicher Aktivität, sondern vom Alter der Patienten bzw. der Dauer der Erkrankung abhängt^{61,62}. Dem jedoch widersprechend ist die starke Assoziation mit Polymorphismen in Genen, die an der Regulation des Immunsystems beteiligt sind³⁸.

Die meisten zugelassenen Therapien zielen jedoch nach wie vor auf die inflammatorische Komponente der MS ab⁶³. Interferon(IFN)-β und Glatiramerazetat, als Basistherapie in der MS eingesetzt, wirken auf unterschiedliche, noch nicht vollständig verstandene Weise immunmodulierend. In der Eskalationstherapie werden neben Mitoxantron, einem Chemotherapeutikum, Natalizumab und Fingolimod eingesetzt. Natalizumab ist einen humanisierter Antikörper gegen very late activating antigen (VLA)-4, ein Integrin, welches das Einwandern von Lymphozyten ins ZNS über die Blut-Hirn-Schranke vermittelt. Es reduziert die Schubrate und Progression bei MS-Patienten signifikant ⁶⁴, ist aber mit einem erhöhten Risiko eine *progressive multifocal leukencephalopathy* (PML) zu entwickeln verbunden⁶⁵. Diese wird durch die Infektion von Oligodendrozyten mit dem John Cunningham (JC) Virus in Folge der massiv gestörten Immunüberwachung des ZNS verursacht und tritt bei 2 von 1000 behandelten Patienten auf⁶⁵. Fingolimod bindet den Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptor und inhibiert so das Auswandern von Lymphozyten aus den peripheren lymphatischen Organen⁶⁶. In klinischen Studien erwies sich dieses oral verabreichte Therapeutikum als wirksamer im Vergleich zu Plazebo und sogar gegenüber IFN-etaBehandlung in der Reduktion der Krankheitsaktivität^{67,68}.

1.4. Rolle der CD8⁺ T-Zellen in der Pathogenese der Multiplen Sklerose

Da sich die stärkste genetische Assoziation im HLA-Klasse II Lokus befindet^{37,38}, wurde lange Zeit angenommen, dass MS primär durch autoreaktive CD4⁺ T-Zellen vermittelt wird. Außerdem induzieren in der EAE, die zentrale Bestandteile der MS Pathologie widerspiegelt, CD4⁺ T-Zellen die ZNS-Entzündung. Zur Induktion der EAE werden die Tiere mit Myelinantigenen und komplettem Freundschen Adjuvanz (KFA) immunisiert. CD4⁺ T-Zellen, die aus solchen immunisierten Tieren isoliert werden, lösen nach *in vitro* Expansion und Injektion in gesunden Tieren ebenfalls die Erkrankung aus^{69,70}.

Allerdings mehren sich auch Befunde, die auf einen entscheidenden Beitrag von CD8⁺ T-Zellen zur Pathogenese der MS hinweisen. Es wurden bereits in frühen **genetischen Assoziationsstudien** zusätzlich zu den bekannten HLA-Klasse II Assoziationen auch genetische Assoziationen mit dem HLA-Klasse I Lokus identifiziert. Das HLA-A*0201 Allel vermittelt beispielsweise einen protektiven Effekt, während HLA-A*0301 prädisponierend für MS wirkt^{38,71-74}. Aus Studien an einem humanisierten Maus-Modell, welches transgen für HLA-A*0301 und einen entsprechend restringierten humanen myelin-spezifischen TZR ist, lässt sich eine funktionelle Relevanz der genannten Assoziationen ableiten. Die HLA-A*0301 und TZR doppelt transgenen Mäuse entwickeln milde MS-ähnliche Symptome, während Mäuse, die zusätzlich noch HLA-A*0201 transgen sind, geschützt sind⁷⁵. Weitere Assoziationen mit anderen Allelen des HLA-Klasse I Lokus wurden in neueren Studien postuliert, sind aber noch nicht verifiziert^{76,77}.

Pathologische Untersuchungen des Hirngewebes von MS-Patienten haben gezeigt, dass innerhalb des T-Zell Infiltrats in MS Läsionen CD8⁺ T-Zellen deutlich überwiegen und dass diese klonal expandiert sind^{78–80}. Des Weiteren scheinen **MS-Therapeutika**, die ausschließlich auf CD4⁺ T-Zellen wirken, wie beispielsweise ein depletierender anti-CD4-Antikörper⁸¹, nicht effektiv zu sein, wohingegen solche, die auch gegen CD8⁺ T-Zellen gerichtet sind, erfolgreich angewendet werden. So inhibiert Natalizumab gleichermaßen die Einwanderung von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen in das ZNS von MS-Patienten⁸². Ein weiterer noch nicht zugelassener humanisierter Antikörper, Alemtuzumab (anti-CD52), der sowohl CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen als auch B-Zellen depletiert, hat ebenfalls starke anti-inflammatorische Effekte bei MS-Patienten^{83–85}.

Die EAE wird üblicherweise durch Immunisierung mit MHC-Klasse II restringierten Peptiden induziert, so dass hauptsächlich CD4⁺ T-Zellen zur Pathogenese in diesem Modell beitragen. Zudem führt auch die KFA Immunisierung zu einer bevorzugten CD4⁺ T-Zellantwort⁸⁶. Nur sehr wenige Studien haben in der Vergangenheit die Rolle von CD8⁺ T-Zellen in der EAE untersucht. In diesen konnte jedoch gezeigt werden, dass auch durch Immunisierung mit MHC-Klasse I präsentierten *myelin oligodendrocyte glycoprotein* (MOG)-Peptiden und durch adoptiven Transfer MOG-spezifischer CD8⁺ T-Zellen eine EAE ausgelöst werden kann^{87,88}. Neben dem oben erläuterten TZR und HLA-Klasse I transgenen Mausmodell⁷⁵ wurde kürzlich noch eine weitere transgene Maus beschrieben, bei der MOG-spezifische CD8⁺ T-Zellen die Symptome verschärft^{75,89}. Die bisher beschriebenen Befunde unterstützen ein Modell, in dem CD4⁺ T-Zellen notwendig sind, um eine anhaltende autoimmune Reaktion gegen ZNS Antigene in der MS oder EAE zu induzieren, CD8⁺ T-Zellen aber eine entscheidende Rolle bei der Gewebeschädigung spielen^{90,91}.

Allerdings gibt es auch Studien, in denen CD8⁺ T-Zellen eine **regulatorische Funktion** in der MS und EAE zugeschrieben wurde. Depletion von CD8⁺ T-Zellen führte beispielsweise in zwei unterschiedlichen EAE-Modellen zu einem schwereren Krankheitsverlauf^{92,93}. ZNS-Autoantigen spezifische CD8⁺ T-Zellen von MS-Patienten und gesunden Individuen zeigten eine verstärkte regulatorische Wirkung auf CD4⁺ T-Zellen *in vitro*, welche bei MS-Patienten im Schub vermindert war⁹⁴. Eine spezielle regulatorische CD8⁺ T-Zell-Population erkennt ihr Antigen im Kontext eines untypischen MHC-Klasse Ib Moleküls, Qa-1 in der Maus bzw. HLA-E im Menschen. In Qa-1 defizienten

Mäusen ist die EAE Inzidenz erhöht, da deren CD4⁺ T-Zellen resistent gegen die Suppression durch Qa-1 restringierte CD8⁺ T-Zellen sind⁹⁵. Gleichermaßen sind HLA-E restringierte regulatorische CD8⁺ T-Zellen bei MS-Patienten im Schub funktionell eingeschränkt⁹⁶.

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass die Rolle der CD8⁺ T-Zellen in der Pathogenese der MS kontrovers ist. Daher ist es von besonderem Interesse den funktionellen Phänotyp und die Spezifität der ZNS infiltrierenden CD8⁺ T-Zellen in MS-Patienten aufzuklären. Hierzu wurden bisher nur wenige Studien durchgeführt. Jedoch konnte kürzlich gezeigt werden, dass IL-17 produzierende CD8⁺ T-Zellen besonders in aktiven MS-Läsionen angereichert sind, was darauf schließen lässt, dass diese in der Pathogenese von besonderer Bedeutung sind⁹⁷. Der Phänotyp, die Funktion und die Spezifität der infiltrierenden IL-17 produzierenden CD8⁺ T-Zellen sind jedoch noch unbekannt.

1.5. Rolle von IL-17 und IL-17 produzierenden CD4⁺ T-Zellen in der Multiplen

Sklerose

Im Gegensatz zu den IL-17 produzierenden CD8⁺ T-Zellen sind IL-17 produzierende CD4⁺ T-Zellen, die so genannten **T helper (Th)17-Zellen**, phänotypisch und funktionell bereits besser charakterisiert. Sie entwickeln sich aus naiven T-Zellen, wenn diese in Anwesenheit von TGF- β , IL-6 und IL-23 aktiviert werden und sezernieren über IL-17 hinaus noch weitere Effektormoleküle wie beispielsweise IL-22. Th17-Zellen induzieren unter anderem die Rekrutierung von Neutrophilen und die Ausschüttung antimikrobieller Peptide im infizierten Gewebe. Es wird angenommen, dass sie dadurch eine zentrale Rolle bei der Abwehr gegen extrazelluläre Bakterien und Pilzinfektionen einnehmen⁹⁸.

Im EAE Modell lässt sich ZNS Inflammation sowohl durch den Transfer von IFN-γ produzierenden CD4⁺ T-Zellen (Th1) als auch von Th17-Zellen von immunisierten auf gesunde Tiere übertragen, weshalb angenommen wird, dass beide CD4⁺ T-Zell-Subpopulationen an der Pathogenese beteiligt sind⁹⁹. So war auch die Blockierung der p40 Untereinheit von IL-23, die gleichzeitig auch Untereinheit des Th1 induzierenden Zytokins IL-12 ist, durch anti-p40 Antikörper Injektion protektiv in verschiedenen EAE Modellen^{100,101}. Eine essentielle Rolle der Th17 Zellen legt eine Studie nahe, in der IL-23 defiziente aber nicht IL-12 defiziente Mäuse vor der klassischen EAE Induktion durch Immunisierung geschützt waren¹⁰². IL-17 defiziente Mäuse hingegen entwickelten unverändert EAE¹⁰³, wodurch die Rolle der Th17-Zellen bzw. des IL-17 als Effektormolekül in diesem Modell wiederum in Frage gestellt wird.

Studien **in der MS** zeigten zunächst, dass IL-17 exprimierende mononukleäre Zellen im Blut und im Liquor von MS-Patienten angereichert waren¹⁰⁴. In der Folge wurde dokumentiert, dass CD4⁺ T-Zellen aus dem Blut von MS-Patienten nach polyklonaler Stimulation mehr IL-17 produzierten als CD4⁺ T-Zellen von gesunden Individuen¹⁰⁵. Darüber hinaus war die Frequenz von Th17-Zellen im Liquor von MS-Patienten im Schub signifikant erhöht¹⁰⁶. Funktionell sind humane Th17-Zellen besser in der Lage die BHS zu passieren als Th1 Zellen¹⁰⁷. Kürzlich wurde eine verminderte Frequenz von Th17 Zellen nach erfolgreicher Stammzelltransplantation bei MS-Patienten dokumentiert, während die Th1 Antwort in diesen Patienten unverändert blieb. Interessanterweise zeigte sich hier ebenfalls eine Tendenz zu einer verminderten Frequenz von IL-17⁺CD8⁺ T-Zellen¹⁰⁸. Eine klinischen Studie, in der MS-Patienten mit einem anti-IL-12/IL23 p40 Antikörper (Ustekinumab) behandelt wurden, war allerdings im Gegensatz zu den bereits erwähnten EAE-Studien nicht erfolgreich¹⁰⁹. Bei anderen Autoimmunerkrankungen wurden in klinischen Studien mit Antikörpern, die IL-17 direkt blockieren, hingegen bereits erste Erfolge erzielt¹¹⁰.

Im Allgemeinen wirkt IL-17 als Effektormolekül primär pro-inflammatorisch, beispielsweise durch die Induktion der Sekretion weiterer proinflammatorischer Zytokine¹¹¹. Im Rahmen der MS und EAE wurde darüber hinaus gezeigt, dass IL-17 die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies in Endothelzellen induziert und die Durchlässigkeit der BHS erhöht^{107,112}. Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass es vielerlei Hinweise darauf gibt, dass IL-17 und Th17-Zellen, sowie möglicherweise auch andere IL-17 produzierende Zellen in der Pathogenese der MS eine Rolle spielen.

1.6. CD161 als Oberflächenmarker für IL-17 produzierende T-Zellen

Die Identifizierung und Charakterisierung von T-Zell-Subpopulationen mit bestimmten Effektorfunktionen, wie beispielsweise der Sekretion bestimmter Zytokine, erfolgt häufig anhand der Expression bestimmter Oberflächenmarker. Sowohl CD4⁺ als auch CD8⁺ IL-17 produzierende T-Zellen exprimieren CD161 auf ihrer Oberfläche^{113,114}. CD161 (NKR-P1A oder KLRB1) ist ein C-Typ-Lektin ähnliches Glykoprotein, welches als einziges humanes Homolog der NKR-P1 Genfamilie der Nagetiere erstmals 1994 identifiziert und kloniert wurde¹¹⁵. Die murine NKR-P1 Genfamilie kodiert in C57BL/6 Mäusen vier verschiedene C-Typ-Lektine, NKR-P1A, C, D und F, die hauptsächlich auf NK-Zellen exprimiert werden und deren Aktivität regulieren¹¹⁶. NK-Zellen sind Teil des angeborenen Immunsystems und erkennen infizierte oder neoplastisch entartete Zellen durch die Integration inhibierender und aktivierender Signale, die von verschiedenen Typen von Oberflächenrezeptoren, wie zum Beispiel den genannten C-Typ-Lektinen, vermittelt werden¹¹⁶. NKR-P1C wird von dem in C57BL/6 Mäusen für die Identifikation von NK-Zellen verwendeten Antikörper (NK1.1) erkannt, ist aber auch auf einem geringen Teil der T-Zellen in C57BL/6 Mäusen exprimiert¹¹⁷. Im Gegensatz zum Expressionsmuster in der Maus sind nicht alle humanen NK-Zellen (89%), die Anhand der Expression von CD56⁺ definiert werden, allerdings ca. 25% der humanen T-Zellen, CD161 positiv¹¹⁵. Außerdem ist NKR-P1C in der Maus nicht auf Th17-Zellen exprimiert¹¹⁸. Der einzige bisher identifizierte Ligand für CD161 ist lectin-like transcript 1 (LLT1 oder CLEC2D), ebenfalls ein C-Typ-Lektin, dessen Interaktion mit CD161 auf NK-Zellen inhibierend und auf T-Zellen aktivierend wirkt^{119,120}. LLT1 wird von aktivierten dendritischen Zellen und B-Zellen exprimiert¹²¹. Wie die Signaltransduktion von CD161 funktioniert und wie diese zu gegensätzlichen Effekten in unterschiedlichen Zelltypen führen kann, sowie die Existenz weiterer Liganden für CD161 ist bisher ungeklärt. Die Funktion der Oberflächenexpression von CD161 bei IL-17 produzierenden T-Zellen ist also unbekannt. Dennoch wird dieser Marker zur Charakterisierung der Zellen genutzt.

Anhand der CD161 Expression wurden zunächst innerhalb der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen phänotypisch und funktionell unterschiedliche **Subpopulationen** identifiziert, ohne dass die Assoziation mit der IL-17 Produktion bekannt war¹²². Die meisten CD161 positiven CD4⁺ T-Zellen sind Gedächtnis-T-Zellen, die auf TZR-Stimulation *in vitro* mit Proliferation und Zytokinsekretion reagieren. Innerhalb der CD8⁺CD161⁺ T-Zellen kann zwischen einer CD161 intermediär exprimierenden (CD161^{int}) und einer CD161 hoch exprimierenden (CD161^{hoch}) Population unterschieden werden, wobei die CD161^{hoch}CD8⁺ T-Zellen im Gegensatz zu anderen CD161 exprimierenden T-Zellen anerg zu sein scheinen, also nach klassischer TZR Stimulation *in vitro* weder proliferieren noch Zytokine produzieren¹²². In dieser Studie wurde auch die Beobachtung dokumentiert, dass CD161^{hoch}CD8⁺ T-Zellen eine verminderte Expression der CD8β-Untereinheit aufweisen bzw. zum Teil ausschließlich die CD8α-Untereinheit auf der Oberfläche tragen¹²². Der Großteil der CD8⁺ T-Zellen im peripheren Blut des Menschen exprimiert CD8αβ-Heterodimere auf der Oberfläche.

Im Jahre 2008 wurde schließlich gezeigt, dass innerhalb der CD161⁺CD4⁺ T-Zellen alle **Th17-Zellen** im menschlichen Blut enthalten sind und dass diese darüber hinaus von CD161 positiven naiven Vorläuferzellen abstammen¹¹³. CD161 ist also ein mit dem Th17 Phänotyp assoziierter Oberflächenmarker. Allerdings sind nicht alle CD161⁺CD4⁺ T-Zellen in der Lage, IL-17 zu produzieren, es handelt sich also nicht um einen exklusiven Marker zur spezifischen Identifikation der Th17-Zellen.

Die Gruppe um Paul Klenerman in Oxford publizierte 2010, dass **IL-17 produzierende CD8⁺ T-Zellen** im peripheren Blut des Menschen innerhalb der CD161^{hoch}CD8⁺ T-Zellen angereichert sind¹¹⁴. CD161 ist also nicht nur im CD4⁺ T-Zell-Kompartiment sondern auch innerhalb der CD8⁺ T-Zellen ein Oberflächenmarker, der mit der Fähigkeit IL-17 zu produzieren, assoziiert ist. Tatsächlich exprimieren im Nabelschnurblut auch Vorläuferzellen von IL-17 produzierenden CD8⁺ T-Zellen bereits CD161¹²³.

1.7. Kontroverse über die funktionelle Identität IL-17 produzierender CD8⁺ T-Zellen

Über die phänotypische Identität, Funktion und Antigenspezifität IL-17 produzierender CD8⁺ T-Zellen gibt es verschiedene Studien, die zu teilweise widersprüchlichen Schlussfolgerungen kommen. Wie

bereits im vorherigen Abschnitt beschrieben, sind die IL-17 produzierenden CD8⁺ T-Zellen im Blut des Menschen innerhalb der CD161^{hoch} Gedächtnis-Zell-Subpopulation angereichert¹¹⁴. In einer Studie von 2009 wurde gezeigt, dass es sich bei diesen Zellen um eine T-Zell-Population handelt, die vermutlich durch ihre Anergie und die Expression so genannter ATP binding casette (ABC)ist¹²⁴. Transporterproteine besonders resistent gegenüber Chemotherapeutika ABC-Transporterproteine vermitteln den aktiven Transport toxischer exogener und endogener Substanzen aus der Zelle. Die Autoren der oben genannten Studie schlussfolgerten aus ihren Beobachtungen, dass ausgehend von den CD161^{hoch}CD8⁺ T-Zellen der Pool der virusspezifischen Gedächtnis-Zellen nach einer Lymphopenie, beispielsweise durch Chemotherapie, wieder aufgefüllt werden kann¹²⁴. Eine solche Chemotherapeutika resistente "Gedächtnis-Stammzell-Population" könnte bedeutend für die lebenslange Aufrechterhaltung der Immunität gegen verschiedene Viren auch nach einer Chemotherapie sein¹²⁵. Eine durch die Expression von ABC-Transportern vermittelte Chemotherapeutika Resistenz der CD161^{hoch}CD8⁺ T-Zellen wurde in einer anderen Studie 2011 bestätigt. Allerdings wurde in dieser Studie auch gezeigt, dass der Großteil der CD161^{hoch}CD8⁺ T-Zellen einen semi-invarianten TZR (variable Kette (V) α 7.2) trägt und somit den mucosal-associated *invariant T* (MAIT)-Zellen zuzuordnen ist¹²⁶. Des Weiteren produzierten nach unspezifischer Stimulation nahezu ausschließlich MAIT-Zellen innerhalb der Population der CD8⁺ T-Zellen IL-17¹²⁶. MAIT-Zellen reagieren auf APZ, die mit unterschiedlichen Arten von Bakterien und Hefen infiziert wurden, nicht aber auf viral infizierte Zellen^{127,128}. Diese Aktivierung und die ontogenetische Entwicklung von MAIT-Zellen sind abhängig von MHC-related protein 1 (MR1), einem monomorphen, MHC Klasse I ähnlichen Antigen präsentierendem Molekül¹²⁹. Durch diese Studien wird in Frage gestellt, ob es neben den semi-invarianten, bakterienspezifischen CD8⁺ MAIT-Zellen noch andere CD161 hoch exprimierende und IL-17 produzierende CD8⁺ T-Zellen gibt.

Turtle *et al.* konnten jedoch in der oben beschriebenen Studie aus den CD161^{hoch}CD8⁺ T-Zellen durch Stimulation mit APZ und entsprechenden Peptiden virusspezifische CD8⁺ T-Zellen expandieren¹²⁴. Allerdings war die Frequenz dieser gering. Dies wurde durch eine kürzlich veröffentlichte Studie bestätigt, die sich mit den stammzellartigen Eigenschaften der CD161^{hoch}CD8⁺ T-Zellen beschäftigte. Die Autoren dieser Studie kommen aber zu dem Schluss dass CD161^{hoch}CD8⁺ T-Zellen eher eine Effektor-Gedächtnis-T-Zell- als eine Stammzellpopulation darstellen¹³⁰. Hepatitis C Virus (HCV)-spezifische CD8⁺ T-Zellen exprimieren mit erhöhter Frequenz CD161 im Vergleich zu CD8⁺ T-Zellen, die für andere Viren wie das Humane Immundefizienz-Virus (HIV), das Zytomegalievirus (CMV) oder das Influenza-Virus spezifisch sind¹³¹. Allerdings wurde in dieser Studie nicht nach CD161^{int} und CD161^{hoch}CD8⁺ T-Zellen unterschieden. In einer weiteren Studie konnten mittels *Enzyme Linked Immuno Spot* (ELISPOT) Assay HCV-spezifische IL-17 produzierende CD8⁺ T-Zellen nachgewiesen werden¹¹⁴. Trotz der starken Überlappung der Expression des semi-invarianten MAIT-

TZR und CD161 und der starken Anreicherung IL-17 produzierender CD8⁺ T-Zellen innerhalb der MAIT-Zellen, kann also nicht ausgeschlossen werden, dass neben diesen auch noch andere (virusspezifische) CD8⁺ T-Zellen in der Lage sind, IL-17 zu produzieren.

1.8. *Mucosal-associated invariant T* (MAIT)-Zellen – eine T-Zell-Population mit Eigenschaften des angeborenen Immunsystems

Ein Großteil der IL-17 produzierenden CD8⁺ T-Zellen im peripheren Blut des Menschen ist also den MAIT-Zellen zuzuordnen, die sich neben der hohen Expression von CD161 durch einen semiinvarianten TZR auszeichnen. Die Überrepräsentation der entsprechenden Va7.2-Ja33 TZR-Kette innerhalb doppelt-negativer (CD4⁻CD8⁻) T-Zellen im peripheren Blut gesunder Individuen wurde erstmals 1993 beschrieben¹³². Im Jahre 1999 charakterisierte die Gruppe um Olivier Lantz in Paris die Expression dieser TZR-Kette auf humanen T-Zellen mittels PCR basierter Methoden und zeigte, dass sie eine konstante complemetarity determining region (CDR)3 Länge aufweist und vornehmlich gepaart mit oligoklonalen TZR- β -Ketten der V β 2.1 und V β 13 Familie vorliegt. Darüber hinaus ist sie durch eine starke Homologie mit der entsprechenden TZR- α -Kette (V α 19-J α 33) in der Maus und in Rindern gekennzeichnet¹³³. Die Expression dieser TZR-Kette zeichnet folglich eine im Laufe der Evolution innerhalb der Säugetiere konservierte T-Zell-Population mit limitierter Spezifität und wahrscheinlich einzigartiger Funktion im Immunsystem aus. Ebenso ist das Antigen präsentierende Molekül MR1, welches durch den semi-invarianten TZR erkannt wird und somit für die Selektion und Expansion der MAIT-Zellen essentiell ist¹²⁹, phylogenetisch stark konserviert¹³⁴. Nachdem gezeigt werden konnte, dass Va7.2-Ja33 bzw. Va19-Ja33 T-Zellen in der Lamina propria des Darms beim Menschen bzw. in der Maus angereichert vorkommen, wurden sie fortan als mucosal-associated *invariant T* (MAIT)-Zellen bezeichnet¹²⁹. Obwohl bereits in der entsprechenden Studie 2003 festgestellt wurde, dass für die Expansion der MAIT-Zellen eine Besiedlung des Darms mit kommensalen Bakterien notwendig ist¹²⁹, wurden spezifische mikrobielle Antigene, die von MR1 präsentiert werden und MAIT-Zellen aktivieren erst kürzlich identifiziert¹³⁵. Es handelt sich dabei um Metabolite des Riboflavin (Vitamin B2) Synthesestoffwechsels, der ausschließlich von Bakterien und Hefen vollzogen werden kann¹³⁵. Neben den von klassischen MHC-Molekülen präsentierten Peptiden und den von CD1d an invariant natural killer T (iNKT)-Zellen präsentierten Lipiden bilden diese Antigene eine völlig neue und bisher unbeschriebene Gruppe von TZR Antigenen¹³⁶. Nicht nur bezüglich ihrer außergewöhnlichen Spezifität, sondern auch in weiteren phänotypischen und funktionellen Eigenschaften ähneln die MAIT-Zellen den iNKT-Zellen¹³⁷. iNKT-Zellen exprimieren ebenfalls ein limitiertes und konserviertes Repertoire an T-Zell Rezeptoren, in diesem Fall der Va14-Familie in der Maus und der V α 24-Familie im Menschen¹³⁸. Im Gegensatz zu konventionellen naiven

T-Zellen die zunächst in der Peripherie aktiviert werden müssen (siehe Kapitel 1.1.), zeigen aus dem Thymus isolierte MAIT-Zellen bereits Effektorfunktionen nach Stimulation mit bakteriell infizierten APZ *in vitro*¹³⁹. Genauso sind iNKT-Zellen in der Lage nach Aktivierung schnell große Mengen an Effektorzytokinen zu produzieren¹⁴⁰. MAIT-Zellen lassen sich unabhängig von TZR-Stimulation durch Zytokine des angeborenen Immunsystems, wie zum Beispiel IL-12, IL-18, IL-23 und IL-1β, aktivieren^{130,141–143}. IL-12 spielt auch bei der schnellen Aktivierung und anti-mikrobiellen Wirkung von iNKT-Zellen *in vivo* eine zentrale Rolle¹⁴⁴. In Mausmodellen für bakterielle Infektionen konnte gezeigt werden, dass auch MAIT-Zellen nicht nur *in vitro* auf infizierte APZ reagieren, sondern auch *in vivo* eine schnell einsetzende Immunität gegen bakterielle Infektion vermitteln^{142,145}.

MAIT-Zellen und iNKT-Zellen verwenden demzufolge hoch konservierte T-Zell-Rezeptoren zur Erkennung von Strukturen, die von einem breiten Spektrum an Pathogenen exprimiert werden – ursprünglich eine Eigenschaft der Rezeptoren des angeborenen Immunsystems. Sie stellen also Beispiele für die fließenden Grenzen zwischen angeborener und adaptiver Immunität dar. Die eingangs beschriebene strikte Dichotomie bei der Einordnung verschiedener Immunzellen hat sich zwar bei der Beschreibung des Immunsystems historisch als hilfreich erwiesen, wird aber vor diesem Hintergrund immer öfter relativiert¹⁴⁶.

1.9. Zielsetzung dieser Arbeit

Aufgrund der zunehmenden Evidenz für eine funktionelle Rolle der CD8⁺ T-Zellen in der MS und der Überrepräsentation IL-17 produzierender CD8⁺ T-Zellen in aktiven MS Läsionen⁹⁷ ist die Untersuchung dieses Zelltyps im Rahmen der Pathogenese der Erkrankung von besonderem Interesse. Jedoch sind sowohl die Spezifität als auch die Funktion der humanen IL-17 produzierenden CD8⁺ T-Zellen umstritten. So wurden sie einerseits als virusspezifische Gedächtnis-Stammzellen¹²⁴ und andererseits als bakterienspezifische, semi-invariante MAIT-Zellen mit Eigenschaften des angeborenen Immunsystems beschrieben¹²⁶. Mehrere Studien dokumentierten allerdings übereinstimmend, dass der Großteil der IL-17 produzierenden CD8⁺ T-Zellen sich innerhalb der CD161^{hoch}CD8⁺ T-Zell-Population befindet^{114,126}. Unabhängig von der Assoziation der hohen CD161 Expression mit der Produktion von IL-17 bei CD8⁺ T-Zellen wurde bereits in einer früheren Studie die Beobachtung dokumentiert, dass CD161^{hoch}CD8⁺ T-Zellen eine verminderte Expression der CD8β-Untereinheit aufweisen bzw. ausschließlich CD8 $\alpha\alpha$ -Homodimere auf der Oberfläche exprimieren¹²². Zudem gibt es Hinweise aus Studien an Mausmodellen, dass eine Herunterregulation der CD8β-Expression bei der Selektion autoreaktiver T-Zellen im Thymus induziert wird¹⁴⁷, wodurch Zellen mit diesem Phänotyp im Zusammenhang mit der Untersuchung der Pathogenese der MS als Autoimmunerkrankung von besonderem Interesse sind.

Ein Ziel dieser Arbeit war es, den Phänotyp und die funktionellen Eigenschaften der IL-17 produzierenden CD8⁺ T-Zellen im Allgemeinen zu untersuchen, da diese Zellen neben der MS auch bei anderen Autoimmunerkrankungen eine Rolle spielen könnten. Dabei wurde ein Schwerpunkt auf die Charakterisierung der ausschließlichen Expression von CD8αα-Homodimeren als Oberflächenmarker für diesen Zelltyp gelegt. Darüber hinaus sollte untersucht werden, inwiefern die Herunterregulation der Oberflächenexpression von CD8β mit veränderten phänotypischen und funktionellen Eigenschaften von CD8⁺ T-Zellen einhergeht. Um die Kontroverse bezüglich der Spezifität IL-17 produzierender CD8⁺ T-Zellen näher zu beleuchten, wurden zudem Analysen mit einem Antikörper gegen die semi-invariante TZR-Kette der MAIT-Zellen und mit HLA-A2 Tetrameren zur Identifikation virusspezifischer T-Zellen durchgeführt.

