

Aus der Klinik und Poliklinik für Neurologie  
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Die Rolle von folliculären T-Helfer-Zellen in unterschiedlichen Modellen der  
experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin  
der Universitätsmedizin  
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von

Adalie Dana Baniahmad  
aus Gießen

Mainz, 2022

Tag der Promotion:

06. Dezember 2022

*Für meine Familie*

Aufgrund der besseren Lesbarkeit wird in der folgenden Arbeit das generische Maskulinum verwendet. Gemeint sind jedoch immer alle Geschlechter, außer es ist explizit darauf hingewiesen.

Die zentralen Aussagen dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Baniahmad A, Birkner K, Görg J, Loos J, Zipp F, Wasser B, Bittner S. *The frequency of follicular T helper cells differs in acute and chronic neuroinflammation*. Sci Rep. 2020;10(1):20485. doi: 10.1038/s41598-020-77588-9.



# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis .....	I
Abbildungsverzeichnis .....	III
Tabellenverzeichnis .....	IV
1 Einleitung und Literaturdiskussion .....	1
1.1 Multiple Sklerose .....	1
1.1.1 Epidemiologie und Symptome .....	1
1.1.2 Das Mausmodell Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis zur Analyse der Multiplen Sklerose .....	4
1.1.3 Pathogenese der MS und EAE .....	5
1.1.4 Therapeutische Ansätze für MS-Patienten .....	8
1.2 Follikuläre T-Helfer-Zellen .....	9
1.2.2 Follikuläre T-Helfer-Zellen in MS und EAE .....	11
2 Ziel der Arbeit .....	13
3 Material und Methoden .....	14
3.1 Material .....	14
3.1.1 Geräte .....	14
3.1.2 Labor- und Verbrauchsartikel .....	15
3.1.3 Chemikalien und Reagenzien .....	16
3.1.4 Kits .....	18
3.1.5 MicroBeads .....	18
3.1.6 Zytokine .....	19
3.1.7 Puffer und Lösungen .....	19
3.1.8 Kulturmedien .....	20
3.1.9 Antikörper .....	20
3.1.10 FACS Antikörper .....	21
3.1.11 Mäuse .....	23
3.1.12 Software .....	23
3.2 Methoden .....	24
3.2.1 Arbeiten mit Zellkulturen .....	24
3.2.2 Manuelles Zählen der Zellen .....	24
3.2.3 Magnetic activated Cell Sorting (MACS) .....	24
3.2.4 FACS Analysen .....	25
3.2.5 Arbeiten mit Mäusen .....	27

3.2.6	T-Helfer-Zellkulturen .....	30
3.2.7	T-Zell Kulturen und Differenzierung .....	31
3.2.8	Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis (EAE) .....	36
3.2.9	Statistische Analysen.....	37
4	Ergebnisse .....	38
4.1	Die Charakterisierung von Tfh Zellen erfolgt in der Durchflusszytometrie als CXCR5 <sup>+</sup> und PD-1 <sup>+</sup> .....	38
4.2	Tfh-Zellen sind in der Dura mater von C57BL/6-Mäusen in der EAE nachweisbar. ....	42
4.3	Der Tfh-Zell-Anteil ist in SJL/J-EAE-Mäusen mit hohem klinischem Symptomwert reduziert.....	47
4.4	Tfh-polarisierte Zellen können mit einer B-Zell Ko-Kultur generiert werden. 51	
4.5	Der Transfer von <i>in vitro</i> kultivierten Tfh-polarisierten Zellen induziert Symptome einer EAE in B6.Rag1 <sup>-/-</sup> Mäusen. ....	53
5	Diskussion .....	57
5.1	Literaturdiskussion.....	64
5.2	Ausblick.....	67
6	Zusammenfassung .....	69
7	Literaturverzeichnis.....	71
8	Anhang.....	80
8.1	Erklärung.....	80
9	Danksagung .....	81

## Abkürzungsverzeichnis

7-AAD	7-Aminoactinomycin D
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
APZ	Antigen-präsentierende Zelle
BHS	Blut-Hirn-Schranke
Ca	Circa
CXCR5	CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 5
DMT	disease modifying therapy
EAE	Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FCS	Fetales Kalbserum
FMO	Fluorescence Minus One
FSC	Forward Scatter
Ggf	Gegebenenfalls
HLA	Humanes Leukozytenantigen
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
IFN $\gamma$	Interferon $\gamma$
KIS	Klinisch isoliertes Syndrom
i.p.	Intraperitoneal
i.v.	Intravenös
MACS	Magnetic Activated Cell Sorting
MFI	Mean Fluorescence Intensity
MHC	Major Histocompatibility Complex
Min	Minute
MM	Mausmedium
MOG	Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein
MS	Multiple Sklerose
MSW	Mittlerer Symptomwert
NEDA	No Evidence of Disease Activity
OKB	Oligoklonale Bande
PFA	Paraformaldehyd
PI	Propidiumjodid
PLP	Proteolipid-Protein
PD-1	Programmed Cell Death Protein 1