Um erste Anhaltspunkte für Veränderungen innerhalb dieser Population bei MS-Patienten zu erhalten, die ggf. auf eine Beteiligung der Zellen an der Pathogenese der Erkrankung hindeuten könnten, wurde parallel die Frequenz der CD161 exprimierenden T-Zellen im peripheren Blut und Liquor von MS-Patienten und gesunden Individuen bzw. Patienten mit anderen neurologischen Erkrankungen untersucht. Da sich eine signifikante Verminderung der Frequenz der CD8⁺ MAIT-Zellen im Blut von MS-Patienten zeigte, wurden die Frequenzanalysen durch vergleichende funktionelle Untersuchungen dieser Zellen bei MS-Patienten und gesunden Individuen ergänzt. Außerdem wurden mögliche Mechanismen, die zu einer Veränderung der CD8⁺ MAIT-Zellfrequenz im Blut von MS-Patienten beigetragen haben könnten, untersucht.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Material

2.1.1. Humanes Probenmaterial

Alle MS-Patienten wurden durch die Multiple Sklerose Tagesklinik der Fachabteilung Neurologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf (UKE) rekrutiert. Die Diagnosestellung erfolgte durch Ärzte der Tagesklinik entsprechend der 2010 überarbeiteten McDonald-Kriterien¹⁴⁸. Die Schwere der Erkrankung wurde anhand der *expanded disability status scale* (EDSS)¹⁴⁹ dokumentiert. Keiner der Patienten hatte innerhalb des letzten Jahres vor der Probenentnahme immunmodulierende Medikamente erhalten. Die dem Alter und Geschlecht der Patienten angepassten Kohorten gesunder Individuen wurden von den Mitarbeitern des Zentrums für molekulare Neurobiologie und der Multiple Sklerose Tagesklinik rekrutiert. Die Charakteristika der für die vergleichenden Analysen von Blutproben verwendeten Kohorten sind in Tabelle 1 bis Tabelle 3 zusammengefasst. Alle Patienten, von denen Liquor und Blutproben parallel analysiert wurden, sind in Tabelle 4 gelistet. Die Studie wurde im Rahmen des durch die Ethikkommission der Hamburger Ärztekammer genehmigten Antrages "Heterogenität der Multiplen Sklerose" (Referenznummer 2758) durchgeführt. Alle Spender wurden entsprechend aufgeklärt und haben sich schriftlich mit der Verwendung ihrer Proben zu wissenschaftlichen Zwecken einverstanden erklärt.

Für funktionelle Analysen, bei denen es notwendig war Subpopulationen mittels *fluorescence activated cell sorting* (FACS) Sortierung aufzureinigen, und für die Analyse virusspezifischer CD8⁺ T-Zellen wurden aufgrund der großen Menge an benötigten Lymphozyten Leukozytenkonzentrate verwendet, die von der Blutbank des UKE zur Verfügung gestellt wurden. Leukozytenkonzentrate, im Englischen auch als *buffy coats* bezeichnet, entstehen bei der Herstellung von Plasmaprodukten und Erythrozytenkonzentraten aus Vollblutspenden als Nebenprodukt und enthalten neben den angereicherten Leukozyten auch Thrombozyten und noch einen Teil der Erythrozyten.

	n	m:w	Alter (Jahre, MW ± s.d.)	Dauer der Erkrankung (Monate, min. – max.)	EDSS
RRMS	27	5:22	37.7 ± 9.8	60.9 (1–313)	1.96 (0–4)
RRMS/R	12	1:11	38.2 ± 10.6	108.8 (1–332)	1.71 (0–4)
SPMS	9	3:6	49.6 ± 5.7	244.4 (88–398)	4.11 (2.5–6.5)
Alle MS	48	9:39	40.1 ± 10.3	107.3 (1–398)	2.3 (0–6.5)
н	44	11:33	40.3 ± 10.2	nicht zutreffend	nicht zutreffend

Tabelle 1: MS-Patienten und gesunde Individuen, von denen Blutproben auf die Frequenz CD161 exprimierender T-Zellen hin untersucht wurden.

EDSS = *expanded disability status scale*; HI = gesunde Individuen (engl. *healthy individuals*); m = männlich; MS = Multiple Sklerose; MW = Mittelwert; RRMS = schubförmig remittierende MS in Remission; RRMS/R = schubförmig remittierende MS im Schub; s.d. = Standardabweichung (engl. *standard deviation*); SPMS = sekundär progrediente MS; w = weiblich.

Tabelle 2: MS-Patienten und gesunde Individuen, von denen Blutproben für die Analyse der Expression von Aktivierungsmarkern, IL-18Rα und IL-7Rα auf CD8⁺ MAIT-Zellen und für die parallele Bestimmung des IL-18 Serumspiegels verwendet wurden.

	2	m:14/	Alter	Dauer der Erkrankung	EDSS
	"	III.w	(Jahre, MW ± s.d.)	(Monate, min. – max.)	2033
RRMS	19	5:14	36.3 ± 6.7	40.4 (1–132)	1.45 (0–4)
н	16	13:3	37.1 ± 7.1	nicht zutreffend	nicht zutreffend

EDSS = *expanded disability status scale*; HI = gesunde Individuen (engl. *healthy individuals*); m = männlich; MW = Mittelwert; RRMS = schubförmig remittierende Multiple Sklerose in Remission; s.d.= Standardabweichung (engl. *standard deviation*); w = weiblich.

		m:w	Alter	Dauer der Erkrankung	EDSS	
	n		(Jahre, MW ± s.d.)	(Monate, min. – max.)		
RRMS	5	3:2	46.4 ± 2.3	62.8 (1–180)	1.2 (0–2)	
н	6	1:5	46.7 ± 2.9	nicht zutreffend	nicht zutreffend	

Tabelle 3: MS-Patienten und gesunde Individuen, von denen Blutproben verwendet wurden, um die IL-17 Produktion durch CD8⁺ MAIT-Zellen nach IL-7 und TZR-Stimulation zu untersuchen.

EDSS = *expanded disability status scale*; HI = gesunde Individuen (engl. *healthy individuals*); m = männlich; MW = Mittelwert; RRMS = schubförmig remittierende Multiple Sklerose in Remission; s.d. = Standardabweichung (engl. *standard deviation*); w = weiblich.

Tabelle 4:	MS-Patienten	und	Patienten	mit	anderen	neurologischen	Erkrankungen,	von	denen	Blut-	und
Liquorprob	oen auf die Fred	quenz	CD161 exp	orim	ierender 1	Γ-Zellen hin unte	rsucht wurden.				

Fall	Alter	Geschlecht	Diagnose	Dauer der	EDSS
Nummer				Erkrankung	
				(Monate)	
MS01	33	W	RRMS	83	2.5
MS02	22	m	RRMS	5	2
MS03	44	m	RRMS	2	1
MS04	27	m	RRMS	3	2
MS05	39	W	CIS	5	0
MS06	24	W	RRMS/R	21	1
MS07	44	W	RRMS/R	6	2
MS08	41	m	RRMS/R	12	1
MS09	28	m	RRMS/R	1	2
MS10	43	W	RRMS/R	1	2
MS11	32	m	RRMS/R	1	2
MS12	21	m	CIS/R	1	1
MS13	20	W	RRMS	4	2
MS14	24	m	RRMS/R	1	3
MS15	29	W	RRMS	7	2.5
MS16	23	W	RRMS/R	1	2.5
OND01	48	m	Bakterielle Meningitis	nicht zutreffend	nicht zutreffend
			(ohne Erregernachweis)		

OND02	34	m	Virale Meningitis	nicht zutreffend	nicht zutreffend
			(ohne Erregernachweis)		
OND03	51	m	Neurosyphilis	nicht zutreffend	nicht zutreffend
OND04	75	w	Nicht-entzündliche	nicht zutreffend	nicht zutreffend
			Leukenzephalopathie		
OND05	28	w	Pseudotumor cerebri	nicht zutreffend	nicht zutreffend
OND06	40	m	Pseudotumor cerebri	nicht zutreffend	nicht zutreffend

CIS = klinisch isoliertes Syndrom in Remission (engl. *clinically isolated syndrome*); CIS/R = akutes klinisch isoliertes Syndrom; EDSS = *expanded disability status scale*; HI = gesunde Individuen (engl. *healthy individuals*); m = männlich; MS = Multiple Sklerose; OND = andere neurologische Erkrankung als MS (engl. *other neurological diseases*); RRMS = schubförmig remittierende MS in Remission; RRMS/R = schubförmig remittierende MS im Schub; SPMS = sekundär progrediente MS; w = weiblich.

2.1.2. Reagenzien

Tabelle 5: Zur Zellisolierung und Zellkultur verwendete Reagenzien.

Reagenz	Hersteller
Anti-CD3 (Klon OKT3)	Bioxcell
Anti-CD28 (Klon 37407)	R&D Systems
Brefeldin A	BioLegend
BD IMag CD8 Magnetic Particles - DM	BD Biosciences
Bovines Serum Albumin (BSA)	РАА
Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE)	eBioscience
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS)	РАА
Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA, 0,5 M Lösung)	Sigma
Fötales Kälberserum (FCS)	Biochrom
humanes Serum	РАА
Human IL-18 ELISA Kit	Invitrogen
IL-7	Sigma
IL-12 (p70)	Peprotech
IL-18	R&D Systems
Ionomycin	Sigma-Aldrich
Lymphocyte Separation Medium LSM 1077 (Ficoll)	РАА
Penicillin/Streptomycin (10000 units/ml)	Invitrogen
Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA)	Sigma-Aldrich

Phytohämagglutinin (PHA)	Sigma-Aldrich
RPMI 1640 mit stabilem L-Glutamin	РАА
Trypan Blau Lösung (0,4 %)	РАА

Tabelle 6: Zur Stimulation virusspezifischer CD8⁺ T-Zellen verwendete Peptide.

Virus	Antigen	Aminosäuresequenz
Zytomegalievirus (CMV)	pp65	NLVPMVATV
Influenzavirus (Flu)	matrix protein 1	GILGFVFTL

Tabelle 7: Zur Durchflusszytometrie verwendete Antikörper.

Antigen	Klon	Hersteller
CCR4	TG6/CCR4	Biolegend
CCR5	HEK/1/85	Biolegend
CCR6	TG7/CCR6	Biolegend
CCR7	3D12	BD Bioscience
CCR9	BL/CCR9	Biolegend
CTLA4	BNI3	BD Bioscience
HLA-A2	BB7.2	Biolegend
IL-18Rα	H44	Biolegend
IL-7Rα	A019D5	Biolegend
ΤCRγδ	B1.1	Biolegend
ΤCRγδ	11F2	BD Bioscience
Vα7.2	3C10	Biolegend
β1-integrin	TS2/16	Biolegend
β7-integrin	Fib504	Biolegend
CD3	OKT3	Biolegend
CD3	SK7	BD Bioscience
CD3	UCHT1	eBioscience
CD4	RPA-T4	eBioscience
CD8a	Hit8a	Biolegend
CD8a	DK25	DAKO

CD8β	2ST8.5H7	BD Bioscience/ Beckman Coulter
CD26	2A6	eBioscience
CD27	M-T271	BD Bioscience
CD28	CD28.2	BD Bioscience
CD45	2D1	BD Bioscience
CD45RA	HI100	Biolegend
CD45RO	UCHL1	Biolegend
CD49d	L25	BD Bioscience
CD56	B159	BD Bioscience
CD56	MEM 188	eBioscience
CD62L	DREG-56	Biolegend
CD69	FN50	Biolegend
CD161	HP3G10	Biolegend/ eBioscience
CD161	191B8	Miltenyi

Tabelle 8: Zur Durchflusszytometrie verwendete Isotypkontrollantikörper.

lsotyp	Klon	Hersteller
mlgG1	MOPC-21	Biolegend
mlgG2	MOPC-173	Biolegend
mlgM	MM-30	Biolegend

Tabelle 9: Sonstige zur Durchflusszytometrie verwendete Reagenzien.

Reagenz	Hersteller
BD FACS Flow, 20 I	BD Biosciences
BD FACS Clean Solution	BD Biosciences
BD FACS Rinse Solution	BD Biosciences
BD FACS Lysing Solution	BD Biosciences
BD Cytometer Setup & Tracking Beads	BD Biosciences
Extravidin-PE	Sigma-Aldrich
Fixation Buffer	BioLegend
Humanes IgG	Jackson ImmunoResearch

LIVE/DEAD Fixable Aqua Dead Cell Stain Kit LIVE/DEAD Fixable Near-IR Dead Cell Stain Kit Permeabilization Wash Buffer Life Technologies Life Technologies BioLegend

2.1.3. Puffer und Zellkulturmedien

Tabelle 10: Puffer und Zellkulturmedien.

Bezeichnung	Zusammensetzung
T-Zell Komplettmedium (RPMI)	RPMI 1640 mit stabilem L-Glutamin
	5% humanes Serum
	100 Units/ml Penicillin/Streptomycin
Zellseparationspuffer (MACS-Puffer)	Dulbecco's PBS (1x)
	0,5 % BSA
	2 mM EDTA
FACS-Puffer	Dulbecco's PBS (1x)
	0,1 % BSA
	0,02 % NaN ₃

2.1.4. Verbrauchsmaterialien

Tabelle 11: Verbrauchsmaterialen.

48-well Zellkulturplatte	Greiner
96-well Rundboden Zellkulturplatte	Greiner
EDTA-Röhrchen (S-Monovette®, 9 ml)	Sarstedt
Serum-Gel-Röhrchen (S-Monovette [®] , 7,5 ml)	Sarstedt
Einmalpipetten	Greiner
Eppendorfreaktionsgefäß	Sarstedt
FACS-Röhrchen	Sarstedt
FACS-Röhrchen (steril)	BD Biosciences
Falcon-Gefäße	Sarstedt
Kryogefäße	Greiner
Pipettenspitzen	Sarstedt

Neubauer-Zählkammer

Brandt

Digital Bio

2.1.5. Geräte und Software

Tabelle 12: Geräte.

Gerät	Hersteller
BD FACS LSR II Durchflusszytometer	BD Biosciences
BD FACS Aria III Zellsortierer	BD Biosciences
Bestrahlungsgerät Biobeam 2000 (¹³⁷ Cs; 49,2 TBq)	Eckert & Ziegler
Flüssigstickstofftank LABS-40K	Tec Lab
Inkubator Hera Cell 240	Thermo Scientific
Kryobehälter Mr. Frosty	Nalgene
Kühlschrank	Liebherr
Pipetten	Eppendorf
	Gilson
Pipettierhilfe Accu-Jet	Brand
Sterile Werkbank Safe 2020	Thermo Scientific
Gefrierschrank (-20 °C)	Liebherr
Gefrierschrank (-80 °C)	Sanyo
μQuant Spektrophotometer	Bio-Tek
Zellseparationsmagnet	BD Biosciences
Zentrifugen	Heraeus

Tabelle 13: Software.

Software	Hersteller
FACS DiVa Analyse Software	BD Bioscience
FlowJo FACS Analyse Software (Version 7.6.4)	Tree Star, Inc.
Graphpad PRISM	Graphpad Software Inc.

2.2. Methoden

2.2.1. Isolierung und Konservierung von Immunzellen

Isolierung von mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMCs)

Humanes peripheres Vollblut oder Leukozytenkonzentrate wurden nach vorheriger Verdünnung mit raumtemperiertem PBS (Vollblut 1:2, Leukozytenkonzentrat 1:4) in Aliquots à 35 ml auf jeweils 15 ml Ficoll aufgeschichtet und für 30 min bei 2000 rpm und Raumtemperatur (RT) ohne Bremse zentrifugiert. Aufgrund ihrer geringeren Dichte reichern sich die mononukleären Zellen des peripheren Blutes (engl. *peripheral blood mononuclear cells*, PBMCs), unter denen sich auch die Lymphozyten befinden, in der Interphase zwischen dem Ficoll und dem mit PBS verdünnten Blutplasma an und wurden nach Verwerfen des Plasmas abgeerntet. Die im Pellet befindlichen Erythrozyten und Granulozyten wurden ebenfalls verworfen. Die geernteten PBMCs wurden mehrfach mit kaltem PBS (mind. 1:3) gewaschen. Dabei wurde im ersten Schritt aufgrund des noch in der Probe vorhandenen Ficolls 10 min bei 1800 rpm (4°C) zentrifugiert. In den weiteren Waschschritten (2-3x) wurde für 5 min bei 1500 rpm (4°C) zentrifugiert. Zum Schluss wurden die aufgereinigten Zellen in PBS oder T-Zell-Vollmedium aufgenommen und entweder direkt für Experimente verwendet oder kryokonserviert (s.u.). Die Zellzahl wurde mithilfe einer Neubauer Zählkammer unter Anfärbung toter Zellen durch 1:10 Trypan Blau Lösung bestimmt.

Kryokonservierung von PBMCs

Zur Konservierung über längere Zeiträume wurden PBMCs mit 10 % DMSO versetzt und bei einer Zellkonzentration von 10 x10⁶ bis 50x10⁶ Zellen/ml unter flüssigem Stickstoff gelagert. Dazu wurden die Zellen zunächst doppelt konzentriert in T-Zell-Vollmedium aufgenommen. Anschließend wurde langsam ein identisches Volumen an T-Zell-Medium mit 50 % inaktiviertem FCS und 20 % DMSO zugegeben. In Kryoröhrchen aliquotiert wurden die Zellen dann unter Isopropanol mit Hilfe von *Mr. Frosty* Kryo-Einfriergefäßen schrittweise um 1°C pro Minute auf -80°C heruntergekühlt. Nach 24 Stunden bei -80°C wurden die Kryoröhrchen in einen Flüssigstickstofftank überführt.

Zum Auftauen wurden die Zellen zunächst für einige Minuten in einem 37°C warmen Wasserbad aufgewärmt, bis das Medium sich verflüssigt hatte. Dann wurde die Probe durch tropfenweises Zugeben von mindestens 20-fachem Volumen kaltem PBS langsam verdünnt, um das DMSO aus den Zellen auszuspülen. Nach anschließender Zentrifugation (5 min, 1500 rpm, 4°C) wurden die Zellzahl und -viabilität nochmals wie oben beschrieben bestimmt, bevor die Zellen für *in vitro* Experimente oder FACS-Analysen eingesetzt wurden.

Isolierung von CD8⁺ T-Zellen aus PBMCs

CD8⁺ T-Zellen wurden mit Hilfe der *BD IMag CD8 Magnetic Particles* aus PBMCs unter Befolgung des Herstellerprotokolls aufgereinigt. Das Prinzip der Zellisolation beruht auf einer positiven Selektion CD8 exprimierender Zellen durch magnetische Partikel, die mit einem anti-CD8 Antikörper beschichtet sind. PBMCs wurden dazu mit MACS-Puffer gewaschen, hochkonzentriert in der anti-CD8 Partikellösung aufgenommen und für 30 min bei RT inkubiert. Im Anschluss wurde die Zellsuspension mit MACS-Puffer verdünnt und in sterilen FACS-Röhrchen einem starken Magnetfeld ausgesetzt. Dies führt dazu, dass sich die CD8+ Zellen an der Wand des Röhrchens anlagern, und somit durch Abnehmen des Überstands von den anderen PBMCs getrennt werden können. Durch mehrfaches Resuspendieren der CD8⁺ Zellen und erneutes Inkubieren im Magnetfeld wurde die Reinheit der Zellen verbessert, wenn dies erwünscht war. Im Falle einer anschließenden Aufreinigung von CD8⁺ Subpopulationen mittels FACS wurde jedoch mehr Wert auf eine möglichst hohe Zellausbeute gelegt, so dass die Zellen lediglich einmal gewaschen wurden. Die Reinheit der Zellen wurde stets mittels FACS Analyse beurteilt. Die Zellzahl wurde wie oben beschrieben mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer bestimmt.

Separierung von Subpopulationen aus CD8⁺ T-Zellen durch FACS Sortierung

Die Isolierung bestimmter Subpopulationen von CD8⁺ T-Zellen, die durch die Expression mehrerer Oberflächenmarker definiert sind, wurde in Zusammenarbeit mit der HEXT FACS Sorting Core Unit des UKE an einem BD FACSAria III cell sorter durchgeführt. Über die durchflusszytometrische Analyse der Zellen hinaus können an diesem Gerät spezifische Subpopulationen mit hoher Reinheit separiert werden. Das Prinzip beruht darauf, dass der Probenstrahl mit Hilfe einer der Optik des Geräts nachgeschalteten, vibrierenden Nozzle in Tropfen aufgetrennt wird, die jeweils eine Zelle enthalten. Die Tropfen mit den gewünschten Zellen werden mit einer elektrischen Ladung versehen und durch ein Magnetfeld in Auffangröhrchen abgelenkt. So können zeitgleich an diesem Gerät bis zu vier Subpopulationen aus einer Probe aufgereinigt werden. Um die Effizienz des Vorgangs zu erhöhen, wurden zur Isolation von CD8⁺ T-Zell-Subpopulationen die gesamten CD8⁺ T-Zellen zunächst aus PBMCs wie oben beschrieben angereichert. Diese wurden dann mit den zur Identifikation der Subpopulation notwendigen Antikörpern gefärbt, in PBS aufgenommen und wie beschrieben am BD FACSAria III cell sorter der Core Unit separiert. Die Auffangröhrchen wurden zuvor mit FCS beschichtet, um eine Adhäsion der geladenen Zellen an die Wand der Röhrchen zu verhindern. Außerdem wurde in den Röhrchen T-Zell-Vollmedium mit 25% FCS vorgelegt. Der gesamte Vorgang erfolgte unter sterilen Bedingungen bei 4°C. Im Anschluss an die Separierung wurden die Zellen durch Zentrifugation bei 1200 rpm für 7 min bei 4°C pelletiert und je nach anschließender Verwendung in T-Zell-Vollmedium oder PBS aufgenommen. Die Zellzahl wurde mit Hilfe einer

Neubauer Zählkammer bestimmt. Die Reinheit der Subpopulationen wurde durch erneute durchflusszytometrische Analyse kontrolliert und lag stets über 98%.

2.2.2. Zellkulturexperimente

Analyse der Proliferation von T-Zellen

Zur Analyse der Proliferation von T-Zellen wurden diese vor der *in vitro* Stimulation mit Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE) beladen. CFSE ist membranpermeabel und wird innerhalb der Zellen durch Abspaltung der Acetatgruppen fluoreszent. Teilen sich die beladenen Zellen nach Stimulation, wird der Farbstoff gleichmäßig auf die Tochterzellen verteilt, so dass die Tochtergenerationen anhand ihrer Fluoreszenzintensität bei der durchflusszytometrischen Analyse unterschieden werden können. Mithilfe der Analysesoftware *FlowJo* können verschiedene Parameter berechnet werden, die eine vergleichende Beurteilung der Proliferation unter verschiedenen Stimulationsbedingungen erlauben. In dieser Arbeit wurde dazu der Teilungsindex gewählt, der angibt, wie viele Teilungen jede Zelle im Durchschnitt durchlaufen hat, wodurch auch berücksichtigt wird wie groß der Anteil der Zellen war, die sich nicht geteilt haben.

Die Beladung der Zellen mit CFSE vor der Stimulation erfolgte entsprechend des Herstellerprotokolls. 20x10⁶ Zellen/ml (Mindestvolumen 100 μl) wurden in einer Lösung aus 5 μM CFSE in PBS aufgenommen und für 8 min bei 37°C im Dunkeln inkubiert. Bei sehr geringen Zellzahlen wurde der Lösung 5 % FCS zugesetzt. Die Reaktion wurde dann durch Zugabe von kaltem T-Zell-Vollmedium + 25 % FCS und 5-minütiger Inkubation auf Eis gestoppt. Im Anschluss wurden die Zellen durch Zentrifugation (1200 rpm, 7 min, 4°C) pelletiert und nochmals mit T-Zell-Vollmedium gewaschen. Die erfolgreiche Färbung der Zellen wurde vor der Kultur stets durchflusszytometrisch kontrolliert.

Polyklonale TZR-Stimulation von PBMCs oder T-Zell-Subpopulationen

Zur polyklonalen TZR-vermittelten Stimulation von T-Zellen wurde entweder Phytohämagglutinin (PHA) oder ein anti-CD3 Antikörper verwendet, der löslich zur Zellkultur gegeben oder durch Beschichtung der Zellkulturplatten immobilisiert wurde. Zur Immobilisierung wurden die Zellkulturplatten mit 1 μg/ml anti-CD3 in PBS bodenbedeckend (100 μl/*well* in einer 96-*well*-Platte bzw. 200 μl/*well* in einer 48-*well*-Platte) für 4 Stunden bei 37°C inkubiert. Im Falle einer Ko-Stimulation mit anti-CD28 wurden außerdem 5 μg/ml anti-CD28 zugegeben. Im Anschluss wurden die Platten zweimal mit raumtemperiertem PBS gewaschen, bevor die Zellen zur Stimulation ausgesäht wurden. Aufgereinigte T-Zellen wurden in 96-*well*-Platten bei einer Dichte von 100.000 Zellen/*well* in 200 μ l T-Zell-Vollmedium stimuliert, PBMCs in 48-*well*-Platten bei einer Dichte von 1x10⁶ Zellen/*well* in 400 μ l T-Zell-Vollmedium. Im Falle einer Stimulation von T-Zellen in Anwesenheit von *feeder* Zellen, wurden in einer 96-*well*-Platte pro *well* 20.000 T-Zellen und 500.000 *feeder* Zellen ausgesäht. Als *feeder* Zellen wurden PBMCs von einem anderen Spender (allogen) eingesetzt, die vor der Kultur mit 45–60 Gy bestrahlt wurden.

Peptidstimulation Virusantigen-spezifischer CD8⁺ T-Zellen

PBMCs von HLA-A2 positiven Individuen wurden bei einer Dichte von 1,5x10⁶ Zellen/*well* in einer 96*well*-Platte mit 1 μg/ml Peptid (vgl. Tabelle 6) in einem Gesamtvolumen von 200 μl/*well* T-Zell-Vollmedium für 4 Std. stimuliert. Nach 1 Std. wurden 10 μg/ml Brefeldin A zugegeben. Für die spätere Identifikation der peptidspezifischen CD8⁺ T-Zellen wurden die PBMCs vor der Stimulation mit den entsprechenden Tetrameren gefärbt. Dazu wurden 5x10⁶ PBMCs/ml bei 37°C in humanem T-Zell-Vollmedium für 30 min mit den entsprechenden HLA-A2 Tetrameren (1:100) inkubiert. Die Detektion der Zytokinproduktion erfolgte mittels intrazellulärer Zytokinfärbung nach Ausschlussfärbung toter Zellen und Oberflächenfärbung mit anti-CD8. Als positive Kontrolle für die Zytokinfärbung wurde ein Teil der Zellen mit PMA und Ionomycin stimuliert.

IL-7 und TZR-Stimulation von PBMCs

Für die Analyse der IL-17 und IFN- γ Produktion nach IL-7 und TZR-Stimulation wurden kryokonservierte PBMCs von MS-Patienten und gesunden Individuen aufgetaut und zunächst bei einer Dichte von 1×10^6 Zellen/*well* in einer 48-*well*-Platte für zwei Tage mit 10 ng/ml IL-7 in einem Gesamtvolumen von 500 µl T-Zell-Vollmedium kultiviert. Im Anschluss wurden die Zellen in eine neue Zellkulturplatte überführt, die zuvor mit 1 µg/ml anti-CD3 wie oben beschrieben beschichtet worden war. Die anti-CD3 Stimulation erfolgte über Nacht für 12 Std. in Anwesenheit von 2 µg/ml Brefeldin A. Die Zytokinexpression wurde durch intrazelluläre Zytokinfärbung und durchflusszytometrische Analyse quantifiziert.

Stimulation von PBMCs mit IL-12 und IL-18

Zur Stimulation mit IL-12 und IL-18 wurden PBMCs aus frisch abgenommenem peripherem Vollblut gesunder Individuen aufgereinigt und bei einer Dichte von 1x106 Zellen/*well* in einer 48-*well*-Plate in einem Gesamtvolumen von 400 µl T-Zell-Vollmedium ausgesäht. IL-12 wurde in einer konstanten Konzentration von 10 ng/ml zugesetzt. Die optimale Konzentration von IL-18 wurde in Vorversuchen austitriert und lag für eine maximale Stimulation, quantifiziert anhand der CD69 Expression, bei 50– 100 ng/ml. Die CD69 Expression war unter diesen Bedingungen nach 12–18 Std. maximal, weshalb

für die letztendlichen Versuche eine Stimulation von 10 ng/ml IL-12 und/oder 100 ng/ml IL-18 für 12 Std. bei Analyse der CD69 Expression und für 18 Std. bei Analyse der IFN-γ Produktion gewählt wurde. Im letzten Fall wurde für die letzten 6 Std. 10 µg/ml Brefeldin A zur Kultur gegeben. Die Zytokinexpression wurde durch intrazelluläre Zytokinfärbung und durchflusszytometrische Analyse quantifiziert.

Stimulation von PBMCs oder T-Zell-Subpopulationen mit PMA und Ionomycin

Zur direkten Analyse der Zytokinexpression ohne spezifische Stimulation über Oberflächenrezeptoren wurden PBMCs oder aufgereinigte T-Zell-Subpopulationen mit dem Proteinkinase C aktivierenden Mitogenen Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) und dem Ionophor Ionomycin stimuliert. Dazu wurden 500.000 PBMCs oder 100.000 T-Zellen pro *well* in einer 96-*well*-platte in einem Gesamtvolumen von 200 μ l T-Zell-Vollmedium ausgesäht und mit 50 ng/ml PMA, 1 μ g/ml Ionomycin und 10 μ g/ml Brefeldin A für 6–12 Std. inkubiert.

2.2.3. Färbeprotokolle für durchflusszytometrische Analysen

Ausschlussfärbung toter Zellen

Um tote Zellen bei der Datenauswertung ausschließen zu können , wurden diese vor jeder durchflusszytometrischen Analyse von kryokonservierten oder *in vitro* stimulierten PBMCs mithilfe der LIVE/DEAD Fixable Dead Cell Stain Kits der Firma Invitrogen nach Herstellerangaben gefärbt. $1-2 \times 10^6$ Zellen wurden dazu zunächst in 5-ml-FACS Röhrchen überführt, mit kaltem PBS gewaschen (Zentrifugation bei 1500 rpm, 5 min, RT) und anschließend mit 150 µl einer 1:1000 in PBS verdünnten Lösung des Reagenzes gemischt. Nach 30 minütiger Inkubation bei 4°C wurden die Zellen erneut mit kaltem PBS gewaschen und anschließend für weitere Färbeprotokolle verwendet.

Antikörperfärbung von Oberflächenantigenen

Die Färbung von Oberflächenantigenen für die durchflusszytometrische Analyse erfolgte stets mit monoklonalen fluoreszenzmarkierten Antikörpern (Tabelle 7) in 5 ml-FACS-Röhrchen bei 4°C. Alle Waschschritte erfolgten durch Zugabe von 1 ml FACS-Puffer pro Röhrchen und 5 min Zentrifugation bei 1500 rpm und RT. 200 µl Vollblut wurden dazu direkt mit 50 µl eines 5-fach konzentrierten Antikörpercocktails versetzt und für 30–60 min inkubiert. Im Anschluss daran wurden durch Zugabe von 2 ml BD FACS Lysing Solution und 10 minütige Inkubation bei RT die Erythrozyten lysiert und die Leukozyten fixiert. Die Zellen wurden dann durch Zentrifugation pelletiert und einmal mit FACS- Puffer gewaschen bevor sie zur Analyse in 300 μ l FACS-Puffer aufgenommen wurden. 1–2 x 106 PBMCs wurden zur Färbung in 90 μ l FACS-Puffer aufgenommen, mit 10 μ l eines 10-fach konzentrierten Antikörpercocktails gemischt und für 30–60 min inkubiert. Für die Färbung von aufgereinigten PBMCs wurden die Cocktails stets mit einem Überschuss an humanen IgG Antikörpern versetzt, um die unspezifische Bindung der fluoreszenzmarkierten Antikörper an Fc-Rezeptoren zu verhindern. Im Anschluss an die Färbung wurden die PBMCs mit FACS-Puffer gewaschen und für 10 min bei RT in 100 μ l 1%-PFA in PBS fixiert. Nach nochmaligem Waschen wurden die Zellen zur Analyse in 300 μ l FACS-Puffer aufgenommen. Lymphozyten aus dem Liquor wurden durch Zentrifugation (800 rpm, 5 min, RT) gewonnen und nach dem gleichen Protokoll wie PBMCs gefärbt.

Intrazelluläre Zytokinfärbung

Zur intrazellulären Zytokinfärbung wurden stimulierte PBMCs oder T-Zell-Subpopulationen durch Verwendung der entsprechenden Puffer von Biolegend fixiert und dann permeabilisiert. Nach der Kultur wurden die Zellen dazu zunächst mit kaltem PBS gewaschen und falls notwendig wie oben beschrieben mit entsprechenden Antikörpern gegen Oberflächenantigene gefärbt. Im Anschluss erfolgte die Färbung toter Zellen wie oben beschrieben. Dann wurden 1 x 10⁵ bis 1 x 10⁶ Zellen in 100 µl Fixierungspuffer aufgenommen, für 20 min bei RT inkubiert und mit 1 ml Permeabilisierungspuffer versetzt und 5 min bei 1500 rpm und RT zentrifugiert. Dieser Waschschritt wurde nochmals wiederholt, bevor die Zellen in 100 µl Permeabilisierungspuffer aufgenommen und die Antikörper zur Färbung der Zytokine zugegeben wurden. Die Zytokinfärbung erfolgte bei RT für 30–60 min. Im Anschluss wurden die Zellen zweimalig mit Permeabilisierungspuffer gewaschen und in 300 µl FACS Puffer zur Analyse aufgenommen.

Identifikation antigenspezifischer T-Zellen mittels HLA-Tetrameren

Zur Identifikation antigenspezifischer CD8⁺ T-Zellen wurden HLA-A2 Tetramere eingesetzt. Dazu werden biotinylierte HLA-A2-Monomere *in vitro* mit bekannten HLA-A2 restringierten Peptiden beladen und mit fluoreszenzmarkiertem Streptavidin tetramerisiert. Durch die Tetramerisierung erhöht sich die Avidität des HLA-TZR-Komplexes, so dass eine Färbung möglich wird. Die Herstellung der Monomere erfolgte nach publizierten Protokollen¹⁵⁰ im Labor von Prof. Dr. Lars Fugger (Universität Oxford), der diese für die vorliegende Arbeit freundlicherweise zur Verfügung stellte. Zur Tetramerisierung wurden die HLA-A2-Monomere mit PE-markiertem Extravidin in einer 4:1 Stöchiometrie schrittweise in 5 Schritten unter Rotation bei 4°C versetzt. Zur Färbung wurden 1– 5x10⁶ PBMCs von HLA-A2 positiven Individuen in 100 μl FACS-Puffer aufgenommen, mit 1 μl Tetramerlösung versetzt und für 30 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 1 ml FACS-Puffer gewaschen und ggf. mit Antikörpern gegen weitere Oberflächenantigene gefärbt. Im

Anschluss an die Färbung wurden die PBMCs mit FACS-Puffer gewaschen und für 10 min bei RT in 100 μ l 1%-PFA in PBS fixiert. Nach nochmaligem Waschen wurden die Zellen zur Analyse in 300 μ l FACS-Puffer aufgenommen. Die Expression von HLA-A2 der gesunden Individuen wurde zuvor durch durchflusszytometrische Analyse einer Vollblutprobe bestimmt.

2.2.4. Bestimmung des IL-18 Serumspiegels

Aufarbeitung und Konservierung von Serumproben

Serumröhrchen wurden für 10 min bei 3000 rpm und RT zentrifugiert, der Überstand wurde à 500 μ l aliquotiert und bei -80°C gelagert.

IL-18 Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent Assay (ELISA)

Die Bestimmung der IL-18 Konzentration im Serum von MS-Patienten erfolgte mit Hilfe des Human IL-18 ELISA Kit der Firma Invitrogen nach Angaben des Herstellers. Die Serum Proben wurden bei RT aufgetaut und 1:5 mit Assay diluent verdünnt. Mit einem monoklonalen anti-IL-18 (*capture*) Antikörper vorbeschichtete 96-*well*-Platten wurden mit je 100 µl/*well* einer IL-18 Standardreihe und den verdünnten Serumproben jeweils in Dubletten beschickt und 1 Std. bei RT auf einem Schüttler inkubiert. Im Anschluss wurde die Platte vierfach mit 300 µl/*well* Waschpuffer gewaschen und mit 100 µl/*well* einer Lösung eines zweiten monoklonalen mit Meerrettichperoxidase (engl. *horseradish peroxidase*, HRP) konjugierten IL-18 (*detection*) Antikörper für 1 Std. inkubiert. Nach weiteren 4 Waschschritten wurde eine Lösung aus Tetramethylbenzidin (TMB) und H₂O₂ zugegeben. Durch die HRP wird das TMB in blaues TMB-Diimin umgesetzt. Die Reaktion wurde durch Zugabe einer 0,5M H₂SO₄ Lösung nach 30 min gestoppt, was zu einem Farbumschlag von blau nach gelb führt. Die resultierende Absorption kann bei 450 nm in einem Spektrophotometer quantifiziert werden (Referenzwellenlänge 620 nm).

2.2.5. Microarray Genexpressionsanalyse

Zur Analyse der Genexpression von CD8αα im Vergleich zu CD8αβ T-Zellen wurden diese aus frisch abgenommenen Vollblutproben gesunder Individuen mittels FACS Sortierung aufgereinigt und als trockene Pellets zu je 500.000 Zellen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Die Aufreinigung der RNA und die anschließende Microarray-Analyse erfolgte durch die Mitarbeiter des Service Center für Microarray-Analytik des Instituts für Klinische Chemie des UKE. Die RNA wurde aus den aufgereinigten Zellen mittels Phenol-Chloroform-Extraktion und anschließender Isopropanol Präzipitation isoliert. Zur weitern Aufreinigung wurden die Proben nochmals über eine RNeasy MinElute Säule (Quiagen) gegeben. Die Konzentration der RNA wurde am Nanodrop (Pequlab) bestimmt. Die Integrität wurde mit Hilfe eines Bioanalyzers (Agilent Technologies) unter Verwendung des Agilent RNA 6000 Pico Kit überprüft. Die reverse Transkription der RNA in first und second strand cDNA sowie die Herstellung und Aufbereitung der markierten aRNA für die Microarray-Analyse erfolgte unter Verwendung des Gene Chip[®] IVT Express Kits (Affymetrix). Zur anschließenden Microarray-Analytik wurden GeneChip[®] Human Genome U133 Plus 2.0 (Affymetrix) Chips verwendet.

2.2.6. Statistik

Die Normalverteilung der Messwerte wurde zunächst durch einen Kolmogorov-Smirnov-test überprüft. Entsprechend des Ergebnisses wurde zur Analyse statistischer Sinifikanzen entweder ein Student's t-test oder ein Mann-Whitney-U Test durchgeführt. Im Falle gepaarter Analysen von Blut und Liquor Proben wurde ein gepaarter Student's t-test verwendet. Multiple Varianzanalysen wurden mittels one- oder two-way-ANOVA und anschließendem Bonferroni post-test vorgenommen. Eine Quantifikation von Korrelationen zwischen zwei Variablen erfolgten entweder durch Pearson product-moment correlation coefficient oder Spearman's rank correlation coefficient. Alle statistischen Analysen wurden mit Hilfe der GraphPad Prism 5 Software (GraphPad Software, Inc.) durchgeführt. *p*-Werte < 0.05 (*) wurden als signifikant definiert, *p* < 0.01 (**) und *p* < 0.001 (***) als hochsignifikant.
3. ERGEBNISSE

3.1. Identifizierung und Charakterisierung IL-17 produzierender CD8⁺ T-Zellen

IL-17 Produktion durch CD8⁺ T-Zellen ist mit einer hohen Expression des Oberflächenmarkers CD161 assoziiert¹¹⁴. Allerdings produzieren nicht alle CD161^{hoch}CD8⁺ T-Zellen IL-17. Es handelt sich hierbei also nicht um einen exklusiven Marker, anhand dessen sich die IL-17 produzierenden CD8⁺ T-Zellen von anderen CD8⁺ T-Zellen eindeutig abgrenzen lassen. Des Weiteren sind sowohl der Phänotyp als auch die Funktion IL-17 produzierender CD8⁺ T-Zellen bisher wenig charakterisiert. Daher war ein Ziel dieser Arbeit die allgemeinen Eigenschaften dieser T-Zellen zu untersuchen und dabei unter anderem herauszufinden, ob es andere Oberflächenmarker gibt, anhand derer sich die IL-17 produzierenden CD8⁺ T-Zellen ohne eine direkte intrazelluläre Färbung des Zytokins noch eindeutiger identifizieren lassen.

3.1.1. Assoziation von IL-17 Produktion durch CD8⁺ T-Zellen mit verminderter CD8β-Expression

Bereits in einer der ersten Studien zur Charakterisierung der CD161 exprimierenden T-Zellen wurde beobachtet, dass die CD161^{hoch}CD8⁺ T-Zellen eine verminderte CD8β-Expression aufweisen¹²². Zudem gibt es Hinweise aus Studien an Mausmodellen, dass eine Herunterregulation der Expression der CD8β-Untereinheit bei der Selektion autoreaktiver T-Zellen im Thymus induziert wird¹⁴⁷.

Im Rahmen einer ersten phänotypischen Charakterisierung von CD8⁺ T-Zellen im peripheren Blut gesunder Individuen wurde daher neben der Expression von CD161 auch die Expression von CD8 β untersucht. CD8 liegt an der Zelloberfläche entweder als CD8 α a-Homodimer oder CD8 α β-Heterodimer vor¹⁵¹. Für gewöhnlich werden zur Identifizierung von CD8⁺ T-Zellen Antikörper verwendet, die Epitope der CD8 α -Untereinheit erkennen, da diese von allen CD8⁺ T-Zellen exprimiert wird. Wird bei der durchflusszytometrischen Analyse zusätzlich ein anti-CD8 β Antikörper eingesetzt, so erscheinen CD8⁺ T-Zellen, die ausschließlich CD8 α α-Homodimere auf ihrer Oberfläche tragen, im Folgenden als CD8 α α T-Zellen bezeichnet, als CD8 α^+ und CD8 β^- Zellen (Abbildung 1A). Es bestätigte sich bei der parallelen Analyse mit anti-CD161, dass eine starke Assoziation zwischen der Expression von CD161 und der Herunterregulation der CD8 β -Untereinheit besteht. Im Durchschnitt waren 47,59 ± 17,13% der CD161^{hoch}CD8⁺ T-Zellen CD8 β^- , während CD161^{int}CD8⁺ T-Zellen zu 28,55 ± 20,87% und CD161⁻CD8⁺ T-Zellen nur zu 6,96 ± 12,66% aus CD8 $\alpha\alpha$ T-Zellen bestanden (Abbildung 1B). Des Weiteren war das Expressionslevel von CD8 β auf den CD8 $\alpha\beta$ T-Zellen innerhalb der CD161^{int} und CD161^{hoch}CD8⁺ T-Zellen im Vergleich zu CD161⁻CD8 $\alpha\beta$ T-Zellen ebenso graduell vermindert (Abbildung 1C). Es scheint also einen starken Zusammenhang zwischen der Expression von CD161 und einer Verminderung der Expression von CD8β durch CD8⁺ T-Zellen im humanen peripheren Blut zu geben. Daher wurde im Folgenden zunächst untersucht, ob die (ausschließliche) Expression von CD8αα-Homodimeren sich als alternativer und eventuell spezifischerer Marker für IL-17 produzierende CD8⁺ T-Zellen eignet.



Abbildung 1: Assoziation der Expression von CD161 und CD8 β auf CD8⁺ T-Zellen des peripheren Blutes. Kryokonservierte mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMCs) gesunder Individuen (n = 10) wurden aufgetaut und durchflusszytometrisch analysiert. (A) Beispielhafte Darstellung der Identifizierung von CD8 $\alpha\alpha$ und CD8 $\alpha\beta$ T-Zellen innerhalb der CD161^{hoch}, CD161^{int} und CD161⁻ CD8⁺ T-Zellen (CD3⁺CD8⁺ Lymphozyten). Die Zahlen in den Quadranten entsprechen jeweils der prozentualen Frequenz innerhalb der dargestellten Ausgangspopulation. SSC = Seitwärtsstreulicht (engl. *sideward scatter*) (B) Statistische Auswertung der Frequenz von CD8 $\alpha\alpha$ T-Zellen innerhalb der drei angegebenen Subpopulationen von CD8⁺ T-Zellen. (C) Statistische Auswertung der Expression von CD8 β anhand der medianen Fluoreszenzintensität auf CD8 $\alpha\beta$ T-Zellen innerhalb der drei angegebenen Subpopulationen von CD8⁺ T-Zellen. Horizontale Balken entsprechen Mittelwert ± standard error of mean (SEM). Statistik: einfaktorielle Varianzanalyse inkl. Bonferroni post-test. * p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001

Um bestimmte T-Zell-Populationen auf ihre generelle Fähigkeit Zytokine zu produzieren hin zu untersuchen, können diese unspezifisch mit PMA und lonomycin stimuliert werden, was unabhängig von der Expression bestimmter Rezeptoren auf der Zelloberfläche zu einer starken Aktivierung aller T-Zellen führt. Durch die Zugabe von Brefeldin A wird die Sekretion der daraufhin exprimierten Zytokine blockiert, so dass diese im Anschluss intrazellulär angefärbt werden können. Durch gleichzeitige Färbung spezifischer Oberflächenrezeptoren zur Identifikation der zu untersuchenden T-Zell-Population kann auf diese Weise also die Zytokinproduktion verschiedener T- Zellen innerhalb der Gesamtpopulation analysiert werden. In ersten Vorexperimenten, in denen PBMCs gesunder Individuen mit PMA/Ionomycin stimuliert worden waren, war es allerdings nicht gelungen IL-17 produzierende CD8⁺ T-Zellen zu identifizieren. Dies könnte mit der Herunterregulation verschiedener Oberflächenmarker, wie zum Beispiel in diesem Falle CD8 oder CD3, als Reaktion auf die starke Stimulation zusammenhängen. Auch nach physiologischerer Stimulation der T-Zellen mittels anti-CD3 und anti-CD28 war es nicht möglich, innerhalb der PBMCs IL-17 positive CD8 * T-Zellen zu identifizieren. Daher wurden CD8aa und CD8aB T-Zellen mit intermediärer und hoher Expression des CD8β (CD8αβ^{int} bzw.CD8αβ^{hoch}) aus PBMCs zunächst mittels FACS Sortierung entsprechend des in Abbildung 2A gezeigten Schemas aufgereinigt und dann getrennt voneinander mit PMA/Ionomycin und Brefeldin A über Nacht stimuliert. Bei folgenden der durchflusszytometrischen Analyse konnten IL-17 produzierende Zellen identifiziert werden und es zeigte sich, dass diese zwar in der CD8 $\alpha\alpha$ T-Zell-Population deutlich angereichert waren, jedoch auch in den CD8αβ^{int} T-Zellen vorkamen. Im Gegensatz dazu produzierten kaum CD8αβ^{hoch} T-Zellen IL-17 (Abbildung 2B).



Abbildung 2: IL-17 und IFN-γ Produktion von CD8αα, CD8αβ^{int} **und CD8αβ**^{hoch} **T-Zellen. (A)** Aus CD8⁺ T-Zellen (CD56⁻CD4⁻CD8⁺) des peripheren Blutes eines gesunden Individuums wurden per FACS Sortierung entsprechend des dargestellten Schemas CD8αα, CD8αβ^{int} und CD8αβ^{hoch} T-Zellen isoliert. **(B)** Die aufgereinigten Subpopulationen wurden für 12 Std. mit 50 ng/ml PMA und 1 µg/ml Ionomycin in Anwesenheit von 10 µg/ml Brefeldin A stimuliert und anschließend intrazellulär mit monoklonalen Antikörpern gegen IL-17 und IFN-γ gefärbt. Die Zahlen in den Quadranten entsprechen jeweils der prozentualen Frequenz innerhalb der dargestellten Ausgangspopulation. Beispielhaft für zwei unabhängig durchgeführte Experimente.

Eine spätere Analyse der IL-17 produzierenden CD8⁺ T-Zellen bestätigte die Vermutung, dass diese nach Stimulation mit PMA/Ionomycin die Oberflächenexpression des CD8-Moleküls verloren und somit innerhalb der Gesamt-PBMCs nicht mehr als solche identifiziert werden konnten. Neben IL-17 wurde gleichzeitig auch die Produktion von IFN- γ , einem klassischen von CD8⁺ T-Zellen sezernierten Zytokin, gemessen. Die Produktion von IFN- γ war innerhalb der CD8 $\alpha\alpha$ und CD8 $\alpha\beta^{int}$ T-Zellen im Vergleich zu den CD8 $\alpha\beta^{hoch}$ T-Zellen ebenfalls deutlich erhöht (Abbildung 2B). In Übereinstimmung mit ihrem Effektor-Gedächtnis-Zell-Phänotyp könnte es sich also auch bei der vermehrten IL-17 Produktion um eine generell stärkere Expression von Zytokinen durch CD8 $\alpha\alpha$ und CD8 $\alpha\beta^{int}$ T-Zellen und nicht um eine spezifische Anreicherung IL-17 produzierender CD8⁺ T-Zellen innerhalb dieser Subpopulationen handeln. Nach Berechnung der Relation von IL-17 zu IFN- γ produzierenden Zellen in den drei Populationen ergab sich allerdings nach wie vor die höchste relative IL-17 Produktion in der CD8 $\alpha\alpha$ -Population, gefolgt von den CD8 $\alpha\beta^{int}$ T-Zellen, während der Wert in den CD8 $\alpha\beta^{hoch}$ T-Zellen deutlich geringer war (<u>CD8 $\alpha\alpha$ </u>: %IL-17⁺:%IFN- γ^{+} = 0,054; <u>CD8 $\alpha\beta^{int}$ </u>: %IL-17⁺:%IFN- γ^{+} = 0,027; <u>CD8 $\alpha\beta^{hoch}$ </u>: %IL-17⁺:%IFN- γ^{+} = 0,006).

Bezüglich der initialen Fragestellung, ob sich die (ausschließliche) Expression von CD8αα-Homodimeren als alternativer und eventuell spezifischerer Marker für IL-17 produzierende CD8⁺ T-Zellen eignet, bleibt festzuhalten, dass nicht alle IL-17 produzierenden CD8⁺ T-Zellen in der CD8αα T-Zell-Population enthalten waren und auch nicht alle CD8αα T-Zellen IL-17 produzieren. Eine entsprechende Unterscheidung von CD8αα und CD8αβ T-Zellen ist folglich nicht zur eindeutigen Identifizierung der IL-17 produzierenden CD8⁺ T-Zellen geeignet. Dennoch zeigte sich eine deutliche Anreicherung IL-17 produzierender CD8⁺ T-Zellen innerhalb der CD8αα und CD8αβ^{int} Populationen. Eine verminderte oder vollständig abwesende Oberflächenexpression des CD8β Moleküls innerhalb der CD8⁺ T-Zellen scheint sowohl mit einer erhöhten Expression von CD161 als auch mit der Fähigkeit IL-17 zu produzieren assoziiert zu sein.

3.1.2. Allgemeine Charakterisierung von CD8aa T-Zellen

Aufgrund der Assoziation der IL-17 Produktion von CD8⁺ T-Zellen mit einer verminderten CD8β-Expression und der Hinweise aus Studien an Mausmodellen, dass dieser Phänotyp vermehrt bei autoreaktiven T-Zellen vorkommt¹⁴⁷, widmete sich ein Teil dieser Arbeit der allgemeinen Charakterisierung der CD8αα T-Zellen im Vergleich zu T-Zellen mit sehr hoher CD8β-Expression.

Zunächst wurden Blutproben gesunder Individuen durchflusszytometrisch auf die Expression verschiedener Oberflächenmarker in Relation zur CD8β-Expression hin untersucht. Abbildung 3 zeigt ein beispielhaftes Ergebnis dieser Analyse. Anhand der fast homogenen und herausstechend hohen Expression von CD26, IL-7Rα und CCR5 lässt sich schlussfolgern, dass es sich bei den CD8αα T-Zellen tatsächlich um eine phänotypisch und folglich vermutlich auch funktionell eigenständige CD8⁺ T-Zell-Population handelte. Es fällt jedoch auf, dass ein Großteil der CD8αβ^{int} T-Zellen für die genannten Marker ebenfalls hoch positiv war. Hingegen war deren Expression auf den CD8αβ^{hoch} T-Zellen deutlich niedriger oder vollständig abwesend (Abbildung 3). Der Chemokinrezeptor CCR6, welcher innerhalb der CD4⁺ T-Zellen auf den Th17 Zellen vermehrt exprimiert ist¹⁵², war auch auf CD8αα und CD8αβ^{int} T-Zellen erhöht, wohingegen CXCR3, ein Th1/2 assoziierter Chemokinrezeptor, eher niedrig exprimiert war. Des Weiteren waren CD8αα und CD8αβ^{int} T-Zellen kaum positiv für Oberflächenmarker, die eine kürzliche Aktivierung von T-Zellen anzeigen (CD38, HLA-DR und CD57).

Ein Teil der Zellen exprimierte den NK-Zell-Marker CD56, allerdings kein CD16. Das Expressionsmuster von CD62L, CCR7 und CD45RA (CD62L⁻CCR7⁻CD45RA⁻) zeigte an, dass es sich bei den CD8 $\alpha\alpha$ T-Zellen um Effektor-Gedächtnis-T-Zellen handelt. Die RA-Isoform des CD45 Moleküls, einem Pan Lymphozyten Marker, wird nach der Aktivierung zugunsten der Expression der RO-Isoform herunterreguliert, ist also auf Gedächtnis-T-Zellen im Allgemeinen nicht zu detektieren. Das Selektin CD62L und der Chemokinrezeptor CCR7 vermitteln das Rezirkulieren von T-Zellen durch die sekundären lymphatischen Organe und dienen demzufolge der Unterscheidung von Effektor-Gedächtnis- von Zentralen-Gedächtnis- und naiven T-Zellen im peripheren Blut¹⁵³. Bezüglich der Expression der beschriebenen Oberflächenmarker handelt es sich bei den CD8 $\alpha\alpha$ T-Zellen um eine eigenständige Population von Effektor-Gedächtnis-T-Zellen mit einem Th17-ähnlichen Phänotyp. Allerdings wies auch ein Großteil der CD8 $\alpha\beta^{int}$ T-Zellen deutlich unterschied. Diese Ergebnisse stimmen folglich mit den Befunden der Analyse der Zytokinproduktion überein. IL-17 produzierende CD8⁺ T-Zellen konnten ausschließlich innerhalb der CD8 $\alpha\alpha$ und CD8 $\alpha\beta^{int}$ Population identifiziert werden, und waren besonders in der CD8 $\alpha\alpha$ -Population angereichert (Kapitel 3.1.1.).



Abbildung 3: Expression ausgewählter Oberflächenmarker auf CD8⁺ T-Zellen des peripheren Blutes in Abhängigkeit von der CD8β Expression. Frisch abgenommenes Vollblut eines gesunden Individuums wurde nach direkter Färbung mit den entsprechenden fluoreszenzmarkierten monoklonalen Antikörpern und anschließender Lyse der Erythrozyten durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt sind jeweils CD8⁺CD4⁻ Lymphozyten. Beispielhaft für 3 unabhängig gemessene Individuen.

Bei der weiteren vergleichenden Charakterisierung wurde sich in dieser Arbeit darauf beschränkt die CD8 $\alpha\alpha$ T-Zellen mit den CD8 $\alpha\beta^{hoch}$ T-Zellen zu vergleichen, da bereits anhand der Oberflächenmarkerexpression deutlich geworden war, dass die CD8 $\alpha\beta^{int}$ T-Zellen den CD8 $\alpha\alpha$ T-Zellen sehr ähnlich waren, während die größten phänotypischen Unterschiede zwischen den CD8 $\alpha\alpha$ und CD8 $\alpha\beta^{hoch}$ T-Zellen bestanden. Funktionell wurde zunächst die Proliferation der beiden Populationen als Antwort auf klassische TZR Stimulation gemessen. Dazu wurden CD8 $\alpha\alpha$ und CD8 $\alpha\beta^{hoch}$ T-Zellen wie in Abbildung 2A dargestellt per FACS Sortierung aufgereinigt, mit CFSE markiert und entweder mit immobilisiertem anti-CD3 und anti-CD28 oder in Anwesenheit bestrahlter allogener PBMCs als *feeder*-Zellen mit anti-CD3 oder PHA stimuliert. Die CD8 $\alpha\alpha$ T-Zellen zeigten unter allen Bedingungen eine deutlich verminderte proliferative Reaktivität (Abbildung 4). Obwohl sie also einen Effektor-Gedächtnis-Zell-Phänotyp aufwiesen und in Reaktion auf PMA/Ionomycin zum Großteil IFN- γ produzierten, proliferierten die CD8 $\alpha\alpha$ T-Zellen kaum nach unspezifischer TZR-Stimulation.



Abbildung 4: Proliferation von CD8aa und CD8a β^{hoch} T-Zellen nach TZR-Stimulation. CD8aa und CD8a β^{hoch} T-Zellen (CD56⁻CD4⁻CD8⁺) wurden aus mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMCs) eines gesunden Individuums per FACS Sortierung isoliert, mit Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE) gefärbt und anschließend mit immobilisiertem anti-CD3 (1 µg/ml) und anti-CD28 (5 µg/ml) für 7 Tage oder in Anwesenheit von *feeder*-Zellen mit anti-CD3 (0,1 µg/ml) oder PHA (1µg/ml) für 3 Tage stimuliert. Als *feeder* Zellen dienten allogene PBMCs, die vor der Kultur mit 60Gy bestrahlt wurden. Die angegebenen Zahlen entsprechen jeweils dem Teilungsindex (durchschnittliche Anzahl Teilungen pro Zelle). SSC = Seitwärtsstreulicht (engl. *sideward scatter*).

Demnach scheinen die CD8 $\alpha\alpha$ T-Zellen eine CD8⁺ T-Zell-Population mit besonderem Phänotyp zu sein, die nicht oder nur schlecht unter klassischen TZR-stimulierenden Bedingungen zu aktivieren ist. Da in dieser außergewöhnlichen Population gleichzeitig die IL-17 produzierenden T-Zellen angereichert zu sein schienen, wurde eine Microarray-Analyse der Genexpression auf mRNA-Ebene der CD8 $\alpha\alpha$ T-Zellen im Vergleich zu den CD8 $\alpha\beta^{hoch}$ T-Zellen durchgeführt. Als Ausgangsmaterial wurden von zwei gesunden Individuen CD8 $\alpha\alpha$ und CD8 $\alpha\beta^{hoch}$ T-Zellen wie in Abbildung 2A dargestellt mittels FACS Sortierung isoliert. Die Microarray-Analyse erfolgte in Zusammenarbeit mit dem Service Center für Microarray-Analytik des Instituts für Klinische Chemie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf. Die jeweils 50 Zielsequenzen mit der stärksten Hochbzw. Herunterregulation in den CD8αα T-Zellen und die dazugehörigen Gene sind in Tabelle 14 bzw. Tabelle 15 gelistet.

Rang	log ₂ (Expressions-	Gensymbol	Gentitel
	änderung)		
			UDP-Gal:betaGlcNAc beta 1,3-galactosyltransferase,
1	8,5	B3GALT2	polypeptide 2
2	8	ADAM12	ADAM metallopeptidase domain 12
			UDP-Gal:betaGlcNAc beta 1,3-galactosyltransferase,
3	6,9	B3GALT2	polypeptide 2
4	6,65	LTK	leukocyte receptor tyrosine kinase
5	6,55	RORC	RAR-related orphan receptor C
6	6,45	ADAM12	ADAM metallopeptidase domain 12
7	6,35	TRA@ /// TRD@	T cell receptor alpha locus /// T cell receptor delta locus
8	6,25	ME1	malic enzyme 1, NADP(+)-dependent, cytosolic
9	6,2	TYROBP	TYRO protein tyrosine kinase binding protein
10	5,9	TRA@ /// TRD@	T cell receptor alpha locus /// T cell receptor delta locus
			killer cell immunoglobulin-like receptor, three domains,
			long cytoplasmic tail, 1 /// killer cell immunoglobulin-like
			receptor, three domains, long cytoplasmic tail, 2 ///
			similar to killer cell immunoglobulin-like receptor 3DL2
		KIR3DL1 ///	precursor (MHC class I NK cell receptor) (Natural killer-
		KIR3DL2 ///	associated transcript 4) (NKAT-4) (p70 natural killer cell
11	5,8	LOC727787	receptor clone CL-5) (CD158k antigen)
12	5,7	PRSS35	protease, serine, 35
13	5,5	TRD@	T cell receptor delta locus
			killer cell immunoglobulin-like receptor, two domains,
14	5,4	KIR2DS2	short cytoplasmic tail, 2
15	5,3	C8orf83	chromosome 8 open reading frame 83
16	5,15	SLITRK5	SLIT and NTRK-like family, member 5
17	5,15	ME1	malic enzyme 1, NADP(+)-dependent, cytosolic
18	5,1	IL23R	interleukin 23 receptor
19	4,8	P2RY14	purinergic receptor P2Y, G-protein coupled, 14
20	4,8	CEBPD	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), delta
21	4,75	PLD1	phospholipase D1, phosphatidylcholine-specific
			transducin-like enhancer of split 1 (E(sp1) homolog,
22	4,75	TLE1	Drosophila)
23	4,65	LTK	leukocyte receptor tyrosine kinase
	·		killer cell immunoglobulin-like receptor, three domains,
			long cytoplasmic tail, 1 /// killer cell immunoglobulin-like
			receptor, three domains, long cytoplasmic tail, 2 ///
			similar to killer cell immunoglobulin-like receptor 3DL2
		KIR3DL1 ///	precursor (MHC class I NK cell receptor) (Natural killer-
		KIR3DL2 ///	associated transcript 4) (NKAT-4) (p70 natural killer cell
24	4,6	LOC727787	receptor clone CL-5) (CD158k antigen)
25	4,6	CA2	carbonic anhydrase II

Tabelle 14: Liste der 50 am stärksten in CD8 $\alpha\alpha$ im Vergleich zu CD8 $\alpha\beta^{hoch}$ T-Zellen hochregulierten Gene.

			killer cell immunoglobulin-like receptor, three domains,
26	4,55	KIR3DL3	long cytoplasmic tail, 3
27	4,55	SPON1	spondin 1, extracellular matrix protein
28	4,55	TPBG	trophoblast glycoprotein
29	4,5	PLD1	phospholipase D1, phosphatidylcholine-specific
30	4,5	NTN4	netrin 4
31	4,5	IL23R	interleukin 23 receptor
32	4,45	CCR6	chemokine (C-C motif) receptor 6
33	4,35	IL18RAP	interleukin 18 receptor accessory protein
34	4,3	CEBPD	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), delta
35	4,3	NMU	neuromedin U
36	4,25	CDH2	cadherin 2, type 1, N-cadherin (neuronal)
37	4,2	SIGLEC7	sialic acid binding Ig-like lectin 7
38	4,2	S100A9	S100 calcium binding protein A9
39	4,1	IL26	interleukin 26
			killer cell immunoglobulin-like receptor, two domains,
40	4,1	KIR2DL2	long cytoplasmic tail, 2
41	4,1	CCR1	chemokine (C-C motif) receptor 1
			transducin-like enhancer of split 1 (E(sp1) homolog,
42	4,05	TLE1	Drosophila)
43	4	CAMTA1	calmodulin binding transcription activator 1
44	3,95	DAB2IP	DAB2 interacting protein
			collagen-like tail subunit (single strand of homotrimer) of
45	3,95	COLQ	asymmetric acetylcholinesterase
46	3,95	BANK1	B-cell scaffold protein with ankyrin repeats 1
47	3,9	C8orf83	chromosome 8 open reading frame 83
48	3,9	CYP2E1	cytochrome P450, family 2, subfamily E, polypeptide 1
49	3,9	CCR1	chemokine (C-C motif) receptor 1
50	3,85	SPON1	spondin 1, extracellular matrix protein

Tabelle 15: Liste der 50 am stärksten in CD8 $\alpha\alpha$ im Vergleich zu CD8 $\alpha\beta^{hoch}$ T-Zellen herunterregulierten Gene.

Rang	log ₂ (Expressions- änderung)	Gensymbol	Gentitel
1	-8,15	AIF1	allograft inflammatory factor 1
2	-7,9	CD8B	CD8b molecule
3	-7,7	LRRN3	leucine rich repeat neuronal 3
4	-7,35	RUNX2	runt-related transcription factor 2
5	-6,7	LRRN3	leucine rich repeat neuronal 3
6	-6,5	DSC1	desmocollin 1
7	-6,45	CACHD1	cache domain containing 1
8	-5 <i>,</i> 85	MMP28	matrix metallopeptidase 28
9	-5 <i>,</i> 85	FLJ37307	hypothetical LOC283521
10	-5,55	MMP28	matrix metallopeptidase 28
11	-5,35	NOG	noggin
12	-5,35	AIF1	allograft inflammatory factor 1
13	-5,25	MAL	mal, T-cell differentiation protein
14	-5,15	BEND5	BEN domain containing 5
15	-5	PADI4	peptidyl arginine deiminase, type IV
16	-4,75	SCML1	sex comb on midleg-like 1 (Drosophila)
17	-4,7	CCR7	chemokine (C-C motif) receptor 7
18	-4,65	SLC16A10	solute carrier family 16, member 10 (aromatic amino acid

			transporter)
19	-4,6	LEF1	lymphoid enhancer-binding factor 1
			serine peptidase inhibitor, Kazal type 2 (acrosin-trypsin
20	-4,55	SPINK2	inhibitor)
21	-4,55	SCML1	sex comb on midleg-like 1 (Drosophila)
22	-4,5	DEPDC7	DEP domain containing 7
23	-4,5	AK5	adenylate kinase 5
24	-4,45	SNED1	sushi, nidogen and EGF-like domains 1
25	-4,45	LEF1	lymphoid enhancer-binding factor 1
26	-4,45	S100B	S100 calcium binding protein B
27	-4,4	LOC100292909	hypothetical protein LOC100292909
			roundabout, axon guidance receptor, homolog 1
28	-4,35	ROBO1	(Drosophila)
29	-4,35	NRCAM	neuronal cell adhesion molecule
			serpin peptidase inhibitor, clade F (alpha-2 antiplasmin,
30	-4,35	SERPINF1	pigment epithelium derived factor), member 1
31	-4,3	EPHA1	EPH receptor A1
32	-4,25	SDK2	sidekick homolog 2 (chicken)
33	-4,25	CD8B	CD8b molecule
			potassium intermediate/small conductance calcium-
34	-4,25	KCNN4	activated channel, subfamily N, member 4
35	-4,2	PDE9A	phosphodiesterase 9A
36	-4,15	KCTD12	potassium channel tetramerisation domain containing 12
37	-4,1	LOC641518	hypothetical LOC641518
38	-4,1	CNKSR2	connector enhancer of kinase suppressor of Ras 2
39	-4,05	CCDC141	coiled-coil domain containing 141
40	-4,05	TBC1D4	TBC1 domain family, member 4
41	-4	NT5E	5'-nucleotidase, ecto (CD73)
42	-3,95	CDCA7L	cell division cycle associated 7-like
43	-3,95	TBC1D4	TBC1 domain family, member 4
44	-3,9	LRP6	low density lipoprotein receptor-related protein 6
45	-3,9	GJB6	gap junction protein, beta 6, 30kDa
46	-3,85	ISM1	isthmin 1 homolog (zebrafish)
		FAM153A ///	family with sequence similarity 153, member A /// family
		FAM153B ///	with sequence similarity 153, member B /// family with
47	-3,85	FAM153C	sequence similarity 153, member C
48	-3,8	ACTN1	actinin, alpha 1
49	-3,75	PRRT1	proline-rich transmembrane protein 1
			nerve growth factor receptor (TNFRSF16) associated
50	-3,75	NGFRAP1	protein 1

Der Einschluss eines dritten Individuums zur detaillierten statistischen und bioinformatischen Aufarbeitung der Daten steht noch aus. Zusammenfassend kann jedoch bereits festgestellt werden, dass verschiedene Gene, die bekannter Weise mit dem Th17 Phänotyp bei CD4⁺ T-Zellen assoziiert sind¹⁵², auch in den CD8αα T-Zellen hochreguliert waren. Dies gilt zum Beispiel für den Transkriptionsfaktor RORC, der für die Differenzierung von Th17 Zellen essentiell ist, oder den IL-23-Rezeptor. So war auch der Chemokinrezeptor CCR6, der bereits bei der Analyse der Oberflächenmarker erhöht auf den CD8αα T-Zellen exprimiert war, hochreguliert. Außerdem war die Expression von IL-26, einem Zytokin, das auch von Th17 Zellen sezerniert wird¹⁵⁴, in CD8αα T-Zellen erhöht. Des Weiteren war auffällig, dass verschiedene NK-Zell Rezeptoren unter den hochregulierten Genen waren: KIR3DL1/KIR3DL2, KIR2DS2, KIR3DL3, SIGLEC7 und KIR2DL2, sowie KLRB1 (killer cell lectin-like receptor subfamily B, member 1), was CD161 entspricht. Bezüglich der weiteren Untersuchung der Differenzierung und Aktivierung der CD8αα T-Zellen ist die erhöhte Expression verschiedener Signaltransduktionsmoleküle interessant: zum Beispiel B3GALT2, LTK, TYROBP, P2RY14 und PLD1. Ein weiteres herausstechend hoch exprimiertes Gen war ADAM12, eine extrazelluläre Metalloproteinase mit intrazellulärer Signaltransduktionsdomäne, für die verschiedene zelluläre Funktionen, wie Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen oder proteolyische Prozessierung von Wachstumsfaktoren, beschrieben wurden¹⁵⁵.

Die Microarray-Analyse untermauerte entsprechend zunächst den beschriebenen Th17ähnlichen Phänotyp der CD8αα T-Zellen und zeigte außerdem, dass neben CD161 noch weitere NK-Zell-Rezeptoren auf CD8αα T-Zellen hochreguliert sind. Darüber hinaus lieferte die Analyse neue interessante hochregulierte Moleküle, die bei der Differenzierung und Aktivierung der Zellen eine Rolle spielen könnten und zukünftig daraufhin untersucht werden sollen.

3.1.3. MAIT-Zellen repräsentieren den Großteil der IL-17 produzierenden CD8⁺ T-Zellen

In einer 2011 erschienenen Publikation wurde beschrieben, dass der Großteil, wenn nicht sogar alle CD161^{hoch}CD8⁺ T-Zellen den MAIT-Zellen angehört. Diese zeichnen sich unter anderem durch die Expression eines semi-invarianten T-Zell Rezeptors (Vα7.2) aus¹²⁶. Außerdem wurde in der zitierten Studie gezeigt, dass IL-17 Produktion durch CD8⁺ T-Zellen weitestgehend auf die MAIT-Zellen beschränkt ist. Daher wurde sich bei der weiteren Charakterisierung IL-17 produzierender CD8⁺ T-Zellen, vor allem im Zuge der späteren funktionellen Analysen bei MS-Patienten, auf die CD8⁺ MAIT-Zellen konzentriert.

Um zunächst die Überlappung zwischen CD161^{hoch}CD8⁺ T-Zellen und CD8⁺ MAIT-Zellen, definiert als CD161^{hoch}V α 7.2⁺, zu überprüfen, wurden Blutproben gesunder Individuen nach Ko-Färbung gegen CD161 und V α 7.2 durchflusszytometrisch analysiert. Tatsächlich waren 97,7 ± 1,34% der CD161^{hoch}CD8⁺ T-Zellen V α 7.2⁺, während diese TZR-Kette in der übrigen CD8⁺ T-Zell-Population nur mit einer durchschnittlichen Frequenz von 5,98 ± 2,23% vorkam (*n* = 6). Eine weiterführende Charakterisierung der CD8⁺ MAIT-Zellen, beispielhaft dargestellt in Abbildung 5, bestätigte, dass es sich um eine homogene Population handelt, die sich nicht nur durch eine außergewöhnlich hohe Expression von CD161, sondern auch von CD26, IL-7R α , IL-18R α , CCR5 und CCR6 auszeichnet. Das Expressionsmuster von Chemokinrezeptoren (CCR5⁺CCR6⁺CCR7⁻) und Integrinen (α 4⁺ β 1⁺ β 7⁺) deutete darauf hin, dass CD8⁺ MAIT-Zellen vermehrt in der Lage sind in entzündliche Gewebe einzuwandern. Obwohl sie das Integrin α4β7 trugen, welches ein Einwandern in die Darm-assoziierten lymphatischen Gewebe vermittelt, war die Expression von CCR9 nicht erhöht. CCR9 ist der Rezeptor für CCL25, ein Chemokin das an der Rekrutierung von CD8⁺ T-Zellen in die Mukosa des Darms beteiligt ist¹⁵⁶. Es bestätigte sich, dass ein hoher Anteil der MAIT-Zellen CD8β⁻ war (31,4 ± 16,8% der CD8⁺ MAIT-Zellen; 2,7 ± 4,8% der nicht-MAIT CD8⁺ T-Zellen, *n* = 6), und dass die Höhe der CD8β Expression auf den CD8β⁺ MAIT-Zellen vermindert im Vergleich zu anderen CD8⁺ T-Zellen war (7683 ± 3271 MFI von CD8β auf CD8⁺ MAIT-Zellen; 41200 ± 14200 MFI von CD8β auf nicht-MAIT CD8⁺ T-Zellen, *n* = 6). Die Expression verschiedener Marker für Gedächtnis-Zellen (CCR7⁻CD62L⁻CD45RA⁻ CD45RO⁺) bestätigte den bereits in Kapitel 3.1.2. für CD8αα T-Zellen beschriebenen Effektor-Gedächtnis-Zell-Phänotyp. Ein Teil der CD8⁺ MAIT-Zellen war positiv für den NK-Zell-Marker CD56, aber negativ für CD16. Die CD8⁺ MAIT-Zellen stellen also eine phänotypisch homogene T-Zell-Population dar, die mutmaßlich alle CD161^{hoch}CD8⁺ T-Zellen und somit vermutlich auch alle IL-17 produzierenden CD8⁺ T-Zellen enthält.



Abbildung 5: Expression ausgewählter Oberflächenmarker auf CD8⁺ MAIT-Zellen des peripheren Blutes. Frisch abgenommenes Blut eines gesunden Individuums wurde nach direkter Färbung mit den entsprechenden fluoreszenzmarkierten monoklonalen Antikörpern und anschließender Lyse der Erythrozyten durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt sind jeweils $CD3^+TCR\gamma\delta^-CD4^-CD8^+$ Lymphozyten. Dabei wurde zwischen MAIT-Zellen und anderen $CD8^+$ T-Zellen anhand der V α 7.2 und CD161 Expression wie schematisch oben links dargestellt unterschieden. Beispielhaft für drei unabhängig gemessene Individuen.

Um zu klären, ob noch andere CD8⁺ T-Zellen in der Lage sind IL-17 zu produzieren, wurden CD8⁺ MAIT-Zellen (CD161^{hoch}Va7.2⁺) und andere CD161^{+/-} CD8⁺ T-Zellen aus PBMCs gesunder

Individuen mittels FACS Sortierung entsprechend des in Abbildung 6A dargestellten Schemas aufgereinigt und mit PMA/Ionomycin unspezifisch stimuliert. Innerhalb der MAIT-Zellen konnte eine klare IL-17 produzierende Population identifiziert werden, während nur sehr wenige andere CD161⁺ und so gut wie keine CD161⁻ CD8⁺ T-Zellen IL-17 positiv waren. Fast sämtliche IL-17⁺ Zellen produzierten gleichzeitig auch IFN- γ (<u>CD161^{hoch}Va7.2⁺</u>: 13,41 ± 3,54% IFN- γ^+ IL-17⁺ und 0,22 ± 0,39% IFN- γ^- IL-17⁺; <u>CD161⁺Va7.2⁻</u>: 0,51 ± 0,28% IFN- γ^+ IL-17⁺ und 0,09 ± 0,17% IFN- γ^- IL-17⁺; <u>CD161⁻</u>: 0,06 ± 0,06% IFN- γ^+ IL-17⁺ und 0,03 ± 0,03% IFN- γ^- IL-17⁺; *n* = 4, Abbildung 6). Entsprechend der Tatsache, dass die Mehrheit der CD161 exprimierenden Zellen den Gedächtnis-T-Zellen zuzuordnen ist, produzierten diese mehrheitlich IFN- γ , während die CD161⁻CD8⁺ T-Zellen nur ca. zur Hälfte IFN- γ positiv waren (<u>CD161^{hoch}Va7.2⁺</u>: 85,33 ± 2,58% IFN- γ^+ IL-17⁻; <u>CD161⁺Va7.2⁻</u>: 94,03 ± 5,07% IFN- γ^+ IL-17⁻; <u>CD161⁻</u>: 45,12 ± 13,46% IFN- γ^+ IL-17⁻; *n* = 4, Abbildung 6).



Abbildung 6: IL-17 und IFN- γ Produktion von CD8⁺ MAIT-Zellen und anderen CD161⁺/CD161⁻ CD8⁺ T-Zellen. (A) CD8⁺ MAIT-Zellen (CD4⁻TCR $\gamma\delta$ ⁻CD8⁺V α 7.2⁺CD161^{hoch}), nicht-MAIT CD161⁺CD8⁺ T-Zellen (CD4⁻TCR $\gamma\delta$ ⁻CD8⁺V α 7.2⁻CD161⁺) und CD161⁻CD8⁺ T-Zellen (CD4⁻TCR $\gamma\delta$ ⁻CD8⁺V α 7.2^{+/-}CD161⁻) wurden per FACS Sortierung entsprechend des dargestellten Schemas aus mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMCs) aufgereinigt. (B) Nach 12 Std. Stimulation der aufgereinigten Subpopulationen mit 50 ng/ml PMA und 1 µg/ml Ionomycin in Anwesenheit von 10 µg/ml Brefeldin A wurde eine intrazellulären Färbung von IL-17 und IFN- γ durchgeführt. Beispielhafte Darstellung. Die Zahlen in den Quadranten entsprechen jeweils der prozentualen Frequenz innerhalb der dargestellten Ausgangspopulation. (C) Statistische Analyse von vier unabhängigen Experimenten, die wie in B dargestellt ausgewertet wurden. Horizontale Balken entsprechen Mittelwert ± Standard Error of Mean (SEM). Statistik: einfaktorielle Varianzanalyse inkl. Bonferroni post-test. ****p* < 0.001

Um zu überprüfen, ob unter veränderten, eventuell physiologischeren Stimulationsbedingungen neben den invarianten MAIT-Zellen auch andere CD8⁺ T-Zellen IL-17

44

produzieren können, wurden mit Hilfe von HLA-A2-Tetrameren CD8⁺ T-Zellen identifiziert, die immundominante Epitope des Zytomegalievirus (CMV) oder des Influenzavirus (Flu) erkennen. Eine Ko-Färbung der Tetramere mit CD161 auf PBMCs von HLA-A2 positiven gesunder Individuen zeigte, dass zwar ein Teil der virusspezifischen T-Zellen CD161 exprimierte, jedoch nur auf einem intermediären Level. Es war keine CD161^{hoch}Tetramer⁺ Population zu detektieren (Abbildung 7A). PBMCs derselben gesunden Individuen wurden dann mit den den jeweiligen Epitopen entsprechenden Peptiden stimuliert. Dies führte zur spezifischen Aktivierung der Tetramer⁺CD8⁺ T-Zellen, welche anhand der IFN-γ Produktion mittels intrazellulärer Zytokinfärbung detektiert werden konnte. Allerdings fanden sich keine IL-17⁺Tetramer⁺ T-Zellen (Abbildung 7B und C).

Innerhalb der CD8⁺ T-Zellen, die spezifisch für die ausgewählten immundominanten Epitope der weit verbreiteten Zytomegalie- und Influenzaviren sind, konnten also auch nach spezifischer Peptidstimulation keine IL-17 produzierenden Zellen identifiziert werden, obwohl diese CD161 zum Teil auf einer intermediären Höhe exprimierten.



Abbildung 7: CD161 Expression und IFN- γ **/IL-17 Produktion virusspezifischer CD8⁺ T-Zellen. (A)** Kryokonservierte mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMCs) von HLA-A2 positiven gesunden Individuen wurden aufgetaut und mit HLA-A2-Tetrameren zur Detektion von CMVpp65 bzw. FluM1 spezifischen CD8⁺ T-Zellen gefärbt. CD8⁺ Lymphozyten sind dargestellt. Beispielhaft für drei gesunde Individuen je Epitop. (B) PBMCs derselben Individuen wie in A wurden mit den jeweiligen kognaten Peptiden (1 µg/ml) stimuliert und anschließend intrazellulär mit Antikörpern gegen IL-17 und IFN- γ gefärbt. Dargestellt sind CD8⁺Tetramer⁺ Lymphozyten. Beispielhaft für drei gesunde Individuen je Epitop. **(C)** Statistische Quantifizierung IL-17 und IFN- γ produzierender Zellen innerhalb der für die dargestellten Epitope spezifischen CD8⁺ T-Zellen nach Peptid Stimulation und durchflusszytometrischer Analyse wie in B beschrieben. *n* = 3 Individuen pro Epitop. Horizontale Balken entsprechen Mittelwert ± Standard Error of Mean (SEM). Die Zahlen in den Quadranten in A und B entsprechen jeweils der prozentualen Frequenz innerhalb der dargestellten Ausgangspopulation.

3.1.4. Reduzierte Proliferation von CD8⁺ MAIT-Zellen nach klassischer T-Zell-Rezeptor Stimulation

Da die CD8⁺ MAIT-Zellen also höchstwahrscheinlich den Großteil, wenn nicht sogar alle, IL-17 produzierenden CD8⁺ T-Zellen im humanen peripheren Blut ausmachen, sollten diese Zellen im Folgenden weiter funktionell charakterisiert werden. Zunächst wurde ihre Proliferation nach klassischer TZR-Stimulation untersucht. Dazu wurden CD8⁺ MAIT-Zellen (CD161^{hoch}Va7.2⁺) und zum Vergleich andere CD161^{+/-}CD8⁺ T-Zellen aus PBMCs gesunder Individuen mittels FACS Sortierung aufgereinigt, mit CFSE gefärbt und mit anti-CD3 und anti-CD28 stimuliert. Nach vier Tagen wurde die Proliferation anhand der Verdünnung des CFSE in den Tochtergenerationen quantifiziert.

CD8⁺ MAIT-Zellen proliferierten unter diesen Bedingungen kaum, während die anderen CD161^{+/-}CD8⁺ T-Zellen bereits auf die Stimulation mit anti-CD3 hin deutliche Proliferation zeigten, welche durch Zugabe von anti-CD28 noch gesteigert werden konnte. Im Vergleich zu den CD161⁻ CD8⁺ T-Zellen war die proliferative Kapazität der nicht-MAIT CD161⁺CD8⁺ T-Zellen ebenfalls vermindert (Abbildung 8, obere drei Reihen). Durch klassische TZR-Stimulation und anti-CD28 Ko-Stimulation ließen sich CD8⁺ MAIT-Zellen demzufolge nicht zur Proliferation anregen. Um zu testen, ob es andere Ko-Faktoren gibt, die CD8⁺ MAIT-Zellen zur Proliferation anregen können, wurden im nächsten Schritt bestrahlte, autologe PBMCs als *feeder* Zellen zur Kultur gegeben. Die bestrahlten *feeder* Zellen sind nicht mehr in der Lage zu proliferieren und werden mit der Zeit apoptotisch, liefern allerdings noch diverse ko-stimulatorische Signale. Unter diesen Bedingungen konnten CD8⁺ MAIT-Zellen in Abwesenheit bakterieller Antigene zur Proliferation gebracht werden (Abbildung 8, untere zwei Reihen). Zur Aufklärung der Identität des Ko-Faktors oder der Ko-Faktoren sind zukünftig Experimente mit *trans-well*-Platten geplant, mit Hilfe derer zunächst zwischen löslichen oder Zell-Zell-Kontakt vermittelten Faktoren unterschieden werden kann.



Abbildung 8: Proliferation von CD8⁺ MAIT-Zellen nach TZR Stimulation im Vergleich mit anderen CD161⁺/CD161⁻ CD8⁺ T-Zellen. CD8⁺ MAIT-Zellen (CD4⁻TCRγ δ ⁻CD8⁺V α 7.2⁺CD161^{hoch}), nicht-MAIT CD161⁺CD8⁺ T-Zellen (CD4⁻TCRγ δ ⁻CD8⁺V α 7.2^{+/-}CD161⁻) wurden per FACS Sortierung aus mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMCs) aufgereinigt, mit Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE) gefärbt und entweder mit 1µg/ml anti-CD3 und 5µg/ml anti-CD28 (immobilisiert) für vier Tage oder mit 1µg/ml anti-CD3 in Anwesenheit von *feeder* Zellen für sechs Tage stimuliert. Als *feeder* Zellen dienten autologe PBMCs, die vor der Kultur mit 45Gy bestrahlt wurden. Die angegebenen Zahlen entsprechen jeweils dem Teilungsindex (durchschnittliche Anzahl Teilungen pro Zelle). Beispielhaft für drei unabhängig durchgeführte Experimente.

3.2. Analyse von CD161^{hoch}CD8⁺ bzw. CD8⁺ MAIT-Zellen in der Multiplen Sklerose

Eine Veränderung in der Frequenz einer Immunzellpopulation im Blut von MS-Patienten im Vergleich zu gesunden Individuen kann ein erster Hinweis auf eine funktionelle Rolle dieser Zellen in der Pathogenese der Erkrankung sein. Daher wurden über einen Zeitraum von zwei Jahren frische Blutproben von MS-Patienten und von gesunden Individuen (engl. *healthy individual*, HI), die bezüglich des Alters und Geschlechts angepasst waren, gesammelt und auf die Frequenz CD161 exprimierender CD8⁺ T-Zellen hin durchflusszytometrisch untersucht. Des Weiteren wurden Lymphozyten aus dem Liquor von MS-Patienten und Patienten mit anderen neurologischen Erkrankungen (engl. *other neurological dieseases*, OND) entsprechend analysiert.

3.2.1. Verminderte Frequenzen der CD161^{hoch}CD8⁺ T-Zellen im peripheren Blut von MS-Patienten

Bei der Frequenzanalyse der CD161^{hoch} und CD161^{int} CD8⁺ T-Zellen im peripheren Blut wurde zur besseren Eingrenzung der Subpopulationen anhand der Expression der Oberflächenmarker CCR7 und CD45RA zwischen naiven und Gedächtnis-T-Zellen unterschieden. Die gleichzeitige Expression von CCR7 und CD45RA zeigt dabei einen naiven Phänotyp an, während die übrigen T-Zellen sich in zentrale (CCR7⁺CD45RA⁻), Effektor- (CCR7⁻CD45RA⁻) und kürzlich aktivierte Effektor- (CCR7⁻CD45RA⁺) Gedächtnis-T-Zellen unterteilen lassen¹⁵³. Es zeigte sich zunächst, dass der Großteil der CD161 exprimierenden CD8⁺ T-Zellen den Gedächtnis-T-Zellen zuzuordnen ist (Abbildung 9A). 98,65 ± 1,2% der CD161^{int}CD8⁺ T-Zellen und 99,87 ± 0,16% der CD161^{hoch}CD8⁺ T Zellen waren Gedächtnis-T-Zellen, während CD161⁻CD8⁺ T-Zellen zu 41,39 ± 15,44% naiv waren. Innerhalb der CD4⁺ T-Zellen ließen sich anhand der CD161 Expression nur zwei Populationen unterscheiden. Eine CD161^{hoch}CD4⁺ Population war nicht detektierbar. Allerdings gehörte auch in diesem Kompartiment der Großteil der CD161 exprimierenden Zellen den Gedächtnis-T-Zellen an (94,43 ± 3,2%), während 58,65 ± 11,89% der CD161⁻CD4⁺ T-Zellen naiv waren (Abbildung 11A).

Da die meisten CD161^{hoch}CD8⁺ T-Zellen CD45RA negativ waren, wurde deren Frequenz innerhalb der CD45RA⁻CD8⁺ Gedächtnis-T-Zellen quantifiziert und zwischen MS-Patienten und gesunden Individuen (vgl. Tabelle 1) verglichen. Es zeigte sich eine signifikante Verminderung der CD161^{hoch}CD8⁺ T-Zellen im peripheren Blut von MS-Patienten (p = 0,02; Abbildung 9B). Wurde dabei innerhalb der MS-Patienten zwischen Patienten mit RRMS und SPMS unterschieden, war die deutlichste Veränderung in der SPMS Gruppe zu beobachten (Abbildung 9B, rechts). Allerdings war die Anzahl der Patienten in den einzelnen Subgruppen zu gering, um hier statistisch signifikante Ergebnisse zu erzielen. Da SPMS-Patienten naturgemäß deutlich älter sind als Patienten, die sich (noch) in der schubförmig remittierenden Phase der Erkrankung befinden, wurden die im Alter den Gruppen entsprechend angepassten gesunden Individuen getrennt aufgetragen. Hier zeigt sich auch, dass die tendenziell stärkere Verminderung in den SPMS-Patienten nicht durch deren höheres Alter erklärt werden kann, sondern mit der Erkrankung zusammen zu hängen schien.



Abbildung 9: Frequenz CD161 exprimierender CD8⁺ T Zellen im peripheren Blut von MS-Patienten und gesunden Individuen. (A) Repräsentative durchflusszytometrische Analyse der CD161 Expression auf CD8⁺ T-Zellen (CD8⁺CD4⁻ Lymphozyten, links) und des Gedächtnis-Zell-Phänotyps der anhand dieser unterschiedenen Subpopulationen (rechts) im peripheren Blut eines Multiple Sklerose (MS)-Patienten. Naive: CD45RA⁺CCR7⁺, Zentrale Gedächtnis: CD45RA⁻CCR7⁺, Effektor-Gedächtnis: CD45RA⁻CCR7⁻, kürzlich aktivierte Effektor-Gedächtnis: CD45RA⁺CCR7⁻. Die Zahlen in den Quadranten entsprechen jeweils der prozentualen Frequenz innerhalb der dargestellten Ausgangspopulation. (B) Die Frequenz der CD161^{hoch}CD8⁺ T-Zellen wurde innerhalb der CD8⁺CD45RA⁻ Gedächtnis-T-Zellen von gesunden Individuen (engl. *healthy individual*, HI; *n* = 44; vgl. Tabelle 1) und MS-Patienten (MS; *n* = 48; vgl. Tabelle 1) bestimmt. (C) In derselben Kohorte wurde die Frequenz der CD161^{int}CD8⁺ T-Zellen innerhalb der nicht-naiven (nicht CD45RA⁺CCR7⁺) CD8⁺ T-Zellen unter vorherigem Ausschluss von CD56⁺ Zellen quantifiziert. Horizontale Balken entsprechen Mittelwert ± Standard Error of Mean. Statistik: Mann-Whitney-U Test. **p* < 0,05

Interessanterweise korrelierte die Frequenz der CD161^{hoch}CD8⁺ T-Zellen bei gesunden Individuen invers mit dem Alter, bei MS-Patienten hingegen war diese Korrelation aufgehoben (Abbildung 10A). Sie schienen bereits in jüngerem Alter eine verminderte Frequenz von CD161^{hoch}CD8⁺ Als T-Zellen aufzuweisen. nächstes stellte sich die Frage, ob die Frequenzverminderung bei MS-Patienten mit der Dauer oder Schwere der Erkrankung zusammenhing. Es konnte jedoch keine signifikante Korrelation zwischen der Frequenz der CD161^{hoch}CD8⁺ T-Zellen und der Erkrankungsdauer in Monaten oder dem EDSS, einer in der MS Diagnostik gebräuchlichen Leistungsskala, festgestellt werden (Abbildung 10B und C).



Abbildung 10: Korrelation der Frequenz CD161^{hoch}CD8⁺ T Zellen im peripheren Blut mit dem Alter, der Dauer und der Schwere der Erkrankung von MS-Patienten. Die Frequenz der CD161^{hoch}CD8⁺ T-Zellen wurde innerhalb der CD8⁺CD45RA⁻ Gedächtnis-T-Zellen von gesunden Individuen (engl. *healthy individual*, HI; n = 44; vgl. Tabelle 1) und Multiple Sklerose-Patienten (MS; n = 48; vgl. Tabelle 1) bestimmt und gegen das Alter (A) und im Falle der MS-Patienten gegen die Erkrankungsdauer (B) und den *Expanded Disability Status Scale* (EDSS) (C) aufgetragen. Korrelationen: Spearman's rank.

In der gleichen Kohorte wurden parallel die Frequenzen der CD161⁺CD8⁺ und CD161⁺CD4⁺ T-Zellen bestimmt. Diese wurden innerhalb der nicht-naiven, also nicht CCR7 und CD45RA doppeltpositiven, T-Zellen quantifiziert, da im Gegensatz zu den CD161^{hoch}CD8⁺ T-Zellen ein Teil der CD161⁺CD8⁺ T-Zellen einen CD45RA⁺CCR7⁻ kürzlich aktivierten Effektor-Gedächtnis-T-Zell-Phänotyp aufwies. Des Weiteren wurden bei der Analyse CD56⁺ NK-Zellen ausgeschlossen. Diese Strategie wurde bei der Auswertung der Daten zu den CD161^{hoch}CD8⁺ T-Zellen nicht angewendet, da bereits bekannt war, dass es sich hier um eine homogene Population von MAIT-Zellen handelt, die zum Teil graduell CD56 exprimierte (vgl. Kapitel 3.1.3.). Sowohl die Frequenz der CD161⁺CD8⁺ T-Zellen, als auch die der CD161⁺CD4⁺ T-Zellen war nicht signifikant verändert im peripheren Blut von MS-Patienten im Vergleich zu gesunden Individuen. Auch durch eine Auftrennung der MS-Patienten Kohorte nach den Subtypen der Erkrankung wurden keine Unterschiede erkennbar (Abbildung 9C und Abbildung 11B, rechts). Dies deutet darauf hin, dass die signifikante Verminderung der CD161^{hoch}CD8⁺ T-Zellen, bei denen es sich höchstwahrscheinlich fast ausschließlich um MAIT-Zellen handelt (vgl. Kapitel 3.1.3.), im Blut der MS-Patienten spezifisch für diesen Zelltyp ist.



Abbildung 11: Frequenz CD161 exprimierender CD4⁺ T Zellen im peripheren Blut von MS-Patienten und gesunden Individuen. (A) Repräsentative durchflusszytometrische Analyse der CD161 Expression auf CD4⁺ T-Zellen (CD8⁻CD4⁺ Lymphozyten, links) und des Gedächtnis-Zell-Phänotyps der anhand dieser unterschiedenen Subpopulationen (rechts) im peripheren Blut eines MS-Patienten. Naive: CD45RA⁺CCR7⁺, Zentrale Gedächtnis: CD45RA⁻CCR7⁺, Effektor-Gedächtnis: CD45RA⁻CCR7⁻, kürzlich aktivierte Effektor-Gedächtnis: CD45RA⁺CCR7⁻. Die Zahlen in den Quadranten entsprechen jeweils der prozentualen Frequenz innerhalb der dargestellten Ausgangspopulation. (B) Die Frequenz der CD161⁺CD4⁺ T-Zellen wurde innerhalb der nicht-naiven (nicht CD45RA⁺CCR7⁺) CD4⁺ T-Zellen unter vorherigem Ausschluss von CD56⁺ Zellen quantifiziert. HI: engl. *healthy individuals*, gesunde Individuen, n = 44, vgl. Tabelle 1; MS: MS-Patienten, n = 48, vgl. Tabelle 1. Horizontale Balken entsprechen Mittelwert ± Standard Error of Mean (SEM). Statistik: Mann-Whitney-U Test.

3.2.2. Verminderte Frequenz der CD161^{hoch}CD8⁺ bzw. CD8⁺ MAIT-Zellen im Liquor im Vergleich zum peripheren Blut

Die Verminderung der CD8⁺MAIT-Zellen im peripheren Blut der MS-Patienten kann unterschiedliche Ursachen haben. Da für andere infektiöse Erkrankungen wie zum Beispiel Tuberkulose gezeigt wurde, dass eine Umverteilung der Zellen aus dem Blutkreislauf in das infizierte, entzündete Lungengewebe stattfindet^{127,128}, sollte im nächsten Schritt überprüft werden, ob eine solche Umverteilung in das entzündete Gewebe, in diesem Fall das ZNS, auch bei den MS-Patienten erfolgt. Hierzu wurden zunächst die CD8⁺ T-Zellen im Liquor von MS-Patienten und Patienten mit anderen neurologischen Erkrankungen (engl. other neurological diseases, OND) im Vergleich zum peripheren Blut (PB) durchflusszytometrisch analysiert. Insgesamt war die Frequenz der CD161^{hoch}CD8⁺ T-Zellen im Liquor sehr gering (Liquor: 2,19 ± 1,22%; PB: 9,97 ± 0,37% der CD8⁺ T-Zellen, n = 11 MS- und 6 OND-Patienten). In beiden Patientengruppen war eine signifikante Verminderung im Liquor im Vergleich zum peripheren Blut zu beobachten (MS: p = 0,004; OND: p = 0,019; Abbildung 12A). Gleichzeitig zeigte sich bei den CD161⁺CD8⁺ T-Zellen keine eindeutige Tendenz zwischen Liquor und Blut (Abbildung 12B), wohingegen die CD161⁺CD4⁺ T-Zellen im Liquor signifikant erhöht waren (MS: p < 0,0001; OND: p = 0,001; Abbildung 12C). Eine Liquoranreicherung IL-17 produzierender CD4⁺ T-Zellen, die sich innerhalb der CD161⁺CD4⁺ T-Zellen befinden, wurde bereits in anderen Studien gezeigt¹⁰⁶. Signifikante Unterschiede zwischen MS- und OND-Patienten mit entzündlicher oder nichtentzündlicher Erkrankung konnten in dieser Analyse nicht nachgewiesen werden. Allerdings kann dies mit der geringen Anzahl an untersuchten Patienten mit anderen neurologischen Erkrankungen zusammenhängen.

Es besteht die Möglichkeit, dass die extrem niedrige Frequenz der CD161^{hoch}CD8⁺ T-Zellen im Liquor bei der oben beschriebenen Analyse dadurch zustande kam, dass die CD8⁺ MAIT-Zellen in diesem Kompartiment beispielsweise durch Aktivierung ihre hohe CD161 Expression verlieren und somit nicht mehr anhand dieser quantifiziert werden können. Um dies auszuschließen, wurde bei der Analyse einer zweiten Kohorte von MS-Patienten die invariante TZR-Kette mitgefärbt. Es konnte so eine kleine, aber distinkte Population von CD161^{hoch}V α 7.2⁺ CD8⁺ T-Zellen detektiert werden, was bedeutet, dass zumindest nicht alle CD8⁺ MAIT-Zellen die CD161 Expression im Liquor herunterregulierten (Abbildung 12D). Die Frequenz der so detektierten CD8⁺ MAIT-Zellen war, wie die der CD161^{hoch}CD8⁺ T-Zellen in der ersten Kohorte, verglichen mit dem peripheren Blut im Liquor signifikant vermindert (p = 0,029; Abbildung 12E). Eine Quantifizierung aller V α 7.2⁺CD8⁺ T-Zellen unabhängig von ihrer CD161 Expression ergab ebenfalls eine signifikante Verminderung (Liquor: 6,28 ± 3,43%; PB: 17,93 ± 7,41% der CD8⁺ T-Zellen; p = 0,006).



Abbildung 12: Frequenz CD161 exprimierender CD8⁺ und CD4⁺ T Zellen Im Liquor und im peripheren Blut von MS-Patienten und Patienten mit anderen neurologischen Erkrankungen. Lymphozyten aus dem Liquor und dem peripheren Blut (PB) von Multiple Sklerose Patienten (MS, n = 11, vgl. Tabelle 4) und Patienten mit anderen neurologischen Erkrankungen (engl. *other neurological diseases*, OND, n = 6, vgl. Tabelle 4) wurden durchflusszytometrisch analysiert. Innerhalb der CD45⁺CD3⁺CD4⁻CD8⁺ T-Zellen wurden die Frequenzen der CD161^{hoch} (A) und CD161^{int} (B) Zellen und innerhalb der CD45⁺CD3⁺CD8⁻CD4⁺ T-Zellen die Frequenz der CD161⁺ Zellen (C) bestimmt. In einer zweiten Kohorte von MS-Patienten (n = 5, vgl. Tabelle 4) wurde die Frequenz der MAIT-Zellen (CD161^{hoch}Va7.2⁺) innerhalb der CD3⁺CD8⁺ T-Zellen quantifiziert (D und E). Die Zahlen neben den Quadraten entsprechen jeweils der prozentualen Frequenz der MAIT-Zellen innerhalb der CD8⁺ T-Zellen. Statistik: gepaarter Student's t-test. *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0.001

Zusammenfassend konnte keine Anreicherung sondern im Gegenteil eine signifikante Verminderung der CD8⁺ MAIT-Zellen im Liquor von MS-Patienten sowie Patienten mit anderen neurologischen Erkrankungen nachgewiesen werden. Dies bedeutet, dass die Verminderung dieser Zellen im peripheren Blut der MS-Patienten vermutlich nicht durch eine Umverteilung in den Liquor zu erklären ist.

3.2.3. Unveränderte Expression von Aktivierungsmarkern auf CD8⁺ MAIT-Zellen im peripheren Blut von MS-Patienten

Die verminderte Frequenz der CD8⁺ MAIT-Zellen im peripheren Blut der MS-Patienten könnte im Zusammenhang mit einer vermehrten Aktivierung dieser Zellen stehen. Diese könnte zum einen die Einwanderung in entzündliche Gewebe, wie sie vom Oberflächenmarker-Phänotyp der MAIT-Zellen impliziert wird (vgl. Kapitel 3.1.3.), und zum anderen aktivierungsinduzierten Zelltod, ein Mechanismus der im Zusammenhang mit der Depletion von MAIT-Zellen im Blut von HIV infizierten Personen postuliert wurde¹⁵⁷, zur Folge haben.

Um den Aktivierungsstatus der CD8⁺ MAIT-Zellen zu quantifizieren, wurde eine durchflusszytometrische Analyse der Oberflächenexpression der Aktivierungsmarker HLA-DR, CD38 und CD57 auf PBMCs einer zweiten Kohorte von MS-Patienten und entsprechend des Alters und Geschlechts angepassten gesunden Individuen (vgl. Tabelle 2) durchgeführt. Wie bereits in Kapitel 3.1.3. gezeigt, ist die Expression der genannten Marker sehr gering auf den CD8⁺ MAIT-Zellen gesunder Individuen. Eine signifikante Induktion der Expression bei MS-Patienten konnte nicht nachgewiesen werden (Abbildung 13, links). Eine Korrelation der Expression von HLA-DR, CD38 und CD57 mit der Frequenz der CD8⁺ MAIT-Zellen, was einen Zusammenhang zwischen der Aktivierung der Zellen und ihrer Verminderung im Blut andeuten würde, konnte ebenfalls nicht nachgewiesen werden (Abbildung 13, rechts). Auch wenn man die Daten der MS-Patienten und gesunden Individuen für diese Analyse zusammenführte, ergab sich keine signifikante Korrelation. Lediglich im Falle des HLA-DR ist sowohl eine Tendenz zur erhöhten Expression mit der CD8⁺ MAIT-Zellfrequenz zu erkennen. Durch eine Vergrößerung der Stichproben könnten hier eventuell signifikante Effekte erzielt werden.



Abbildung 13: Expression der Aktivierungsmarker HLA-DR, CD38 und CD57 auf CD8⁺ MAIT-Zellen im peripheren Blut von MS-Patienten und gesunden Individuen. Kryokonservierte mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMCs) von Multiple Sklerose Patienten (MS, n = 19, vgl. Tabelle 2) und gesunden Individuen (engl. *healthy individuals*, HI, n = 16, vgl. Tabelle 2) wurden simultan aufgetaut und durchflusszytometrisch analysiert. Das Expressionsmuster von HLA-DR⁺ (A), CD38⁺ (B) und CD57⁺ (C) auf CD8⁺MAIT-Zellen (CD3⁺TCRgd⁻CD4-CD8⁺Va7.2⁺CD161^{hoch}) im Vergleich zu anderen (nicht-MAIT) CD8⁺ T-Zellen (CD3⁺TCRgd⁻CD4-CD8⁺ nicht-Va7.2⁺CD161^{hoch}) ist beispielhaft dargestellt (links). Die Frequenzen der für die jeweiligen Aktivierungsmarker positiven Zellen wurde innerhalb der CD8⁺ MAIT-Zellen quantifiziert (mitte) und auf eine Korrelation mit der Frequenz der CD8⁺ MAIT-Zellen innerhalb der CD8⁺ T-Zellen hin untersucht (rechts). Statistik: Mann-Whitney-U Test und Spearman rank Korrelation (A und B); Student`s t-Test und Pearson product-moment Korrelation (C).

3.3. Aktivierung durch IL-18 als Mechanismus der Frequenzverminderung von

CD8⁺ MAIT-Zellen im Blut von MS-Patienten

MAIT-Zellen exprimieren ein hohes Level des IL-18Rα (vgl. Kapitel 3.1.3.) und es ist bekannt, dass IL-18 im Serum von MS-Patienten erhöht vorliegt^{158,159}. In einer Publikation von 2012 wurde zudem gezeigt, dass CD161^{hoch}CD8⁺ T-Zellen durch Zugabe von IL-12 und IL-18 zur Proliferation unter anti-CD3 und anti-CD28 Stimulation gebracht werden können¹³⁰. Außerdem konnten MAIT-Zellen aus der Maus in Abwesenheit bakterieller Antigene durch IL-12 aktiviert werden¹⁴². Kürzlich publizierte Befunde zeigten darüber hinaus, dass MAIT-Zellen nach Aktivierung mit bakteriellen Antigenen *in vitro* durch aktivierungsinduzierten Zelltod depletiert werden¹⁵⁷. Daher sollte im nächsten Schritt näher untersucht werden, ob die verminderte Frequenz der CD8⁺ MAIT-Zellen im peripheren Blut von MS-Patienten eventuell durch eine vermehrte Aktivierung und in der Folge induzierten Zelltod im Zusammenhang mit einem erhöhten IL-18 Serumspiegel zustande kommen könnte.

3.3.1. In vitro Aktivierung von CD8⁺ MAIT-Zellen durch IL-18

Zunächst wurde dazu die Aktivierung der CD8⁺ MAIT-Zellen durch IL-18 im Vergleich zu anderen CD8⁺ T-Zell-Populationen in vitro genauer untersucht. Die Inkubation von PBMCs gesunder Individuen mit IL-18 führte zur Induktion des Aktivierungsmarkers CD69 spezifisch auf den CD8⁺ MAIT-Zellen, während die Expression von CD69 auf anderen CD8⁺ naiven oder Gedächtnis-Zellen unverändert blieb (Abbildung 14A und B). Da bekannt ist, dass IL-12 und IL-18 synergistische Effekte bei der Aktivierung von T-Zellen haben^{160–163}, wurde zusätzlich IL-12 zur Stimulation eingesetzt. Hierdurch konnte das Expressionslevel von CD69 auf den CD8⁺ MAIT-Zellen noch gesteigert werden, wohingegen auch diese Stimulation nicht zur Aktivierung anderer CD8⁺ T-Zellen führte (Abbildung 14C). Um festzustellen, ob die Aktivierung der CD8⁺ MAIT-Zellen mit den genannten Zytokinen auch zu einer gesteigerten Effektorfunktion führt, wurde in unabhängigen weiteren Experimenten eine intrazelluläre Färbung von IFN-γ nach identischer Stimulation durchgeführt. IL-18 wurde ursprünglich als IFN-y inducing factor (IGIF) identifiziert¹⁶⁴. Es zeigte sich, dass nach Inkubation mit IL-18 und IL-12 mehr als 50% der CD8⁺ MAIT-Zellen IFN-y produzierten, während eine alleinige Inkubation mit IL-18 oder IL-12 nur sehr wenige Zellen zur IFN-y Produktion anregte (Abbildung 14D und E). In diesem Experiment konnten unter IL-12 und IL-18 Stimulation auch einige andere CD8⁺ Gedächtnis-T-Zellen detektiert werden, die IFN-y positiv waren. Allerdings war deren Frequenz im Vergleich zum Effekt bei den CD8⁺ MAIT-Zellen sehr gering.



Abbildung 14: Aktivierung von CD8⁺ MAIT-Zellen durch IL-18 und IL-12. Frisch aufgereinigte mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMCs) gesunder Individuen wurden mit 10 ng/ml IL-12 und/oder 100 ng/ml IL-18 für 12 Std. (A-C, F, G) oder für 18 Std. (D,E) stimuliert. **(A)** Beispielhafte Darstellung der CD69 Expression auf CD8⁺ MAIT-Zellen (CD3⁺CD8⁺Va7.2⁺CD161⁻), CD8⁺ nicht-MAIT-Gedächtnis-T-Zellen (CD3⁺CD8⁺Va7.2^{+/-}CD161⁻/⁺CD45RA⁻) und naiven CD8⁺ T-Zellen (CD3⁺CD8⁺Va7.2^{+/-}CD161^{-/+}CD45RA⁺) nach 12Std. Stimulation mit IL-12 und/oder IL-18. **(B)** Statistische Analyse der Frequenz CD69 exprimierender Zellen innerhalb der CD8⁺ MAIT, CD8⁺ nicht-MAIT-Gedächtnis-T-Zellen und naiven CD8⁺ T-Zellen quantifiziert wie in A dargestellt. **(C)** Quantifizierung des Expressionslevels von CD69 auf CD69⁺ Zellen innerhalb der drei CD8⁺ Subpopulationen anhand der medianen Fluoreszenzintensität in Relation zur unstimulierten Kontrolle. **(D)** Beispielhafte

Darstellung der IFN- γ Expression nach Stimulation mit IL-12 und IL-18 für 18 Std., in den letzten 6 Std. in Anwesenheit von 10 µg/ml Brefeldin A. CD8⁺ MAIT, CD8⁺ nicht-MAIT-Gedächtnis-T-Zellen und naive CD8⁺ T-Zellen wurden wie in A beschrieben unterschieden. Die Zahlen in den Quadraten entsprechen jeweils der prozentualen Frequenz der IFN- γ^+ Zellen innerhalb der dargestellten Ausgangspopulation. **(E)** Statistische Quantifizierung IFN- γ positiver Zellen innerhalb der drei CD8⁺ Subpopulationen. **(F)** Frequenz der CD8⁺ MAIT Zellen innerhalb der CD8⁺ T-Zellen nach 12 Std. Stimulation mit IL-12 und/oder IL-18 in Relation zur unstimulierten Kontrolle. **(G)** Korrelation der wie in F bestimmten Frequenz der CD8⁺ MAIT-Zellen in der Kultur mit der Frequenz der CD69⁺ Zellen innerhalb dieser Population nach 12 Std. Stimulation mit IL-12 und IL-18. A-C, F,G: n = 8 gesunde Individuen in zwei unabhängigen Experimenten. D,E: n = 4 gesunde Individuen in zwei unabhängigen Experimenten. Statistik: ein- oder zweifaktorielle Varianzanalyse inkl. Bonferroni post-test. *p <0,05; **p < 0,01; ***p < 0.001. Korrelation: Pearson product-moment.

Vor dem Hintergrund, dass anhand der CD69 Expression in den vorherigen Experimenten keine Aktivierung anderer CD8⁺ T-Zellen gemessen werden konnte, ist es wahrscheinlich dass es sich bei den IFN-γ⁺ nicht-MAIT Zellen um eine Verunreinigung durch MAIT-Zellen bei der Analyse der durchflusszytometrischen Daten handelt. Die Identifizierung der MAIT-Zellen (Va7.2⁺CD161^{hoch}) war nach Inkubation mit Brefeldin A und dem mit Fixierung und Permeabilisierung verbundenen Färbeprotokoll der intrazellulären Zytokinfärbung erschwert.

Eine funktionelle und spezifische Aktivierung von CD8⁺ MAIT-Zellen durch IL-18 mit synergistischen Effekten durch IL-12 konnte also *in vitro* beobachtet werden. Nachdem publiziert worden war, dass MAIT-Zellen nach Aktivierung mit bakteriellen Antigenen *in vitro* durch Apoptose aus der Kultur depletiert werden¹⁵⁷, wurde eine Reanalyse der oben beschriebenen Daten zur Induktion des CD69 nach IL-18 Aktivierung durchgeführt. Dabei stellte sich heraus, dass auch die Aktivierung mit IL-12 und IL-18, welche den stärksten Stimulus für CD8⁺ MAIT-Zellen in diesen Experimenten darstellte (Abbildung 14A-C), zur signifikanten Verminderung der Frequenz der CD8⁺ MAIT-Zellen in der Kultur führte (Abbildung 14F). Diese Depletion korrelierte signifikant mit dem Grad der Aktivierung, der anhand der Frequenz der CD69 positiven Zellen innerhalb der CD8⁺ MAIT-Zellen quantifiziert wurde (Abbildung 14G). Dieses deutet darauf hin, dass die MAIT-Zellen *in vitro* auch in Folge einer Stimulation mit IL-18 in Anwesenheit von IL-12 aktivierungsinduzierten Zelltod erleiden können. Ein direkter Nachweis der Apoptose unter diesen Bedingungen steht noch aus.

3.3.2. Zusammenhang zwischen CD8⁺ MAIT-Zell Frequenz und IL-18 Serumspiegel bei MS-Patienten

Aufgrund der *in vitro* gezeigten Reduktion der MAIT-Zellfrequenz nach IL-18 Stimulation, sollte als nächstes überprüft werden, ob auch *in vivo* ein Zusammenhang zwischen der Frequenz der CD8⁺ MAIT-Zellen und dem IL-18 Serumspiegel besteht. Dazu wurden Seren und PBMCs von MS-Patienten simultan untersucht. Mittels ELISA wurde die Konzentration von IL-18 im Serum bestimmt, während innerhalb der zum gleichen Zeitpunkt aufgearbeiteten PBMCs die Frequenz der CD8⁺ MAIT-Zellen durchflusszytometrisch ermittelt wurde. Es ließ sich so eine signifikante inverse Korrelation der CD8⁺ MAIT-Zellfrequenz mit dem IL-18 Serumspiegel nachweisen (Abbildung 15A). Die Reduktion der CD8⁺ MAIT-Zellen im Blut schien zudem ab einem Schwellenwert von ca. 200 pg/ml IL-18 im Serum besonders prägnant zu werden (Abbildung 15B, p = 0,06 inkl. Ausreißer, p = 0,02 nach Ausschluss des Ausreißers). Diese Befunde deuten darauf hin, dass die verminderte Frequenz der CD8⁺ MAIT-Zellen im peripheren Blut der MS-Patienten im Vergleich zu gesunden Individuen mit einem erhöhten IL-18 Serumspiegel zusammenhängen könnte, welcher zu einer vermehrten Aktivierung der CD8⁺ MAIT-Zellen und in der Folge eventuell induziertem Zelltod beitragen könnte. Eine vergleichende simultane Analyse des IL-18 Serumspiegels und der MAIT-Zellfrequenz bei gesunden Individuen steht noch aus.



Abbildung 15: Korrelation der Frequenz CD8⁺ MAIT-Zellen mit dem IL-18 Serumspiegel bei MS-Patienten. (A) Kryokonservierte mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMCs) von Multiple Sklerose Patienten (MS, n =19, vgl. Tabelle 2) wurden aufgetaut und durchflusszytometrisch auf die Frequenz der MAIT-Zellen (Va7.2⁺CD161^{hoch}) innerhalb der CD8⁺ T-Zellen (CD3⁺TCRgd⁻CD4⁻CD8⁺) hin untersucht. Die Konzentration von IL-18 in Serum Proben, die jeweils zum entsprechenden Zeitpunkt abgenommenen und ebenfalls kryokonserviert wurden, wurde mittels ELISA bestimmt. Korrelation: Spearman's rank. (B) Darstellung der Daten in A unterteilt nach Individuen mit einem IL-18 Serumspiegel ober- und unterhalb von 200 pg/ml. Statistik: Mann-Whitney-U Test. p = 0,06 inkl. Ausreißer, p = 0,02 nach Ausschluss des Ausreißers. (C) Die Expression des IL-18R α wurde anhand der medianen Fluoreszenzintensität auf den CD8⁺ MAIT-Zellen (CD3⁺TCRgd⁻CD4⁻CD8⁺Va7.2⁺CD161^{hoch}) der in A und B analysierten MS-Patienten und einer entsprechenden Kohorte gesunder Individuen (engl. *healthy individuals*, HI, n = 16, vgl. Tabelle 2) bestimmt.

Um zu untersuchen, ob eventuell auch die Reaktivität der CD8⁺ MAIT-Zellen auf IL-18 in MS-Patienten verändert sein könnte, wurde die Expression des IL-18Rα auf CD8⁺ MAIT-Zellen von MS-Patienten im Vergleich zu einer entsprechend des Alters und Geschlechts passenden Kohorte gesunder Individuen quantifiziert. Diese war jedoch unverändert (Abbildung 15C).

3.4. Erhöhte IL-7Rα Expression und IL-17 Produktion von CD8⁺ MAIT-Zellen bei

MS-Patienten

Eine vermehrte Fluktuation durch Aktivierungs-, Umverteilungs- und Zelltodvorgänge innerhalb der MAIT-Zell-Population, die möglicherweise mit erhöhten IL-18 Serumspiegeln oder mit einer generell erhöhten Aktivierung des angeborenen Immunsystems bei MS-Patienten einhergeht, könnte homöostatische Anpassungsprozesse der MAIT-Zellen induzieren. Es ist bekannt, dass IL-7 eine wichtige Rolle bei der Homöostase von CD8⁺ T-Zellen spielt¹⁶⁵. Außerdem hatte die Charakterisierung der Expression von Oberflächenmarkern auf CD8 $^{+}$ MAIT-Zellen bereits gezeigt, dass der IL-7Rlpha auf diesen besonders hoch exprimiert war (vgl. Kapitel 3.1.3. und Abbildung 16A), was auf eine besondere Bedeutung dieses Zytokins für die Homöostase dieser T-Zell-Population hindeutet. Daher wurde zunächst die Expression des IL-7Rα auf CD8⁺ MAIT-Zellen von MS-Patienten und gesunden Individuen verglichen. Es stellte sich heraus, dass diese bei den MS-Patienten signifikant erhöht war (p = 0,006; Abbildung 16B). Da sich im Gegensatz zu den CD8⁺ MAIT-Zellen innerhalb der anderen CD8⁺ T-Zellen ein gewisser Prozentsatz IL-7R α negativer Zellen befand (Abbildung 16A), wurde die Expression in diesen Populationen zunächst anhand der Frequenz IL-7Ra positiver Zellen und dann anhand der medianen Fluoreszenzintensität des IL-7Ra-Antikörpers auf den positiven Zellen quantifiziert. Es zeigte sich im Gegensatz dazu keine signifikant veränderte IL-7Ra Expression auf anderen CD8⁺ naiven oder Gedächtnis-T-Zellen (Abbildung 16C-F). Die festgestellte spezifische Hochregulation des IL-7R α auf CD8⁺ MAIT-Zellen von MS-Patienten könnte eine Reaktion auf eine erhöhte homöostatische Fluktuation widerspiegeln und gleichzeitig funktionelle Veränderungen der MAIT-Zellen in MS-Patienten zur Folge haben.

In einer kürzlich publizierten Studie wurde gezeigt, dass die Reaktivität der MAIT-Zellen auf TZR Stimulation durch Inkubation mit IL-7 gesteigert werden kann und dass dies zu einer vermehrten Produktion von IL-17 durch MAIT-Zellen führt¹⁶⁶. Es lag also nahe, im nächsten Schritt zu überprüfen, ob die erhöhte Expression des Rezeptors bei MS-Patienten eine erhöhte Sensitivität der Zellen auf IL-7 zur Folge hat, welche sich in einer erhöhten Produktion von IL-17 nach IL-7 und anti-CD3 Stimulation widerspiegeln würde. Dazu wurden PBMCs einer weiteren kleinen Kohorte MS-Patienten und gesunder Individuen entsprechend stimuliert und anschließend intrazellulär mit Antikörpern gegen IL-17 und IFN- γ gefärbt. Die Frequenz IL-17 produzierender Zellen war dabei innerhalb der CD8⁺ MAIT-Zellen von MS-Patienten signifikant erhöht (p = 0,002), während keine signifikante Veränderung der Produktion von IFN- γ nachgewiesen werden konnte (Abbildung 17). Eine vermutlich homöostatische Reaktion auf eine erhöhte Fluktuation innerhalb der MAIT-Zellen auf Zellen auf ZE Stimulation.



Abbildung 16: IL-7R α Expression auf CD8⁺ T-Zellen im peripheren Blut von MS-Patienten und gesunden Individuen. Kryokonservierte mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMCs) von Multiple Sklerose Patienten (MS, *n* = 19, vgl. Tabelle 2) und gesunden Individuen (engl. *healthy individuals*, HI, *n* = 16, vgl. Tabelle 2) wurden simultan aufgetaut und durchflusszytometrisch analysiert. (A) Repräsentative Darstellung der Expression des IL-7R α auf CD8⁺ T-Zellen (CD3⁺TCRgd⁻CD4⁻CD8⁺) unterteilt in MAIT-Zellen (Va7.2⁺CD161^{hoch}), nicht-MAIT Gedächtnis-T-Zellen (CD45RA⁻ nicht-Va7.2⁺CD161^{hoch}) und naive T-Zellen (CD45RA⁺ nicht-Va7.2⁺CD161^{hoch}). (B) Quantifizierung der Expression des IL-7R α auf CD8⁺ MAIT-Zellen anhand der medianen Fluoreszenzintensität. Statistik: Mann-Whitney-U Test. ***p* < 0,01 (C) Frequenz der IL-7R α ⁺ Zellen innerhalb der CD8⁺ nicht-MAIT Gedächtnis-T-Zellen. (D) Quantifizierung der Expression des IL-7R α auf IL-7R α ⁺ CD8⁺ nicht-MAIT Gedächtnis-T-Zellen. (F) Quantifizierung der Expression des IL-7R α auf IL-7R α ⁺ naiven CD8⁺ T-Zellen anhand der medianen Fluoreszenzintensität. (E) Frequenz der IL-7R α ⁺ naiven CD8⁺ T-Zellen anhand der medianen Fluoreszenzintensität. (E) Frequenz der IL-7R α ⁺ naiven CD8⁺ T-Zellen anhand der medianen Fluoreszenzintensität. (E) Frequenz der IL-7R α ⁺ zellen innerhalb der naiven CD8⁺ T-Zellen. (F) Quantifizierung der Expression des IL-7R α auf IL-7R α ⁺ naiven CD8⁺ T-Zellen anhand der medianen Fluoreszenzintensität.



Abbildung 17: IL-17 Produktion durch CD8⁺ MAIT-Zellen von MS-Patienten und gesunden Individuen nach Stimulation mit IL-7 und anti-CD3. Kryokonservierte mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMCs) von Multiple Sklerose Patienten (MS, n = 5, vgl. Tabelle 3) und gesunden Individuen (engl. *healthy individuals*, HI, n = 6, vgl. Tabelle 3) wurden simultan aufgetaut, für zwei Tage mit 10 ng/ml IL-7 und im Anschluss über Nacht mit anti-CD3 in Anwesenheit von Brefeldin A stimuliert. (A) Repräsentative durchfulsszytometrische Analyse der IL-17 und IFN- γ Produktion durch CD8⁺ MAIT-Zellen (CD8⁺Va7⁻2⁺CD161^{hoch}) wie sie im Anschluss an die Stimulation mittels intrazellulärer Zytokinfärbung bestimmt wurde. Die Zahlen in den Quadranten entsprechen jeweils der prozentualen Frequenz innerhalb der CD8⁺ MAIT-Zellen. (B) Frequenz der IL-17⁺ Zellen innerhalb der CD8⁺ MAIT-Zellen quantifiziert wie in A dargestellt. Statistik: t-Test. **p < 0,01 (C) Frequenz der IFN- γ^+ Zellen innerhalb der CD8⁺ MAIT-Zellen quantifiziert wie in A dargestellt.

4. **DISKUSSION**

In dieser Arbeit konnte unter anderem bestätigt werden, dass der Großteil der CD161 hoch exprimierenden und somit auch der IL-17 produzierenden CD8⁺ T-Zellen im peripheren Blut des Menschen den semi-invarianten (Vα7.2⁺), bakterienspezifischen MAIT-Zellen angehört. Fast alle CD161^{hoch}CD8⁺ T-Zellen exprimierten die Vα7.2 TZR-Kette (ca. 98%) und nach PMA/lonomycin Stimulation fanden sich nahezu ausschließlich in der CD8⁺ MAIT-Zell-Population IL-17⁺ Zellen. Außerdem konnten keine CD161^{hoch} oder IL-17 produzierenden CD8⁺ T-Zellen mit Spezifität gegen zwei immundominante Epitope der weit verbreiteten Zytomegalie- und Influenzaviren identifiziert werden. Dennoch kann weiterhin nicht ausgeschlossen werden, dass sich unter den CD161^{hoch}CD8⁺ T-Zellen ein geringer Prozentsatz von CD8⁺ T-Zellen mit anderer Spezifität und mit der Fähigkeit IL-17 zu produzieren befindet. Diese wurden von anderen Gruppen als Gedächtnis-Stammzellen oder Effektor-Gedächtnis-Zellen beschrieben^{114,124,130}. Aufgrund ihrer auch in den zitierten Studien extrem geringen Frequenz und der oben beschriebenen Befunde dieser Arbeit, wird im Folgenden der Schwerpunkt der Diskussion auf die CD8⁺ MAIT-Zellen gelegt.

Durch die Herunterregulation des CD8β-Moleküls wird vermutlich die Funktion von CD8⁺ MAIT-Zellen moduliert.

Die ausschließliche Expression von CD8αα-Homodimeren erwies sich nicht als spezifischer oder exklusiver Marker für IL-17 produzierende CD8⁺ T-Zellen. Dennoch war die Herunterregulation des CD8β-Moleküls nicht nur mit der Expression von CD161, sondern auch mit der Fähigkeit IL-17 zu produzieren sowie mit einem Th17-ähnlichen Genexpressionsprofil assoziiert. Auch bei der späteren Analyse der CD8⁺ MAIT-Zellen bestätigte sich diese Assoziation, da fast ein Drittel der CD8⁺ MAIT-Zellen CD8β negativ waren. Jedoch exprimierte ein geringer Prozentsatz der anderen CD8⁺ T-Zellen ebenfalls ausschließlich CD8αα-Homodimere (ca. 3%). Zukünftig wäre es von Interesse, zu untersuchen, ob in dieser Population eventuell IL-17 produzierende CD8⁺ T-Zellen mit anderer möglicherweise autoreaktiver Spezifität angereichert sind.

Die verminderte Expression von CD8β bzw. die vermehrte Expression von CD8αα-Homodimeren könnte funktionell mit der beobachteten verminderten TZR-Reaktivität der CD8⁺ MAIT-Zellen zusammenhängen. Bereits bei der Charakterisierung der CD8αα T-Zellen und auch später bei der Analyse der MAIT-Zellen war die Proliferation nach klassischer anti-CD3 und anti-CD28 Stimulation gering. Des Weiteren wurde auch in anderen Studien beschrieben, dass die CD161^{hoch}CD8⁺ bzw. CD8⁺MAIT-Zellen eine geringe proliferative Reaktivität auf klassische TZR-Stimulation aufweisen^{122,124,126,130}. In einer Studie an intestinalen intraepithelialen Lymphozyten (IELs) der Maus, die zum Großteil ausschließlich CD8αα-Homodimere exprimieren, wurde gezeigt, dass durch die Interaktion des CD8αα mit dem murinen nicht-klassischen MHC-Klasse I Molekül *thymus* leukemia antigen (TL) die Aktivierung der Zellen über den TZR moduliert wird. IELs produzierten nach TZR-Stimulation unter gleichzeitiger Interaktion des CD8αα mit TL zwar vermehrt Zytokine, proliferieren jedoch nicht und wirken nicht zytotoxisch¹⁶⁷. Dies bedeutet, dass CD8αα-Homodimere nicht wie CD8αβ-Heterodimere klassisch ko-stimulatorisch bei einer Aktivierung des TZR wirken. Es wurde daher postuliert, dass es sich bei der Herunterregulation des CD8 β um einen Regulationsmechanismus handelt, um das Darmepithel, in dem die IELs vornehmlich lokalisiert sind, vor einer Schädigung durch Proliferation und Zytotoxizität der IELs zu schützen. Eine permanente Aktivierung der IELs durch bakterielle Antigene im Darm könnte ansonsten vermutlich zu massiver Immunopathologie führen^{167,168}. Zwar exprimiert auch ein Teil der humanen IELs ausschließlich CD8 $\alpha\alpha$ -Homodimere¹⁶⁹, allerdings wurde noch kein humanes Homolog zum murinen TL identifiziert. Es ist also noch unklar, ob die Expression von CD8 $\alpha\alpha$ -Homodimeren bzw. die Herunterregulation des CD8β auch auf humanen CD8⁺ T-Zellen, wie den MAIT-Zellen, die gleiche modulierende Funktion wie bei den murinen IELs hat. Dies würde bedeuten, dass die proliferative TZR-Reaktivität der CD8 $lphaeta^{ ext{int}}$ MAIT Zellen höher sein müsste als die der CD8αα MAIT-Zellen. In ersten Versuchen zur differenziellen Proliferation der CD8 $\alpha\alpha$ und CD8 $\alpha\beta^{int}$ MAIT-Zellen war diese jedoch nicht unterschiedlich. Die Daten dieser Arbeit deuten allerdings insgesamt daraufhin, dass CD8⁺ MAIT-Zellen ebenfalls eher mit Zytokinsekretion als mit Proliferation auf Stimulation reagieren. Auch in Anwesenheit von feeder Zellen war die Proliferation von MAIT-Zellen nach anti-CD3 Stimulation gering. Nach Aktivierung durch IL-12 und IL-18 sezernierten CD8⁺ MAIT-Zellen zwar IFN- γ , jedoch verminderte sich ihre Frequenz innerhalb der Kultur, obwohl andere T-Zellen nicht aktiviert worden waren und somit auch wahrscheinlich nicht durch ihre Proliferation indirekt eine Verminderung der MAIT-Zellfrequenz bewirkt haben. Eine direkte Analyse der Proliferation sowie des aktivierungsinduzierten Zelltods der MAIT-Zellen nach IL-12 und IL-18 Stimulation steht noch aus.

Die zitierte Studie zur Funktion der IELs, sowie weitere Studien zur Expression von CD8αα-Homodimeren legen nahe, dass die (ausschließliche) Expression von CD8αα-Homodimeren nicht primär als Marker für die Diskriminierung bestimmter Subpopulationen im Rahmen der T-Zell-Differenzierung geeignet ist, sondern eher als funktioneller Marker gesehen werden muss, den verschiedene T-Zellen dynamisch regulieren¹⁶⁸. So wurde beispielsweise gezeigt, dass eine transiente Expression von CD8αα-Homodimeren jene Effektor-T-Zellen kennzeichnet, die sich zu Gedächtnis-T-Zellen entwickeln³⁰. Des Weiteren wurde die CD8αα-Expression beispielsweise auch auf regulatorischen CD8⁺ T-Zellen beschrieben¹⁷⁰. Außerdem wird die Expression von CD8β auf MAIT-Zellen nach Stimulation mit IL-7 hochreguliert¹⁶⁶.

CD8⁺ MAIT-Zellen stellen eine *"innate-like"* T-Zell-Population mit bisher wenig charakterisierter Funktion und Regulation dar.

Über die CD8αα-Expression hinaus, könnten weitere Mechanismen zur verminderten TZR-Reaktivität der CD8⁺ MAIT-Zellen bzw. der CD161^{hoch}CD8⁺ T-Zellen beitragen. In einer Studie, in der das Genexpressionsprofil der CD161^{hoch}CD8⁺ T-Zellen untersucht wurde, zeigte sich, dass die Expression vieler an der Signaltransduktion des TZR beteiligter Gene in diesen Zellen herunterreguliert ist¹⁷¹. Die verminderte TZR-Reaktivität konnte zum Teil durch Zugabe klassischer Zytokine des angeborenen Immunsystems, wie zum Beispiel IL-1β und IL-12, aufgehoben werden¹⁷¹. Dies wurde in einer anderen Studie für die Wirkung von IL-12 und IL-18 auf CD161^{hoch}CD8⁺ T-Zellen bestätigt¹³⁰, was die Besonderheit dieser T-Zell-Population bezüglich ihrer funktionellen Positionierung zwischen angeborener und adaptiver Immunität unterstreicht.

Neben den invarianten CD1d restringierten iNKT-Zellen bilden die MAIT-Zellen also eine zweite, in der Fachliteratur als "innate-like" bezeichnete T-Zell-Population. Sie erkennen mit Hilfe ihres semi-invarianten TZR keine Peptide, sondern kleine aromatische Metabolite des bakteriellen Vitaminstoffwechsels, sind im Laufe der Evolution der Säugetiere hoch konserviert und erfüllen ohne vorherige klonale Expansion ihre Effektorfunktionen¹³⁷. Die Ergebnisse dieser Arbeit haben gezeigt, dass ex vivo nach Stimulation durch IL-12 und IL-18, zwei Zytokinen, die durch Zellen des angeborenen Immunsystems sezerniert werden, ca. 80% der CD8⁺ MAIT-Zellen aktiviert werden. Im Gegensatz dazu zeigten andere CD8⁺ T-Zellen, sowohl naive als auch Gedächtnis-T-Zellen, keine signifikante Hochregulation des Aktivierungsmarkers CD69 unter den gleichen Bedingungen. Des Weiteren waren bei der Genexpressionsanalyse der CD8aa T-Zellen, innerhalb derer die MAIT-Zellen klar überrepräsentiert sind, neben CD161 zahlreiche weitere NK-Zell-Rezeptoren unter den stark hochregulierten Genen. So exprimiert auch ein Teil der MAIT-Zellen CD56, einen Oberflächenmarker, der häufig als Pan NK(T)-Zell-Marker verwendet wird. Es zeigt sich also, dass in der Immunologie nicht nur die dichotome Zuordnung von Immunzellen zum angeborenen oder adaptiven Immunsystem, sondern auch die Abgrenzung von bestimmten Zelltypen anhand der Expression definierter Oberflächenmarker häufig neu überdacht werden muss. Die erhöhte Expression von NK-Zell-Rezeptoren auf den CD8⁺ MAIT-Zellen spricht genauso wie deren Aktivierung durch IL-12 und IL-18 für eine Regulation dieser Zellen durch Faktoren des angeborenen Immunsystems.

Bezüglich ihrer Effektorfunktionen scheinen CD8⁺ MAIT-Zellen eine zentrale Rolle bei der Abwehr bakterieller Infektionen zu spielen. So reagieren sie auf bakteriell infizierte APZ *in vitro*^{127,128,142}. Außerdem scheinen sie im Rahmen einer Tuberkuloseinfektion vermehrt in das infizierte Lungengewebe einzuwandern und dadurch im peripheren Blut in ihrer Frequenz vermindert zu sein^{127,128}. Darüber hinaus wurde in mehreren Studien an *Mr1^{-/-}* Mäusen, bei denen die MAIT-Zellentwicklung durch das fehlende Selektionselement gestört ist, gezeigt, dass MAIT-Zellen *in vivo* zur Abwehr gegen verschiedene bakterielle Infektionen beitragen^{128,142,145}. Es ist jedoch noch weitestgehend unbekannt, wie genau die anti-bakterielle Funktion der MAIT-Zellen vermittelt wird. Die Produktion der pro-inflammatorischen Zytokine IL-17 und IFN-y durch humane MAIT-Zellen konnte in dieser Arbeit zunächst mittels intrazellulärer Zytokinfärbung nach PMA/lonomycin Stimulation diesen Oberflächenrezeptor bestätigt werden. Unter unabhängigen Stimulationsbedingungen produzierten nahezu alle CD8⁺ MAIT-Zellen IFN-γ und ca. 13% gleichzeitig IL-17. Nach klassischer TZR-Stimulation konnte in dieser wie auch in anderen Studien, keine IFN-γ oder IL-17 Produktion nachgewiesen werden, was dafür spricht, dass für diese proinflammatorischen Effektorfunktionen zusätzliche Signale notwendig sind. So produzierten nach Aktivierung von PBMCs mit IL-12 und IL-18 mehr als die Hälfte der CD8⁺ MAIT-Zellen IFN-y, allerdings war unter diesen Bedingungen keine IL-17 Produktion zu detektieren. Auch nach Inkubation von PBMCs mit anderen Zytokinen, die an der Differenzierung von Th17 Zellen beteiligt sind, wie beispielsweise IL-23 und IL-1 β , produzierten MAIT-Zellen kein IL-17 (Daten nicht gezeigt). IL-17 Produktion durch MAIT-Zellen konnte durch TZR-Stimulation nur nach Vorinkubation von PBMCs mit IL-7 induziert werden. Allerdings war auch unter diesen Bedingungen die Frequenz der IL-17⁺ CD8⁺ MAIT-Zellen mit 2–5% noch immer deutlich niedriger als nach PMA/Ionomycin Stimulation. IL-7 scheint in MAIT-Zellen eine Hochregulation verschiedener Moleküle, die an der Signaltransduktion des TZR beteiligt sind, zu bewirken¹⁶⁶. Die Aktivierung von MAIT-Zellen scheint also auf verschiedenen Ebenen so reguliert zu sein, dass sie ihre vermutlich pro-inflammatorischen und antibakteriellen Effektorfunktionen nur unter bestimmten Bedingungen ausüben.

Studien zur Frequenz und Funktion der CD8⁺ MAIT-Zellen in der Multiplen Sklerose und anderen Autoimmunerkrankungen sind kontrovers.

In dieser Arbeit konnte eine signifikante Verminderung der CD161^{hoch}CD8⁺ T-Zellen im Blut von MS-Patienten nachgewiesen werden, die mit der Konzentration von IL-18 im Serum korrelierte. Drei im Jahre 2011 veröffentlichte Studien zur Frequenz und Funktion von CD161^{hoch}CD8⁺ bzw. IL-17 produzierenden CD8⁺ bzw. MAIT-Zellen in der MS kommen zu unterschiedlichen Ergebnissen und Schlussfolgerungen. So wurde zum einen gezeigt, dass die Frequenz der CD161^{hoch}CD8⁺ T-Zellen im Blut von MS-Patienten erhöht war, woraus auch aufgrund ihres pro-inflammatorischen Effektor-Gedächtnis-Zell-Phänotyps geschlossen wurde, dass sie zur Pathogenese beitragen¹⁴¹. Genauso war in einer anderen Studie die Frequenz der IL-17 produzierenden CD8⁺ T-Zellen nach PMA/Ionomycin Stimulation von PBMCs bei MS-Patienten erhöht im Vergleich zu gesunden Individuen¹⁷². Hingegen war in einer dritten Studie die Frequenz der MAIT-Zellen (CD161^{hoch}Vα7.2⁺) signifikant vermindert bei MS-Patienten in Remission und nochmals deutlich vermindert bei MS-Patienten im Schub. In dieser Studie wurde zudem festgestellt, dass PBMCs nach Depletion der MAIT-Zellen vermehrt IFN-y nach PHA Stimulation produzieren. Es wurde dementsprechend geschlussfolgert, dass MAIT-Zellen in MS eine regulatorische Funktion haben¹⁷³. Gleichermaßen scheinen MAIT-Zellen auch in der EAE eine regulatorische Funktion zu haben. Durch Transfer von MAIT-Zellen konnte der Krankheitsverlauf in Wildtyp Mäusen abgemildert werden, während bei $Mr1^{-/-}$ Mäusen die EAE deutlich schwerer im Vergleich zu Wildtypen verlief¹⁷⁴. In Mausmodellen zur rheumatoiden Arthritis wiederum sind *Mr1^{-/-}* Mäuse geschützt¹⁴³. Die Frequenz der CD161⁺CD8⁺ T-Zellen ist hingegen bei Patienten mit verschiedenen rheumatischen Erkrankungen vermindert¹⁷⁵. Studien an Tiermodellen menschlicher Autoimmunerkrankungen und Frequenz- und Funktionsanalysen humaner MAIT-Zellen bzw. CD161 exprimierender CD8 $^+$ T-Zellen liefern demnach sowohl Hinweise auf eine regulatorische als auch auf eine pro-inflammatorische Funktion der MAIT-Zellen. Die Effektorfunktionen der MAIT-Zellen könnten daher unter verschiedenen physiologischen oder pathologischen Bedingungen unterschiedlich sein. Zudem wurde postuliert, dass unterschiedliche Subpopulationen von MAIT-Zellen mit differenziellen Effektorfunktionen existieren könnten^{137,176}. Die Ergebnisse dieser Arbeit liefern hierauf jedoch keine Hinweise. Das Expressionsmuster der hier analysierten Oberflächenmarker deutete vielmehr auf eine zumindest phänotypisch homogene Population hin.

Generell könnten Veränderungen in der Frequenz der MAIT-Zellen bei Patienten mit Autoimmunerkrankungen auch in einem indirekten und nicht primär kausalen Zusammenhang mit der Erkrankung stehen. Vermehrt oder vermindert auftretende bakterielle Infektionen oder Unterschiede in der Zusammensetzung der kommensalen Flora könnten beispielsweise im Rahmen einer Autoimmunerkrankung auftreten und sekundär auch zu einer Veränderung der MAIT-Zell-Frequenz im Blut der Patienten führen, ohne dass dies bedeuten würde, dass die MAIT-Zellen an der Pathogenese der Erkrankung direkt beteiligt sind.

Die signifikante Verminderung der CD161^{hoch}CD8⁺ T-Zellen im Blut von MS-Patienten, die in dieser Arbeit festgestellt wurde, steht im klaren Gegensatz zu den Ergebnissen der oben zitierten Studie zur Frequenz der CD161^{hoch}CD8⁺ T-Zellen¹⁴¹. Über die Ursache dieser Diskrepanz lässt sich nur spekulieren. So könnte dies mit grundlegenden Unterschieden zwischen den untersuchten Kohorten, wie beispielsweise in der Altersstruktur, zusammenhängen. In der genannten Studie waren die gesunden Individuen im Durchschnitt zehn Jahre älter als die MS-Patienten. In der in dieser Arbeit untersuchten Kohorte zeigte sich eine inverse Korrelation der Frequenz der CD8⁺ MAIT-Zellen mit dem Alter in gesunden Individuen, aber nicht bei MS-Patienten. Ähnliche Effekte könnten also im Falle der zitierten Studie indirekt zu einer höheren Frequenz der Zellen bei MS-Patienten beigetragen haben. Außerdem wurden von Annibali *et al.* ausschließlich Patienten untersucht, die sich noch in der schubförmig remittierenden Phase der Erkrankung befanden, während sich in dieser Arbeit die stärksten Effekte in der sekundär-progredienten Gruppe zeigten.

Eine direkte Untersuchung der Frequenz der MAIT-Zellen durch eine andere Gruppe ergab eine signifikante Verminderung bei MS-Patienten im Einklang mit den Daten dieser Arbeit¹⁷³. Eine verstärkte Verminderung der MAIT-Zellen bei Patienten im Schub im Vergleich mit Patienten in Remission, wie sie von Miyazaki *et al.* gezeigt wurde, konnte in dieser Arbeit allerdings nicht bestätigt werden. Dies könnte mit einer zu geringen Anzahl an Patienten, die im Schub analysiert wurden, zusammenhängen.

Die Reduktion der CD8⁺ MAIT-Zellen im Blut von MS-Patienten steht vermutlich im Zusammenhang mit einer vermehrten Aktivierung durch IL-18.

Die in dieser Arbeit gefundene verminderte Frequenz der CD8⁺ MAIT-Zellen im Blut von MS-Patienten kann wie bereits angedeutet als Indiz für eine regulatorische Funktion der Zellen ausgelegt werden. Durch eine primär zur Erkrankung auftretende Reduktion in der Frequenz der Zellpopulation würde also auch deren regulatorische Wirkung vermindert, was zur autoimmunen Pathogenese der MS beitragen könnte. Während ihrer Entwicklung in der frühen Kindheit expandieren die MAIT-Zellen, nachdem sie den Thymus verlassen haben, in der Peripherie in Abhängigkeit von der Besiedlung des Darms mit kommensalen Mikroorganismen^{139,177}. Es könnte also sein, dass zum Beispiel durch Veränderungen in der kommensalen Flora, bereits die frühe Entwicklung der MAIT-Zellen in MS-Patienten gestört ist.

Jedoch kann eine verminderte Frequenz der CD8⁺ MAIT-Zellen im peripheren Blut auch vor dem Hintergrund einer pro-inflammatorischen Funktion der Zellen in der MS interpretiert werden. Beispielsweise könnte sie durch ein vermehrtes Einwandern der Zellen in entzündliche Gewebe verursacht werden, ein Effekt, der bereits bei bakteriellen Infektionen beschrieben wurde^{127,128}. Zum anderen wurde bei HIV infizierten Personen eine starke Verminderung der MAIT-Zellfrequenz im peripheren Blut mit einer permanenten Aktivierung der Zellen durch mikrobielle Antigene in Folge der bei HIV-Infektionen auftretenden Beschädigung der Darmwand in Zusammenhang gebracht^{157,178}. In den zitierten Studien wurde gezeigt, dass es durch mikrobielle Aktivierung einerseits zur funktionellen Erschöpfung und andererseits zu aktivierungsinduziertem Zelltod der MAIT-Zellen kommt^{157,178}.

Diese Arbeit liefert Hinweise darauf, dass es bei MS-Patienten ebenfalls durch eine vermehrte Aktivierung der CD8⁺ MAIT-Zellen zu deren Reduktion im peripheren Blut kommen könnte. Die Frequenz der MAIT-Zellen korrelierte invers mit dem IL-18 Serumspiegel bei MS-Patienten, und CD8⁺ MAIT-Zellen konnten *in vitro* durch IL-18 aktiviert werden. Es ist bekannt, dass im Vergleich zu gesunden Individuen die Konzentration von IL-18 im Serum von MS-Patienten erhöht ist^{158,159}. Zudem führte die Aktivierung der CD8⁺ MAIT-Zellen durch IL-18 *in vitro* zu einer Verminderung ihrer Frequenz in der Kultur, was impliziert, dass CD8⁺ MAIT-Zellen auch in Folge
dieser Art der Aktivierung aktivierungsinduzierten Zelltod erleiden könnten. Ein direkter Nachweis der Apoptose der MAIT-Zellen nach IL-18 Aktivierung steht noch aus. Ein erhöhter Serumspiegel von IL-18 bei MS-Patienten, vermutlich ab einem Schwellenwert von ca. 200 pg/ml, könnte also eine permanent verstärkte Stimulation der MAIT-Zellen und folglich deren aktivierungsinduzierten Zelltod und somit Frequenzverminderung im Blut bewirken. Die von Miyazaki *et al.* publizierte verstärkte Verminderung der MAIT-Zell Frequenz bei Patienten im Schub¹⁷³ könnte ebenfalls im Zusammenhang mit dem IL-18-Serumspiegel stehen. Dieser ist bei MS-Patienten im Schub nochmals signifikant erhöht gegenüber MS-Patienten in Remission¹⁵⁹. Auch die extrem niedrige Frequenz der MAIT-Zellen im Liquor, die in dieser Arbeit gezeigt wurde, könnte durch erhöhte IL-18 Konzentrationen in diesem Kompartiment verursacht sein¹⁵⁸.

Der Zusammenhang zwischen der Reduktion der CD8⁺ MAIT-Zellen im Blut und dem IL-18 Serumspiegel könnte auch indirekt sein. Zum einen könnte eine erhöhte Konzentration von IL-18 im Serum erhöhte lokale Konzentrationen im Gewebe widerspiegeln. Die vermehrte Aktivierung und der mögliche Zelltod bzw. die funktionelle Erschöpfung der MAIT-Zellen könnten also auch im Gewebe stattfinden, was ein homöostatisches Nachwandern weiterer MAIT-Zellen in die betroffenen Gewebe und schließlich eine Verminderung ihrer Frequenz im Blut zur Folge haben könnte. Ein solches Modell könnte ebenfalls erklären, warum eine signifikant vermehrte Aktivierung der CD8⁺ MAIT-Zellen im Blut der MS-Patienten anhand der analysierten Aktivierungsmarker nicht nachgewiesen werden konnte. Zum anderen könnte ein erhöhter IL-18 Serumspiegel bei MS-Patienten auch ein Indikator für eine allgemein verstärkte Aktivierung des angeborenen Immunsystems sein, was durch andere Faktoren zur vermehrten Aktivierung und möglicherweise zum aktivierungsinduzierten Zelltod der CD8⁺ MAIT-Zellen beitragen könnte. Eine solche erhöhte Aktivität des angeborenen Immunsystems könnte wiederum durch möglicherweise gehäuft auftretende bakterielle Infektionen und nicht primär durch die autoimmunen entzündlichen Prozesse der MS-Erkrankung hervorgerufen werden.

CD8⁺ MAIT-Zellen sind in der Lage in das ZNS von MS-Patienten einzuwandern.

Obwohl die Frequenz der CD8⁺ MAIT-Zellen im Liquor von MS-Patienten und Patienten mit anderen neurologischen Erkrankungen sehr gering war, ist es dennoch wahrscheinlich, dass sie in der Lage sind ohne Anreicherung im Liquor in das ZNS einzuwandern. Zum einen wurde der Klonotyp der invarianten Vα7.2 Kette bereits mittels PCR-Methoden vermehrt in MS-Läsionen nachgewiesen, während andere invariante T-Zellen nicht vermehrt vorkamen, was für eine zielgerichtete Infiltration der MAIT-Zellen spricht^{179,180}. Zum anderen erfüllen MAIT-Zellen, wie in dieser Arbeit anhand der Expressionsanalyse verschiedener Oberflächenmarker gezeigt, entscheidende phänotypische Charakteristika für die ZNS-Infiltration. So waren sie beispielsweise den Effektor-Gedächtnis-Zellen (CD45RA⁻CCR7⁻CD62L⁻) zuzuordnen und exprimierten das Integrin α4, was die Migration von CD8⁺ T-

Zellen über die BHS vermittelt¹⁸¹. Außerdem war die Expression von CCR5 und CCR6, zweier an der ZNS-Infiltration von T-Zellen beteiligter Chemokinrezeptoren^{54,182}, vergleichsweise hoch auf CD8⁺ MAIT-Zellen.

Die Befunde, dass IL-17 produzierende CD8⁺ T-Zellen in aktiven MS-Läsionen angereichert waren⁹⁷ und dass im peripheren Blut fast ausschließlich MAIT-Zellen innerhalb des CD8⁺ T-Zell-Kompartiments in der Lage waren IL-17 zu produzieren, legen nahe, dass es sich auch bei den ZNS-infiltrierenden IL-17⁺CD8⁺ T-Zellen um MAIT-Zellen handelt. Annibali *et al.* dokumentierten in ihrer Studie zu CD161^{hoch}CD8⁺ T-Zellen in MS die Infiltration von CD161⁺CD8⁺CD3⁺ T-Zellen in MS-Läsionen mittels Immunhistochemie¹⁴¹. Allerdings beinhaltete diese Analyse keine Färbung des invarianten TZR, so dass es sich auch um andere CD161 exprimierende CD8⁺ T-Zellen gehandelt haben könnte. Durch unpublizierte immunhistochemische Untersuchungen eines Kooperationspartners unserer Arbeitsgruppe konnte jedoch gezeigt werden, dass CD8⁺CD161⁺Va7.2⁺ T-Zellen in aktiven MS-Läsionen in vergleichbarer Frequenz wie im Blut vorgefunden werden können. Diese liegt allerdings deutlich unterhalb der Frequenz der IL-17⁺CD8⁺ T-Zellen von ca. 80%, die von Tzartos *et al.* für aktive MS-Läsionen publiziert wurde⁹⁷. Dies könnte bedeuten, dass innerhalb des inflammatorischen Milleus im ZNS auch andere CD8⁺ T-Zellen zur IL-17 Produktion angeregt werden können, obwohl diese im peripheren Blut nicht oder kaum nachweisbar sind. Die Identität und Spezifität dieser wahrscheinlich ebenfalls an der Pathogenese der MS beteiligten CD8⁺ T-Zellen ist noch unbekannt.

Innerhalb der MS-Läsionen könnten die CD8⁺ MAIT-Zellen durch IL-12 und IL-18 reaktiviert werden. Beide Zytokine wurden bereits in MS-Läsionen nachgewiesen^{183,184}. Außerdem wurde die Anwesenheit bakterieller Antigene im ZNS von MS-Patienten dokumentiert¹⁸⁵. In Folge der Aktivierung sezernieren die MAIT-Zellen im ZNS wahrscheinlich IL-17 und IFN-γ und tragen so zum pro-inflammatorischen Milieu bei. So waren fast alle CD161⁺CD8⁺CD3⁺ T-Zellen in MS-Läsionen in der Studie von Annibali *et al.* IFN-γ positiv¹⁴¹. Die erhöhte Tendenz der MAIT-Zellen zum aktivierungsinduzierten Zelltod¹⁵⁷ könnte daher eine regulatorische, das Gewebe vor inflammatorischem Schaden schützende Funktion haben und dazu beitragen, dass die vorgefundene Frequenz der MAIT-Zellen trotz der höchstwahrscheinlich zielgerichteten Infiltration vergleichbar zu der im Blut bleibt.

CD8⁺ MAIT-Zellen von MS-Patienten zeigen eine vermutlich homöostatische Hochregulation des IL-7-Rezeptors und in der Folge eine erhöhte Fähigkeit IL-17 zu produzieren.

Möglicherweise induziert durch eine erhöhte Fluktuation infolge der vermehrten Aktivierung durch IL-18 war die Expression des IL-7-Rezeptors auf den CD8⁺ MAIT-Zellen von MS-Patienten signifikant erhöht. IL-7 spielt bei der Homöostase von CD8⁺ T-Zellen eine zentrale Rolle¹⁶⁵. Die Effekte dieses Zytokins werden im Gegensatz zu anderen klassischen Zytokinen, wie zum Beispiel IL-2, nicht primär

über dessen Sekretion, sondern über die Konkurrenz der T-Zell-Subpopulationen um eine limitierte Menge an vorhandenem IL-7 und somit eher über die Expression des Rezeptors reguliert^{186,187}. Die Hochregulation des IL-7-Rezeptors auf den CD8⁺ MAIT-Zellen der MS-Patienten könnte also eine homöostatische Reaktion auf eine vermehrte Fluktuation innerhalb dieser T-Zell-Population durch Aktivierungs-, Migrations- und Zelltodprozesse sein. Es wurde bereits mehrfach dokumentiert, dass die MAIT-Zellen im Blut von gesunden Personen eine anerge, konstante Population darstellen und proliferativ inaktiv sind^{124,126,130}. Eine vergleichende Analyse dieser Merkmale bei MS-Patienten, beispielsweise anhand der Expression von Ki67, einem Marker, der spezifisch während der Zellteilung induziert wird, steht noch aus. Eine vermehrte Fluktuation innerhalb der MAIT-Zell-Population könnte auch erklären, warum die Reduktion der Frequenz im Blut bei Patienten in der sekundärprogredienten Phase besonders deutlich ist. Möglicherweise sind nach einem gewissen Fortschreiten der Erkrankung die homöostatischen Regulationsmechanismen erschöpft. Signifikante Korrelationen der CD8⁺ MAIT-Zell-Frequenz mit der Schwere oder der Dauer der Erkrankung konnten allerdings nicht nachgewiesen werden.

In vitro bewirkt IL-7 bei MAIT-Zellen eine Hochregulation verschiedener Moleküle, die an der Signaltransduktion des TZR beteiligt sind¹⁶⁶. In der Folge produzieren die Zellen nach Vorinkubation mit IL-7 und anschließender TZR-Stimulation vermehrt IL-17¹⁶⁶. Dieser Effekt der Induktion von IL-17 Produktion durch IL-7 wurde zuvor bereits bei CCR6 positive CD4⁺ T-Zellen demonstriert¹⁸⁸. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Induktion der IL-17 Produktion bei MAIT-Zellen von MS-Patienten vermutlich aufgrund der erhöhten Expression des IL-7-Rezeptors signifikant stärker war als bei gesunden Individuen. CD8⁺ MAIT-Zellen von MS-Patienten wiesen demnach einen Phänotyp auf, der sie potenziell vermehrt pro-inflammatorisch wirken lässt.

CD8⁺ MAIT-Zellen stellen eine *"innate like"* T-Zell-Population dar, deren Funktion und Regulation unter physiologischen Bedingungen sowie im Rahmen von Infektionen oder Autoimmunerkrankungen noch wenig erforscht und möglicherweise vielfältig ist. Durch die Herunterregulation der Expression von Molekülen, die an der TZR-Signaltransduktion beteiligt sind, wie zum Beispiel CD8β, scheint die Reaktivität der Zellen auf ihr TZR-Antigen reguliert zu sein. Die erhöhte Expression des IL-7-Rezeptors auf CD8⁺ MAIT-Zellen von MS-Patienten, die in dieser Arbeit erstmals beschrieben wurde, wirkt vermutlich dieser Regulation entgegen und führt zur vermehrten Sekretion von pro-inflammatorischem IL-17 nach TZR-Stimulation. Des Weiteren wurde hier erstmals ein Zusammenhang zwischen einer reduzierten Frequenz der CD8⁺ MAIT-Zellen im Blut von MS-Patienten und dem IL-18 Serumspiegel dokumentiert. Eine vermehrte Aktivierung der CD8⁺ MAIT-Zellen bei MS-Patienten durch IL-18 oder andere möglicherweise ebenfalls erhöhte Faktoren des angeborenen Immunsystems könnte zum einen eine vermehrte Sekretion von IFN-y induzieren und

zum anderen ein vermehrtes Einwandern der Zellen in entzündliche Gewebe, wie beispielsweise das ZNS, bedingen. Außerdem zeigen MAIT-Zellen eine gesteigerte Tendenz zum aktivierungsinduzierten Zelltod, der im Rahmen einer vermehrten Aktivierung bei MS-Patienten zur Frequenzverminderung im Blut beitragen könnte. Dies würde bedeuten, dass die Frequenzverminderung sekundär zur Erkrankung auftritt. Im Gegensatz dazu könnte diese aber auch aufgrund einer gestörten Entwicklung der MAIT-Zellen bei MS-Patienten primär zur Induktion der Erkrankung auftreten. Dies würde wiederum implizieren, dass CD8⁺ MAIT-Zellen möglicherweise regulatorische Funktionen in der MS haben könnten. Die Rolle der CD8⁺ MAIT-Zellen und somit des Großteils der IL-17 produzierenden CD8⁺ T-Zellen in der MS bleibt weiterhin unklar und ist vermutlich vielfältig. Dennoch konnte in dieser Arbeit zum einen ein Beitrag zur laufenden phänotypischen Charakterisierung dieser Zellen und zur Aufklärung der Existenz möglicher weiterer IL-17 produzierender CD8⁺ T-Zellen geleistet werden. Zum anderen wurden neben der verminderten Frequenz im Zusammenhang mit erhöhten IL-18 Serumspiegeln auch funktionelle Veränderungen der CD8⁺ MAIT-Zellen bei MS-Patienten aufgezeigt, die diesen Zelltyp zu einem interessanten Effektorzelltyp des angeborenen Immunsystems im Rahmen der MS-Pathogenese machen.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Multiple Sklerose (MS) ist eine entzündliche Erkrankung des zentralen Nervensystems (ZNS), deren Pathogenese durch ZNS-infiltrierende T-Zellen gekennzeichnet ist. Es mehren sich Befunde, die darauf hinweisen, dass neben den vielfach untersuchten $CD4^+$ T-Zellen auch $CD8^+$ T-Zellen eine wichtige Rolle bei der Entstehung der Erkrankung spielen. Von besonderer Bedeutung sind hierbei vermutlich Interleukin (IL)-17 produzierende $CD8^+$ T-Zellen, die in aktiven MS-Läsionen stark angereichert sind. Der Großteil der IL-17 produzierenden $CD8^+$ T-Zellen im peripheren Blut des Menschen gehört den bakterienspezifischen *mucosal associated invariant T* (MAIT)-Zellen an. Diese zeichnen sich neben einer hohen Expression von CD161 durch einen semi-invarianten T-Zell-Rezeptor (TZR, V α 7.2) aus. Es ist umstritten, ob darüber hinaus noch humane $CD8^+$ T-Zellen mit anderer Spezifität, beispielsweise gegen Viren, in der Lage sind IL-17 produzierender CD8⁺ T-Zellen in der S.

Es konnte gezeigt werden, dass innerhalb der CD8⁺ T-Zell-Population neben der hohen Expression von CD161 auch eine Herunterregulation der CD8β-Untereinheit mit der Fähigkeit IL-17 zu produzieren und einem für IL-17 produzierende T-Zellen typischen Phänotyp assoziiert ist. CD8 $\beta^{-}\alpha^{+}$ T-Zellen weisen zudem eine verminderte Reaktivität auf TZR-Stimulation auf. Der Großteil der IL-17 produzierenden CD8⁺ T-Zellen war den MAIT-Zellen zuzuordnen, die eine homogene T-Zell-Population mit einem auf die Infiltration entzündlicher Gewebe ausgerichteten Effektor-Gedächtnis-Zell-Phänotyp zeigten. Es konnten zudem keine IL-17 produzierenden CD8⁺ T-Zellen mit Spezifität gegen immundominante Epitope der weit verbreiteten Zytomegalie- und Influenzaviren identifiziert werden. Im peripheren Blut von MS-Patienten war die Frequenz der CD8⁺ MAIT-Zellen signifikant vermindert im Vergleich zu gesunden Individuen. Im Liquor von MS-Patienten und Patienten mit anderen neurologischen Erkrankungen fanden sich kaum CD8⁺ MAIT-Zellen. Die Verminderung der Zellen im Blut korrelierte mit dem IL-18 Serumspiegel der MS-Patienten. Durch in vitro Stimulation von mononukleären Zellen des peripheren Blutes mit IL-18 konnten MAIT-Zellen aktiviert werden, was zu ihrer Depletion aus der Kultur führte. Erhöhte IL-18 Serumspiegel bei MS-Patienten könnten also ursächlich für die verminderte Frequenz der CD8⁺ MAIT-Zellen sein. Zusätzlich war die Expression der IL-7 Rezeptor α-Untereinheit auf den CD8⁺ MAIT-Zellen der MS-Patienten im Vergleich zu gesunden Individuen signifikant erhöht. Da IL-7 bei der Homöostase von T-Zellen eine zentrale Rolle spielt, könnte es sich hierbei um eine homöostatische Reaktion auf eine vermehrte Fluktuation innerhalb dieser Population handeln. In der Folge zeigten CD8⁺ MAIT-Zellen von MS-Patienten eine erhöhte Reaktivität auf IL-7 Stimulation und produzierten daraufhin signifikant mehr IL-17. Sie wiesen also bei MS-Patienten im Vergleich zu gesunden Individuen einen verstärkt proinflammatorischen Phänotyp auf.

6. SUMMARY

Multiple sclerosis (MS) is an inflammatory disease of the central nervous system (CNS) that is characterized by Infiltration of T cells into the CNS. Recent findings indicate that besides the established Role of CD4⁺ T cells, CD8⁺ T cells are involved in the pathogenesis of the disease. Particularly, interleukin(IL)-17-producing CD8⁺ T cells have been found to be enriched in active MS lesions. IL-17 production has been attributed to a subset of CD8⁺ T cells that expresses high levels of CD161. The majority of these cells belong to the bacteria specific *mucosal-associated invariant T* (MAIT) cell population, which is characterized by the expression of a semi-invariant T cell receptor (TCR, V α 7.2). However, the existence of virus specific IL-17 producing CD8⁺ T cells has been reported as well. Therefore, the aim of this study was on the one hand a general characterization of IL-17 producing CD8⁺ T cells and on the other hand an analysis of the frequency and functional characteristics of these cells in MS patients.

Besides the known association of high CD161 expression with the ability to produce IL-17, a reduced expression of the CD8 β subunit was found to be related to IL-17 production and a corresponding phenotype of CD8⁺ T cells. Furthermore, CD8 β ⁻CD8 α ⁺ T cells showed a reduced responsiveness to TCR mediated stimulation. It could be confirmed that the majority of IL-17 producing CD8⁺ T cells can be found within the MAIT cell compartment resembling a homogenous T cell population with a tissue homing, effector memory phenotype. Additionally, IL-17 producing $\mathsf{CD8}^+$ T cells with specificity against immunodominant epitopes of the common Cytomegalic or Flu virus could not be identified. The frequency of CD8⁺ MAIT cells was significantly reduced in the peripheral blood of MS patients compared to healthy individuals. In the cerebrospinal fluid of MS patients and patients with other neurological diseases CD8⁺ MAIT cells were only detected at very low frequencies. The reduction in the peripheral blood significantly correlated with IL-18 serum levels in MS patients. Moreover, in vitro stimulation of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) with IL-18 specifically activated and depleted CD8 $^{+}$ MAIT cells, suggesting that elevated IL-18 levels drive CD8 $^{+}$ MAIT cell reduction in MS. In addition, peripheral blood CD8⁺ MAIT cells from MS patients exerted increased expression of the IL-7 receptor α -subunit. As IL-7 is an essential cytokine for T cell homeostasis, this might reflect a homeostatic feedback mechanism due to possibly increased turnover of this T cell population in MS patients. Consequently, CD8⁺ MAIT cells showed enhanced responsiveness to IL-7, which augmented interleukin-17 production by CD8 * MAIT cells in MS patients. Therefore, CD8⁺ MAIT cells exert a more pro-inflammatory phenotype in MS.

LITERATURVERZEICHNIS

- 1. Murphy, K., Travers, P. & Walport, M. Janeway's Immunobiology. (Garland Science: 2008).
- 2. Neefjes, J., Jongsma, M. L. M., Paul, P. & Bakke, O. Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. *Nat Rev Immunol* **11**, 823–36 (2011).
- 3. Bevan, M. J. Cross-priming for a secondary cytotoxic response to minor H antigens with H-2 congenic cells which do not cross-react in the cytotoxic assay. *J Exp Med* **143**, 1283–8 (1976).
- 4. Bevan, M. J. Minor H antigens introduced on H-2 different stimulating cells cross-react at the cytotoxic T cell level during in vivo priming. *J Immunol* **117**, 2233–8 (1976).
- 5. Banchereau, J. & Steinman, R. M. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* **392**, 245–52 (1998).
- 6. Williams, M. A. & Bevan, M. J. Effector and memory CTL differentiation. *Ann Rev Immunol* **25**, 171–92 (2007).
- 7. Arens, R. & Schoenberger, S. P. Plasticity in programming of effector and memory CD8 T-cell formation. *Immunol Rev* **235**, 190–205 (2010).
- Iwasaki, A. & Medzhitov, R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat Immunol* 5, 987–95 (2004).
- 9. Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P. & Janeway, C. A. A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* **388**, 394–7 (1997).
- 10. Swain, S. L., McKinstry, K. K. & Strutt, T. M. Expanding roles for CD4⁺ T cells in immunity to viruses. *Nature reviews. Immunology* **12**, 136–48 (2012).
- 11. Bennett, S. R. *et al.* Help for cytotoxic-T-cell responses is mediated by CD40 signalling. *Nature* **393**, 478–80 (1998).
- 12. Ridge, J. P., Di Rosa, F. & Matzinger, P. A conditioned dendritic cell can be a temporal bridge between a CD4+ T-helper and a T-killer cell. *Nature* **393**, 474–8 (1998).
- 13. Schoenberger, S. P., Toes, R. E., Van der Voort, E. I., Offringa, R. & Melief, C. J. T-cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40-CD40L interactions. *Nature* **393**, 480–3 (1998).
- 14. Bourgeois, C., Rocha, B. & Tanchot, C. A role for CD40 expression on CD8+ T cells in the generation of CD8+ T cell memory. *Science* **297**, 2060–3 (2002).
- 15. Williams, M. A., Tyznik, A. J. & Bevan, M. J. Interleukin-2 signals during priming are required for secondary expansion of CD8+ memory T cells. *Nature* **441**, 890–3 (2006).
- 16. Shedlock, D. J. & Shen, H. Requirement for CD4 T cell help in generating functional CD8 T cell memory. *Science* **300**, 337–9 (2003).
- 17. Sun, J. C. & Bevan, M. J. Defective CD8 T cell memory following acute infection without CD4 T cell help. *Science* **300**, 339–42 (2003).
- 18. Gerlach, C. *et al.* One naive T cell, multiple fates in CD8+ T cell differentiation. *J Exp Med* **207**, 1235–46 (2010).

- 19. Stemberger, C. *et al.* A single naive CD8+ T cell precursor can develop into diverse effector and memory subsets. *Immunity* **27**, 985–97 (2007).
- 20. Smith, T. R. F. & Kumar, V. Revival of CD8+ Treg-mediated suppression. *Trends Immunol* **29**, 337–42 (2008).
- 21. Tang, X. *et al.* Regulation of immunity by a novel population of Qa-1-restricted CD8alphaalpha+TCRalphabeta+ T cells. *J Immunol* **177**, 7645–55 (2006).
- 22. Rifa'i, M., Kawamoto, Y., Nakashima, I. & Suzuki, H. Essential roles of CD8+CD122+ regulatory T cells in the maintenance of T cell homeostasis. *J Exp Med* **200**, 1123–34 (2004).
- 23. Sun, J., Madan, R., Karp, C. L. & Braciale, T. J. Effector T cells control lung inflammation during acute influenza virus infection by producing IL-10. *Nat Med* **15**, 277–84 (2009).
- 24. Palmer, E. M., Holbrook, B. C., Arimilli, S., Parks, G. D. & Alexander-Miller, M. A. IFNgamma-producing, virus-specific CD8+ effector cells acquire the ability to produce IL-10 as a result of entry into the infected lung environment. *Virology* **404**, 225–30 (2010).
- 25. Trandem, K., Zhao, J., Fleming, E. & Perlman, S. Highly activated cytotoxic CD8 T cells express protective IL-10 at the peak of coronavirus-induced encephalitis. *J Immunol* **186**, 3642–52 (2011).
- 26. Sun, J. *et al.* Autocrine regulation of pulmonary inflammation by effector T-cell derived IL-10 during infection with respiratory syncytial virus. *PLoS pathogens* **7**, e1002173 (2011).
- 27. Murali-Krishna, K. *et al.* Counting antigen-specific CD8 T cells: a reevaluation of bystander activation during viral infection. *Immunity* **8**, 177–87 (1998).
- 28. Cui, W. & Kaech, S. M. Generation of effector CD8+ T cells and their conversion to memory T cells. *Immunol Rev* 236, 151–66 (2010).
- 29. Kaech, S. M. *et al.* Selective expression of the interleukin 7 receptor identifies effector CD8 T cells that give rise to long-lived memory cells. *Nat Immunol* **4**, 1191–8 (2003).
- 30. Madakamutil, L. T. *et al.* CD8alphaalpha-mediated survival and differentiation of CD8 memory T cell precursors. *Science* **304**, 590–3 (2004).
- 31. Willing, A. & Friese, M. A. CD8-mediated inflammatory central nervous system disorders. *Curr Opin Neurol* **25**, 316–21 (2012).
- 32. Compston, A. & Coles, A. Multiple sclerosis. *Lancet* **372**, 1502–17 (2008).
- 33. Sadovnick, A. D. The familial nature of Multiple Sclerosis: Age-corrected empiric recurrence risks for children and siblings of patients. *Neurology* **38**, 990–91 (1988).
- 34. Ebers, G. C., Sadovnick, A. D. & Risch, N. J. A genetic basis for familial aggregation in multiple sclerosis. Canadian Collaborative Study Group. *Nature* **377**, 150–1 (1995).
- 35. Dyment, D. a, Yee, I. M. L., Ebers, G. C. & Sadovnick, a D. Multiple sclerosis in stepsiblings: recurrence risk and ascertainment. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **77**, 258–9 (2006).
- 36. Willer, C. J., Dyment, D. A., Risch, N. J., Sadovnick, A. D. & Ebers, G. C. Twin concordance and sibling recurrence rates in multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 12877–82 (2003).

- 37. Hafler, D. A. *et al.* Risk alleles for multiple sclerosis identified by a genomewide study. *N Engl J Med* **357**, 851–62 (2007).
- 38. Sawcer, S. *et al.* Genetic risk and a primary role for cell-mediated immune mechanisms in multiple sclerosis. *Nature* **476**, 214–219 (2011).
- 39. Bush, W. S. *et al.* Evidence for polygenic susceptibility to multiple sclerosis--the shape of things to come. *Am J Hum Genet* **86**, 621–5 (2010).
- 40. Gregory, A. P. *et al.* TNF receptor 1 genetic risk mirrors outcome of anti-TNF therapy in multiple sclerosis. *Nature* **488**, 508–11 (2012).
- 41. Marrie, R. A. Environmental risk factors in multiple sclerosis aetiology. *Lancet Neurology* **3**, 709–18 (2004).
- 42. Martyn, C. N., Cruddas, M. & Compston, D. a Symptomatic Epstein-Barr virus infection and multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **56**, 167–8 (1993).
- 43. Thacker, E. L., Mirzaei, F. & Ascherio, A. Infectious mononucleosis and risk for multiple sclerosis: a meta-analysis. *Ann Neurol* **59**, 499–503 (2006).
- 44. Ascherio, A., Munger, K. L. & Simon, K. C. Vitamin D and multiple sclerosis. *Lancet Neurology* **9**, 599–612 (2010).
- 45. Lemire, J. M. & Archer, D. C. 1,25-dihydroxyvitamin D3 prevents the in vivo induction of murine experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Clin Invest* **87**, 1103–7 (1991).
- 46. Goverman, J. Autoimmune T cell responses in the central nervous system. *Nat Rev Immunol* **9**, 393–407 (2009).
- 47. De Vos, A. F. *et al.* Transfer of central nervous system autoantigens and presentation in secondary lymphoid organs. *J Immunol* **169**, 5415–23 (2002).
- 48. Münz, C., Lünemann, J. D., Getts, M. T. & Miller, S. D. Antiviral immune responses: triggers of or triggered by autoimmunity? *Nat Rev Immunol* **9**, 246–58 (2009).
- 49. Fujinami, R. S. & Oldstone, M. B. Amino acid homology between the encephalitogenic site of myelin basic protein and virus: mechanism for autoimmunity. *Science* **230**, 1043–5 (1985).
- 50. Wucherpfennig, K. W. & Strominger, J. L. Molecular mimicry in T cell-mediated autoimmunity: viral peptides activate human T cell clones specific for myelin basic protein. *Cell* **80**, 695–705 (1995).
- 51. Lang, H. L. E. *et al.* A functional and structural basis for TCR cross-reactivity in multiple sclerosis. *Nat Immunol* **3**, 940–3 (2002).
- 52. Lünemann, J. D. *et al.* EBNA1-specific T cells from patients with multiple sclerosis cross react with myelin antigens and co-produce IFN-gamma and IL-2. *J Exp Med* **205**, 1763–73 (2008).
- 53. Ji, Q., Perchellet, A. & Goverman, J. M. Viral infection triggers central nervous system autoimmunity via activation of CD8+ T cells expressing dual TCRs. *Nat Immunol* **11**, 628–34 (2010).
- 54. Reboldi, A. *et al.* C-C chemokine receptor 6-regulated entry of TH-17 cells into the CNS through the choroid plexus is required for the initiation of EAE. *Nat Immunol* **10**, 514–23 (2009).

- 55. Bitsch, A., Schuchardt, J., Bunkowski, S., Kuhlmann, T. & Brück, W. Acute axonal injury in multiple sclerosis. Correlation with demyelination and inflammation. *Brain* **123**, 1174–83 (2000).
- 56. Trapp, B. D. *et al.* Axonal transection in the lesions of multiple sclerosis. *N Engl J Med* **338**, 278–85 (1998).
- 57. Ferguson, B., Matyszak, M. K., Esiri, M. M. & Perry, V. H. Axonal damage in acute multiple sclerosis lesions. *Brain* **120**, 393–9 (1997).
- 58. Friese, M. a *et al.* Acid-sensing ion channel-1 contributes to axonal degeneration in autoimmune inflammation of the central nervous system. *Nat Med* **13**, 1483–9 (2007).
- 59. Schattling, B. *et al.* TRPM4 cation channel mediates axonal and neuronal degeneration in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Nat Med* **18**, 1805-11 (2012).
- 60. Trapp, B. D. & Nave, K.-A. Multiple sclerosis: an immune or neurodegenerative disorder? *Ann Rev Neurosci* **31**, 247–69 (2008).
- 61. Kremenchutzky, M., Rice, G. P. a, Baskerville, J., Wingerchuk, D. M. & Ebers, G. C. The natural history of multiple sclerosis: a geographically based study 9: observations on the progressive phase of the disease. *Brain* **129**, 584–94 (2006).
- 62. Confavreux, C. & Vukusic, S. Age at disability milestones in multiple sclerosis. *Brain* **129**, 595–605 (2006).
- 63. Haghikia, A., Hohlfeld, R., Gold, R. & Fugger, L. Therapies for multiple sclerosis: translational achievements and outstanding needs. *Trends Mol Med* **5**, 309–19 (2013).
- 64. Polman, C. H. *et al.* A randomized, placebo-controlled trial of natalizumab for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med* **354**, 899–910 (2006).
- 65. Bloomgren, G. *et al.* Risk of natalizumab-associated progressive multifocal leukoencephalopathy. *N Engl J Med* **366**, 1870–80 (2012).
- 66. Schwab, S. R. & Cyster, J. G. Finding a way out: lymphocyte egress from lymphoid organs. *Nat Immunol* **8**, 1295–301 (2007).
- 67. Cohen, J. A. *et al.* Oral fingolimod or intramuscular interferon for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med* **362**, 402–15 (2010).
- Kappos, L. *et al.* A placebo-controlled trial of oral fingolimod in relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med* 362, 387–401 (2010).
- 69. Ben-Nun, A., Wekerle, H. & Cohen, I. R. The rapid isolation of clonable antigen-specific T lymphocyte lines capable of mediating autoimmune encephalomyelitis. *Eur J Immunol* **11**, 195–9 (1981).
- 70. Zamvil, S. *et al.* T-cell clones specific for myelin basic protein induce chronic relapsing paralysis and demyelination. *Nature* **317**, 355–8 (1985).
- 71. Fogdell-Hahn, A., Ligers, A., Grønning, M., Hillert, J. & Olerup, O. Multiple sclerosis: a modifying influence of HLA class I genes in an HLA class II associated autoimmune disease. *Tissue antigens* **55**, 140–8 (2000).
- 72. Harbo, H. F. *et al.* Genes in the HLA class I region may contribute to the HLA class II-associated genetic susceptibility to multiple sclerosis. *Tissue antigens* **63**, 237–47 (2004).

- 73. Brynedal, B. *et al.* HLA-A confers an HLA-DRB1 independent influence on the risk of multiple sclerosis. *PloS one* **2**, e664 (2007).
- 74. Burfoot, R. K. *et al.* SNP mapping and candidate gene sequencing in the class I region of the HLA complex: searching for multiple sclerosis susceptibility genes in Tasmanians. *Tissue antigens* **71**, 42–50 (2008).
- 75. Friese, M. A. *et al.* Opposing effects of HLA class I molecules in tuning autoreactive CD8+ T cells in multiple sclerosis. *Nat Med* **14**, 1227–35 (2008).
- 76. Yeo, T. W. *et al.* A second major histocompatibility complex susceptibility locus for multiple sclerosis. *Ann Neurol* **61**, 228–36 (2007).
- 77. Healy, B. C. *et al.* HLA B*44: protective effects in MS susceptibility and MRI outcome measures. *Neurology* **75**, 634–40 (2010).
- Babbe, H. *et al.* Clonal expansions of CD8+ T cells dominate the T cell infiltrate in active multiple sclerosis lesions as shown by micromanipulation and single cell polymerase chain reaction. *J Exp Med* 192, 393–404 (2000).
- 79. Junker, A. *et al.* Multiple sclerosis: T-cell receptor expression in distinct brain regions. *Brain* **130**, 2789–99 (2007).
- 80. Lucchinetti, C. F. *et al.* Inflammatory cortical demyelination in early multiple sclerosis. *N Engl J Med* **365**, 2188–97 (2011).
- Van Oosten, B. W. *et al.* Treatment of multiple sclerosis with the monoclonal anti-CD4 antibody cM-T412: results of a randomized, double-blind, placebo-controlled, MR-monitored phase II trial. *Neurology* 49, 351–7 (1997).
- 82. Stüve, O. *et al.* Immune surveillance in multiple sclerosis patients treated with natalizumab. *Ann Neurol* **59**, 743–7 (2006).
- 83. Coles, A. J. *et al.* Alemtuzumab vs. interferon beta-1a in early multiple sclerosis. *N Engl J Med* **359**, 1786–801 (2008).
- 84. Cohen, J. A. *et al.* Alemtuzumab versus interferon beta 1a as first-line treatment for patients with relapsing-remitting multiple sclerosis: a randomised controlled phase 3 trial. *Lancet* **380**, 1819–28 (2012).
- 85. Coles, A. J. *et al.* Alemtuzumab for patients with relapsing multiple sclerosis after disease-modifying therapy: a randomised controlled phase 3 trial. *Lancet* **380**, 1829–39 (2012).
- 86. Su, S. B. *et al.* Essential role of the MyD88 pathway, but nonessential roles of TLRs 2, 4, and 9, in the adjuvant effect promoting Th1-mediated autoimmunity. *J Immunol* **175**, 6303–10 (2005).
- 87. Huseby, E. S. *et al.* A pathogenic role for myelin-specific CD8(+) T cells in a model for multiple sclerosis. *J Exp Med* **194**, 669–76 (2001).
- 88. Ford, M. L. & Evavold, B. D. Specificity, magnitude, and kinetics of MOG-specific CD8+ T cell responses during experimental autoimmune encephalomyelitis. *Eur J Immunol* **35**, 76–85 (2005).
- 89. Anderson, A. C. *et al.* A transgenic model of central nervous system autoimmunity mediated by CD4+ and CD8+ T and B cells. *J Immunol* **188**, 2084–92 (2012).

- 90. Friese, M. A. & Fugger, L. Autoreactive CD8+ T cells in multiple sclerosis: a new target for therapy? *Brain* **128**, 1747–63 (2005).
- 91. Friese, M. A. & Fugger, L. Pathogenic CD8+ T cells in multiple sclerosis. Ann Neurol 66, 132–41 (2009).
- 92. Jiang, H., Zhang, S. I. & Pernis, B. Role of CD8+ T cells in murine experimental allergic encephalomyelitis. *Science* **256**, 1213–5 (1992).
- 93. Koh, D. R. *et al.* Less mortality but more relapses in experimental allergic encephalomyelitis in CD8-/mice. *Science* **256**, 1210–3 (1992).
- 94. Baughman, E. J. *et al.* Neuroantigen-specific CD8+ regulatory T-cell function is deficient during acute exacerbation of multiple sclerosis. *J Autoimmun* **36**, 115–24 (2011).
- 95. Hu, D. et al. Analysis of regulatory CD8 T cells in Qa-1-deficient mice. Nat Immunol 5, 516–23 (2004).
- 96. Correale, J. & Villa, A. Isolation and characterization of CD8+ regulatory T cells in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* **195**, 121–34 (2008).
- 97. Tzartos, J. S. *et al.* Interleukin-17 production in central nervous system-infiltrating T cells and glial cells is associated with active disease in multiple sclerosis. *Am J Pathol* **172**, 146–55 (2008).
- 98. Abbas, A. K., Lichtman, A. H. & Pillai, S. Cellular and Molecular Immunology. (Elsevier Inc.: 2012).
- Kroenke, M. A., Carlson, T. J., Andjelkovic, A. V & Segal, B. M. IL-12- and IL-23-modulated T cells induce distinct types of EAE based on histology, CNS chemokine profile, and response to cytokine inhibition. J Exp Med 205, 1535–41 (2008).
- 100. Brok, H. P. M. *et al.* Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis in common marmosets using an anti-IL-12p40 monoclonal antibody. *J Immunol* **169**, 6554–63 (2002).
- 101. 't Hart, B. A. *et al.* Suppression of ongoing disease in a nonhuman primate model of multiple sclerosis by a human-anti-human IL-12p40 antibody. *J Immunol* **175**, 4761–8 (2005).
- 102. Cua, D. J. *et al.* Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature* **421**, 744–8 (2003).
- 103. Haak, S. *et al.* IL-17A and IL-17F do not contribute vitally to autoimmune neuro-inflammation in mice. *J Clin Invest* **119**, 61–9 (2009).
- 104. Matusevicius, D. *et al.* Interleukin-17 mRNA expression in blood and CSF mononuclear cells is augmented in multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis* **5**, 101–104 (1999).
- 105. Vaknin-Dembinsky, A., Balashov, K. & Weiner, H. L. IL-23 is increased in dendritic cells in multiple sclerosis and down-regulation of IL-23 by antisense oligos increases dendritic cell IL-10 production. *J Immunol* **176**, 7768–74 (2006).
- 106. Brucklacher-Waldert, V., Stuerner, K., Kolster, M., Wolthausen, J. & Tolosa, E. Phenotypical and functional characterization of T helper 17 cells in multiple sclerosis. *Brain* **132**, 3329–41 (2009).
- 107. Kebir, H. *et al.* Human TH17 lymphocytes promote blood-brain barrier disruption and central nervous system inflammation. *Nat Med* **13**, 1173–5 (2007).
- 108. Darlington, P. J. *et al.* Diminished Th17 (not Th1) responses underlie multiple sclerosis disease abrogation after hematopoietic stem cell transplantation. *Ann Neurol* **17**, 1–14 (2012).

- 109. Segal, B. M. *et al.* Repeated subcutaneous injections of IL12/23 p40 neutralising antibody, ustekinumab, in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis: a phase II, double-blind, placebo-controlled, randomised, dose-ranging study. *Lancet Neurology* **7**, 796–804 (2008).
- 110. Patel, D. D., Lee, D. M., Kolbinger, F. & Antoni, C. Effect of IL-17A blockade with secukinumab in autoimmune diseases. *Ann Rheum Dis* **72 Suppl 2**, iii116–iii123 (2013).
- 111. Fossiez, F. *et al.* T cell interleukin-17 induces stromal cells to produce proinflammatory and hematopoietic cytokines. *J Exp Med* **183**, 2593–603 (1996).
- 112. Huppert, J. *et al.* Cellular mechanisms of IL-17-induced blood-brain barrier disruption. *FASEB* **24**, 1023–34 (2010).
- 113. Cosmi, L. *et al.* Human interleukin 17-producing cells originate from a CD161+CD4+ T cell precursor. *J Exp Med* **205**, 1903–16 (2008).
- 114. Billerbeck, E. *et al.* Analysis of CD161 expression on human CD8+ T cells defines a distinct functional subset with tissue-homing properties. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 3006–11 (2010).
- 115. Lanier, L. L., Chang, C. & Phillips, J. H. Human NKR-P1A. A disulfide-linked homodimer of the C-type lectin superfamily expressed by a subset of NK and T lymphocytes. *J Immunol* **153**, 2417–28 (1994).
- 116. Lanier, L. L. NK cell recognition. Ann Rev Immunol 23, 225–74 (2005).
- 117. Koo, G. C. & Peppard, J. R. Establishment of monoclonal anti-Nk-1.1 antibody. *Hybridoma* **3**, 301–3 (1984).
- 118. Annunziato, F. & Romagnani, S. Mouse T helper 17 phenotype: not so different than in man after all. *Cytokine* **56**, 112–5 (2011).
- 119. Aldemir, H. *et al.* Cutting edge: lectin-like transcript 1 is a ligand for the CD161 receptor. *J Immunol* **175**, 7791–5 (2005).
- 120. Rosen, D. B. *et al.* Cutting edge: lectin-like transcript-1 is a ligand for the inhibitory human NKR-P1A receptor. *J Immunol* **175**, 7796–9 (2005).
- 121. Rosen, D. B. *et al.* Functional consequences of interactions between human NKR-P1A and its ligand LLT1 expressed on activated dendritic cells and B cells. *J Immunol* **180**, 6508–17 (2008).
- 122. Takahashi, T., Dejbakhsh-Jones, S. & Strober, S. Expression of CD161 (NKR-P1A) defines subsets of human CD4 and CD8 T cells with different functional activities. *J Immunol* **176**, 211–6 (2006).
- 123. Maggi, L. *et al.* CD161 is a marker of all human IL-17-producing T-cell subsets and is induced by RORC. *Eur J Immunol* **40**, 2174–81 (2010).
- 124. Turtle, C. J., Swanson, H. M., Fujii, N., Estey, E. H. & Riddell, S. R. A distinct subset of self-renewing human memory CD8+ T cells survives cytotoxic chemotherapy. *Immunity* **31**, 834–44 (2009).
- 125. Neuenhahn, M. & Busch, D. H. The quest for CD8+ memory stem cells. *Immunity* **31**, 702–4 (2009).
- 126. Dusseaux, M. *et al.* Human MAIT cells are xenobiotic-resistant, tissue-targeted, CD161hi IL-17-secreting T cells. *Blood* **117**, 1250–9 (2011).
- 127. Gold, M. C. *et al.* Human mucosal associated invariant T cells detect bacterially infected cells. *PLoS Biol* **8**, e1000407 (2010).

- 128. Le Bourhis, L. *et al.* Antimicrobial activity of mucosal-associated invariant T cells. *Nat Immunol* **11**, 701– 8 (2010).
- 129. Treiner, E. *et al.* Selection of evolutionarily conserved mucosal-associated invariant T cells by MR1. *Nature* **422**, 164–9 (2003).
- 130. Havenith, S. H. C. *et al.* Analysis of stem-cell-like properties of human CD161++IL-18Rα+ memory CD8+ T cells. *Int Immunol* **24**, 625–36 (2012).
- 131. Northfield, J. W. *et al.* CD161 expression on hepatitis C virus-specific CD8+ T cells suggests a distinct pathway of T cell differentiation. *Hepatology* **47**, 396–406 (2008).
- 132. Porcelli, S., Yockey, C. E., Brenner, M. B. & Balk, S. P. Analysis of T cell antigen receptor (TCR) expression by human peripheral blood CD4-8- alpha/beta T cells demonstrates preferential use of several V beta genes and an invariant TCR alpha chain. *J Exp Med* **178**, 1–16 (1993).
- Tilloy, F. *et al.* An invariant T cell receptor alpha chain defines a novel TAP-independent major histocompatibility complex class Ib-restricted alpha/beta T cell subpopulation in mammals. *J Exp Med* 189, 1907–21 (1999).
- 134. Riegert, P., Wanner, V. & Bahram, S. Genomics, isoforms, expression, and phylogeny of the MHC class Irelated MR1 gene. *J Immunol* **161**, 4066–77 (1998).
- 135. Kjer-Nielsen, L. *et al.* MR1 presents microbial vitamin B metabolites to MAIT cells. *Nature* **491**, 717–23 (2012).
- 136. Chua & Hansen, T. Vitamins prime immunity. *Nature* **491**, 680–681 (2012).
- 137. Gold, M. C. & Lewinsohn, D. M. Co-dependents: MR1-restricted MAIT cells and their antimicrobial function. *Nat Rev Microbiol* **11**, 14–9 (2013).
- 138. Lantz, O. & Bendelac, a An invariant T cell receptor alpha chain is used by a unique subset of major histocompatibility complex class I-specific CD4+ and CD4-8- T cells in mice and humans. *J Exp Med* **180**, 1097–106 (1994).
- 139. Gold, M. C. *et al.* Human thymic MR1-restricted MAIT cells are innate pathogen-reactive effectors that adapt following thymic egress. *Mucosal Immunol* **6**, 35–44 (2013).
- 140. Stetson, D. B. *et al.* Constitutive cytokine mRNAs mark natural killer (NK) and NK T cells poised for rapid effector function. *J Exp Med* **198**, 1069–76 (2003).
- 141. Annibali, V. *et al.* CD161(high)CD8+T cells bear pathogenetic potential in multiple sclerosis. *Brain* **134**, 542–54 (2011).
- 142. Chua, W.-J. *et al.* Polyclonal mucosa-associated invariant T cells have unique innate functions in bacterial infection. *Infect Immun* **80**, 3256–67 (2012).
- 143. Chiba, A. *et al.* Mucosal-associated invariant T cells promote inflammation and exacerbate disease in murine models of arthritis. *Arthritis Rheum* **64**, 153–61 (2012).
- 144. Brigl, M., Bry, L., Kent, S. C., Gumperz, J. E. & Brenner, M. B. Mechanism of CD1d-restricted natural killer T cell activation during microbial infection. *Nat Immunol* **4**, 1230–7 (2003).
- 145. Georgel, P., Radosavljevic, M., Macquin, C. & Bahram, S. The non-conventional MHC class I MR1 molecule controls infection by Klebsiella pneumoniae in mice. *Mol Immunol* **48**, 769–75 (2011).

- 146. Lanier, L. L. Shades of grey the blurring view of innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* **13**, 73–74 (2013).
- 147. Yamagata, T., Mathis, D. & Benoist, C. Self-reactivity in thymic double-positive cells commits cells to a CD8 alpha alpha lineage with characteristics of innate immune cells. *Nat Immunol* **5**, 597–605 (2004).
- 148. Polman, C. H. *et al.* Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria. *Ann Neurol* **69**, 292–302 (2011).
- 149. Kurtzke, J. F. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology* **33**, 1444–52 (1983).
- 150. Altman, J. D. *et al.* Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes. *Science* **274**, 94–6 (1996).
- 151. Moebius, U., Kober, G., Griscelli, A. L., Hercend, T. & Meuer, S. C. Expression of different CD8 isoforms on distinct human lymphocyte subpopulations. *Eur J Immunol* **21**, 1793–800 (1991).
- 152. Annunziato, F. *et al.* Phenotypic and functional features of human Th17 cells. *J Exp Med* **204**, 1849–61 (2007).
- 153. Sallusto, F., Lenig, D., Förster, R., Lipp, M. & Lanzavecchia, A. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* **401**, 708–12 (1999).
- 154. Wilson, N. J. *et al.* Development, cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells. *Nat Immunol* **8**, 950–7 (2007).
- 155. Kveiborg, M., Albrechtsen, R., Couchman, J. R. & Wewer, U. M. Cellular roles of ADAM12 in health and disease. *Int J Biochem Cell Biol* **40**, 1685–702 (2008).
- 156. Svensson, M. *et al.* CCL25 mediates the localization of recently activated CD8alphabeta(+) lymphocytes to the small-intestinal mucosa. *J Clin Invest* **110**, 1113–21 (2002).
- 157. Cosgrove, C. *et al.* Early and nonreversible decrease of CD161++/MAIT cells in HIV infection. *Blood* **121**, 951–61 (2013).
- 158. Losy, J. & Niezgoda, A. IL-18 in patients with multiple sclerosis. Acta Neurol Scand 104, 171–3 (2001).
- 159. Nicoletti, F. *et al.* Increased serum levels of interleukin-18 in patients with multiple sclerosis. *Neurology* **57**, 342–4 (2001).
- 160. Micallef, M. J. *et al.* Interferon-gamma-inducing factor enhances T helper 1 cytokine production by stimulated human T cells: synergism with interleukin-12 for interferon-gamma production. *Eur J Immunol* **26**, 1647–51 (1996).
- 161. Ahn, H. J. *et al.* A mechanism underlying synergy between IL-12 and IFN-gamma-inducing factor in enhanced production of IFN-gamma. *J Immunol* **159**, 2125–31 (1997).
- 162. Robinson, D. *et al.* IGIF does not drive Th1 development but synergizes with IL-12 for interferon-gamma production and activates IRAK and NFkappaB. *Immunity* **7**, 571–81 (1997).
- 163. Tominaga, K. *et al.* IL-12 synergizes with IL-18 or IL-1beta for IFN-gamma production from human T cells. *Int Immunol* **12**, 151–60 (2000).
- 164. Okamura, H. *et al.* Cloning of a new cytokine that induces IFN-gamma production by T cells. *Nature* **378**, 88–91 (1995).

- 165. Schluns, K. S., Kieper, W. C., Jameson, S. C. & Lefrançois, L. Interleukin-7 mediates the homeostasis of naïve and memory CD8 T cells in vivo. *Nat Immunol* **1**, 426–32 (2000).
- 166. Tang, X.-Z. *et al.* IL-7 Licenses Activation of Human Liver Intrasinusoidal Mucosal-Associated Invariant T Cells. *J Immunol* **190**, 3142–52 (2013).
- 167. Leishman, a J. *et al.* T cell responses modulated through interaction between CD8alphaalpha and the nonclassical MHC class I molecule, TL. *Science* **294**, 1936–9 (2001).
- 168. Bonneville, M. & Lang, F. CD8: from coreceptor to comodulator. *Nat Immunol* **3**, 12–4 (2002).
- 169. Jarry, A., Cerf-Bensussan, N., Brousse, N., Selz, F. & Guy-Grand, D. Subsets of CD3+ (T cell receptor alpha/beta or gamma/delta) and CD3- lymphocytes isolated from normal human gut epithelium display phenotypical features different from their counterparts in peripheral blood. *Eur J Immunol* 20, 1097– 103 (1990).
- 170. Tang, X. *et al.* Regulation of immunity by a novel population of Qa-1-restricted CD8alphaalpha+TCRalphabeta+ T cells. *J Immunol* **177**, 7645–55 (2006).
- 171. Turtle, C. J. *et al.* Innate signals overcome acquired TCR signaling pathway regulation and govern the fate of human CD161(hi) CD8 α^+ semi-invariant T cells. *Blood* **118**, 2752–62 (2011).
- 172. Wang, H. H. *et al.* Interleukin-17-secreting T cells in neuromyelitis optica and multiple sclerosis during relapse. *J Clin Neurosci* **18**, 1313–7 (2011).
- 173. Miyazaki, Y., Miyake, S., Chiba, A., Lantz, O. & Yamamura, T. Mucosal-associated invariant T cells regulate Th1 response in multiple sclerosis. *Int Immunol* **23**, 529–35 (2011).
- 174. Croxford, J. L., Miyake, S., Huang, Y.-Y., Shimamura, M. & Yamamura, T. Invariant V(alpha)19i T cells regulate autoimmune inflammation. *Nat Immunol* **7**, 987–94 (2006).
- 175. Mitsuo, A. *et al.* Decreased CD161+CD8+ T cells in the peripheral blood of patients suffering from rheumatic diseases. *Rheumatology* **45**, 1477–84 (2006).
- 176. Kawachi, I., Maldonado, J., Strader, C. & Gilfillan, S. MR1-restricted V alpha 19i mucosal-associated invariant T cells are innate T cells in the gut lamina propria that provide a rapid and diverse cytokine response. *J Immunol* **176**, 1618–27 (2006).
- 177. Martin, E. et al. Stepwise development of MAIT cells in mouse and human. PLoS Biol 7, e54 (2009).
- 178. Leeansyah, E. *et al.* Activation, exhaustion, and persistent decline of the antimicrobial MR1-restricted MAIT-cell population in chronic HIV-1 infection. *Blood* **121**, 1124–35 (2013).
- Illés, Z. *et al.* Differential expression of NK T cell V alpha 24J alpha Q invariant TCR chain in the lesions of multiple sclerosis and chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *J Immunol* 164, 4375–81 (2000).
- Illés, Z., Shimamura, M., Newcombe, J., Oka, N. & Yamamura, T. Accumulation of Valpha7.2-Jalpha33 invariant T cells in human autoimmune inflammatory lesions in the nervous system. *Int Immunol* 16, 223–30 (2004).
- 181. Ifergan, I. *et al.* Central nervous system recruitment of effector memory CD8+ T lymphocytes during neuroinflammation is dependent on α4 integrin. *Brain* **134**, 3560–3577 (2011).

- 182. Glass, W. G. *et al.* Chemokine receptor CCR5 promotes leukocyte trafficking to the brain and survival in West Nile virus infection. *J Exp Med* **202**, 1087–98 (2005).
- 183. Windhagen, A. *et al.* Expression of costimulatory molecules B7-1 (CD80), B7-2 (CD86), and interleukin 12 cytokine in multiple sclerosis lesions. *J Exp Med* **182**, 1985–96 (1995).
- 184. Balashov, K. E., Rottman, J. B., Weiner, H. L. & Hancock, W. W. CCR5(+) and CXCR3(+) T cells are increased in multiple sclerosis and their ligands MIP-1alpha and IP-10 are expressed in demyelinating brain lesions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 6873–8 (1999).
- 185. Schrijver, I. A. *et al.* Bacterial peptidoglycan and immune reactivity in the central nervous system in multiple sclerosis. *Brain* **124**, 1544–54 (2001).
- 186. Park, J.-H. *et al.* Suppression of IL7Ralpha transcription by IL-7 and other prosurvival cytokines: a novel mechanism for maximizing IL-7-dependent T cell survival. *Immunity* **21**, 289–302 (2004).
- Mazzucchelli, R. & Durum, S. K. Interleukin-7 receptor expression: intelligent design. *Nat Rev Immunol* 7, 144–54 (2007).
- 188. Wan, Q. *et al.* Cytokine signals through PI-3 kinase pathway modulate Th17 cytokine production by CCR6+ human memory T cells. *J Exp Med* **208**, 1875–87 (2011).

DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich zunächst besonders bei Herrn Prof. Dr. Manuel Friese bedanken, der mir dieses spannende und hochaktuelle Projekt überließ und mir bei der Bearbeitung sowohl die notwendige Unterstützung als auch viel wissenschaftliche Freiheit und das entsprechende Vertrauen in meine Arbeit entgegenbrachte.

Bei Herrn Prof. Dr. Christian Lohr möchte ich mich für die Übernahme des Zweitgutachtens und für seine besondere Geduld bei der Beantwortung organisatorischer Fragen bedanken.

Den Mitarbeitern der MS-Tagesklinik danke ich für die Rekrutierung der MS-Patienten.

Außerdem möchte ich mich bei den Mitarbeitern der HEXT FACS Sorting Core Unit und des Service Center für Microarray-Analytik des Instituts für Klinische Chemie des UKE für ihre Unterstützung bedanken.

Für die finanzielle Unterstützung dieses Projekts danke ich der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

Bei allen Mitarbeitern der AG Neuroimmunologie und des Instituts für Neuroimmunologie und klinische MS-Forschung (INIMS), die mich während meiner Doktorandenzeit begleitet haben, möchte ich mich herzlich für die angenehme Arbeitsatmosphäre und stets entgegengebrachte Hilfsbereitschaft bedanken. Mein besonderer Dank gilt hierbei Dr. Karin Steinbach und Melanie Piedavent für ihre technischen und wissenschaftlichen Ratschläge in Sachen Immunologie, Dr. Friederike Ufer für ihren unermüdlichen Einsatz bei der Sammlung humanen Probenmaterials, Dr. Sabine Fleischer für ihr Engagement in allen Bereichen des Miteinanders, und Nina Kursawe, Manuela Kolster und Franziska Hesse für ihre tatkräftige Unterstützung im Laboralltag.

Meinen Eltern, meinen Brüdern und meinen lieben Freunden möchte ich von Herzen für ihre persönliche Unterstützung und ihren Rückhalt während der bisweilen turbulenten Doktorandenzeit danken.

ANHANG

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
ABC	ATP binding casette
APZ	Antigen präsentierende Zelle
BHS	Blut-Hirn-Schranke
BLS	Blut-Liquor-Schranke
CD	Cluster of differentiation
CDR3	complemetarity determining region 3
CFSE	Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester
CMV	Zytomegalievirus
EAE	experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis
EBV	Epstein-Barr Virus
EDSS	expanded disability status scale
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
FACS	fluorescence activated cell sorting
FCS	Fötales Kälberserum
Flu	Influenza
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-koloniestimulierender Faktor
HCV	Hepatitis C Virus
ні	gesunde Individuen (engl. healthy individuals)
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HLA	Human Leukocyte Antigen
HRP	Meerrettichperoxidase (engl. horseradish peroxidase)
IEL	intestinale intraepitheliale Lymphozyten
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IL-7Rα	IL-7-Rezeptor-α-Untereinheit
iNKT	invariant natural killer T
intermediär	int
KFA	komplettes Freundsches Adjuvanz
KLRB1	killer cell lectin-like receptor subfamily B, member 1
LPS	Lipopolysaccharid

MAIT	mucosal-associated invariant T
МНС	major histokompatibility complex
MOG	myelin oligodendrocyte glycoprotein
MR1	MHC-related protein 1
MS	Multiple Sklerose
mw	Mittelwert
NK	natural killer
OND	andere neurologische Erkrankungen (engl. other neurological diesease)
PBMCs	mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
	(engl. peripheral blood mononuclear cells)
PBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
РНА	Phytohämagglutinin
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PPMS	primär progrediente Multiple Sklerose
RRMS	schubförmig remittierende Multiple Sklerose in Remission
RRMS/R	schubförmig remittierende Multiple Sklerose im Schub
RT	Raumtemperatur
s.d.	Standardabweichung (engl. standard deviation)
SEM	Standardfehler (engl. standard error of mean)
SPMS	sekundär progrediente Multiple Sklerose
SSC	Seitwärtsstreulicht (engl. sidewardscatter)
T helper	Th
TGF	transforming growth factor
TL	thymus leukemia antigen
TLR	Toll-like-Rezeptor
ТМВ	Tetramethylbenzidin
TNF	Tumornekrosefaktor
TZR	T-Zell-Rezeptor
V	Variable Kette
VLA	very late activating antigen
ZNS	zentrales Nervensystem

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Assoziation der Expression von CD161 und CD8 β auf CD8+ T-Zellen des peripheren	
Blutes.	34
Abbildung 2: IL-17 und IFN-γ Produktion von CD8αα, CD8αβint und CD8αβhoch T-Zellen.	35
Abbildung 3: Expression ausgewählter Oberflächenmarker auf CD8+ T-Zellen des peripheren Blute Abhängigkeit von der CD8β Expression.	s in 37
Abbildung 4: Proliferation von CD8αα und CD8αβhoch T-Zellen nach TZR-Stimulation.	38
Abbildung 5: Expression ausgewählter Oberflächenmarker auf CD8+ MAIT-Zellen des peripheren Blutes.	43
Abbildung 6: IL-17 und IFN-γ Produktion von CD8+ MAIT-Zellen und anderen CD161+/CD161– CD8 T-Zellen.	}+ 44
Abbildung 7: CD161 Expression und IFN-γ/IL-17 Produktion virusspezifischer CD8+ T-Zellen.	45
Abbildung 8: Proliferation von CD8+ MAIT-Zellen nach TZR Stimulation im Vergleich mit anderen CD161+/CD161– CD8+ T-Zellen.	47
Abbildung 9: Frequenz CD161 exprimierender CD8+ T Zellen im peripheren Blut von MS-Patienten und gesunden Individuen.	49
Abbildung 10: Korrelation der Frequenz CD161hochCD8+ T Zellen im peripheren Blut mit dem Alte der Dauer und der Schwere der Erkrankung von MS-Patienten.	er, 50
Abbildung 11: Frequenz CD161 exprimierender CD4+ T Zellen im peripheren Blut von MS-Patiente und gesunden Individuen.	n 51
Abbildung 12: Frequenz CD161 exprimierender CD8+ und CD4+ T Zellen Im Liquor und im periphe Blut von MS-Patienten und Patienten mit anderen neurologischen Erkrankungen.	ren 53
Abbildung 13: Expression der Aktivierungsmarker HLA-DR, CD38 und CD57 auf CD8+ MAIT-Zellen i peripheren Blut von MS-Patienten und gesunden Individuen.	m 55
Abbildung 14: Aktivierung von CD8+ MAIT-Zellen durch IL-18 und IL-12.	57
Abbildung 15: Korrelation der Frequenz CD8+ MAIT-Zellen mit dem IL-18 Serumspiegel bei MS- Patienten.	59
Abbildung 16: IL-7Rα Expression auf CD8+ T-Zellen im peripheren Blut von MS-Patienten und gesunden Individuen.	61
Abbildung 17: IL-17 Produktion durch CD8+ MAIT-Zellen von MS-Patienten und gesunden Individu nach Stimulation mit IL-7 und anti-CD3.	en 62

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: MS-Patienten und gesunde Individuen, von denen Blutproben auf die Frequenz CD161
exprimierender T-Zellen hin untersucht wurden18
Tabelle 2: MS-Patienten und gesunde Individuen, von denen Blutproben für die Analyse der
Expression von Aktivierungsmarkern, IL-18R $lpha$ und IL-7R $lpha$ auf CD8 $^{+}$ MAIT-Zellen und für die
parallele Bestimmung des IL-18 Serumspiegels verwendet wurden
Tabelle 3: MS-Patienten und gesunde Individuen, von denen Blutproben verwendet wurden, um die
IL-17 Produktion durch CD8 * MAIT-Zellen nach IL-7 und TZR-Stimulation zu untersuchen 19
Tabelle 4: MS-Patienten und Patienten mit anderen neurologischen Erkrankungen, von denen Blut-
und Liquorproben auf die Frequenz CD161 exprimierender T-Zellen hin untersucht wurden.
Tabelle 5: Zur Zellisolierung und Zellkultur verwendete Reagenzien. 20
Tabelle 6: Zur Stimulation virusspezifischer CD8 ⁺ T-Zellen verwendete Peptide
Tabelle 7: Zur Durchflusszytometrie verwendete Antikörper. 21
Tabelle 8: Zur Durchflusszytometrie verwendete Isotypkontrollantikörper. 22
Tabelle 9: Sonstige zur Durchflusszytometrie verwendete Reagenzien. 22
Tabelle 10: Puffer und Zellkulturmedien. 23
Tabelle 11: Verbrauchsmaterialen. 23
Tabelle 12: Geräte
Tabelle 13: Software
Tabelle 14: Liste der 50 am stärksten in CD8 $lphalpha$ im Vergleich zu CD8 $lphaeta^{ ext{hoch}}$ T-Zellen hochregulierten
Gene
Tabelle 15: Liste der 50 am stärksten in CD8 $lphalpha$ im Vergleich zu CD8 $lphaeta^{hoch}$ T-Zellen
herunterregulierten Gene 40

Eidesstattliche Versicherung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Hamburg, den 16.05.2013

Anne Willing