PPMS	Primär progrediente Multiple Sklerose
RRMS	Schubförmig remittierende Multiple Sklerose
RT	Raumtemperatur
s.c.	Subkutan
SEM	Standard error of the mean, Standardfehler
SPMS	Sekundär progrediente Multiple Sklerose
SSC	Sideward Scatter
T-B-Grenze	T-Zell- B-Zell-Grenze
T <sub>H</sub> -Zelle	T-Helfer-Zelle
Tfh	Follikuläre T-Helfer-Zellen
TFN $\alpha$	Tumornekrose-Faktor $\alpha$
TnI	Tag nach Immunisierung
TZR	T-Zell-Rezeptor
u.a.	Unter anderem
WM	Waschmedium
WT	Wildtyp
ZNS	Zentrales Nervensystem



## Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1</b>	<i>Schematische Darstellung der verschiedenen Krankheitsverläufe von MS-Patienten</i>
<b>Abbildung 2</b>	<i>Schematische Darstellung der unterschiedlichen Verläufe verschiedener Mausmodelle der EAE</i>
<b>Abbildung 3</b>	<i>Multifaktorielles Modell der Differenzierung von naiven T-Helfer-Zellen innerhalb eines Lymphfollikels zu Keimzentrum-Tfh-Zellen.</i>
<b>Abbildung 4</b>	<i>Gating-Strategie der Tfh-Zellen in der FACS-Analyse.</i>
<b>Abbildung 5</b>	<i>Alle analysierten Tfh-Zellen exprimieren Bcl-6 und IL-21.</i>
<b>Abbildung 6</b>	<i>Verlauf der C57BL/6-EAE und klinischer Symptomwert zu den untersuchten Krankheitsstadien.</i>
<b>Abbildung 7</b>	<i>Prozentualer Tfh-Zell-Anteil in C57BL/6-EAE Mäusen in ZNS und Dura mater mit Korrelation zum klinischen Symptomwert.</i>
<b>Abbildung 8</b>	<i>Tfh-Zell-Anteil in den Peyer'schen Plaques der C57BL/6-EAE mit Korrelation zum klinischen Symptomwert.</i>
<b>Abbildung 9</b>	<i>Verlauf der SJL/J-EAE und klinischer Symptomwert zu den untersuchten Krankheitsstadien.</i>
<b>Abbildung 10</b>	<i>Prozentualer Tfh-Zell-Anteil in SJL/J-EAE Mäusen in ZNS und Dura mater mit Korrelation zum klinischen Symptomwert.</i>
<b>Abbildung 11</b>	<i>Tfh-Zell-Anteil in den Peyer'schen Plaques der SJL/J-EAE mit Korrelation zum klinischen Symptomwert.</i>
<b>Abbildung 12</b>	<i>Vergleich unterschiedlicher Konditionen zur in vitro Differenzierung von Tfh-Zellen.</i>
<b>Abbildung 13</b>	<i>Verlauf der Zelltransfer B6.Rag1<sup>-/-</sup>-EAE und Anteil der Tfh-Zellen in unterschiedlichen Organen.</i>
<b>Abbildung 14</b>	<i>Analyse der Tfh-Dynamik und Zytokinproduktion ex vivo im Vergleich mit der Tfh-polarisierten Zellkultur.</i>

## Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1</b>	<i>Kulturbedingungen der verschiedenen T-Helfer-Zell-Subgruppen</i>
<b>Tabelle 2</b>	<i>Schematische Darstellung der unterschiedlichen Verläufe verschiedener Mausmodelle der EAE</i>
<b>Tabelle 3</b>	<i>Kulturbedingungen Tfh-Zell-polarisierte Kultur</i>
<b>Tabelle 4</b>	<i>FACS-Färbungen der verschiedenen T-Helfer-Zell-Subgruppen</i>
<b>Tabelle 5</b>	<i>Klinische Einschätzung des Krankheitsverlaufs der EAE-Mäuse</i>

# 1 Einleitung und Literaturdiskussion

## 1.1 Multiple Sklerose

### 1.1.1 Epidemiologie und Symptome

Die Multiple Sklerose (MS) ist eine chronische Autoimmunerkrankung, die von entzündlichen Geschehnissen im zentralen Nervensystem (ZNS) und Neurodegeneration gekennzeichnet ist (1). Aktuell leben weltweit ca. 2,8 Millionen Menschen mit der Diagnose MS, die Dunkelziffer wird allerdings höher geschätzt. Die Prävalenz ist in den letzten Jahren in jeder Region weltweit gestiegen, was unter anderem mit früheren und besseren Diagnostikmöglichkeiten sowie einer erhöhten Lebenserwartung von MS Patienten zusammenhängt (2-4). Klinisch manifestiert sich diese Erkrankung typischerweise in der dritten Lebensdekade. Es ist eine der häufigsten Ursachen für Behinderung bei jungen Erwachsenen und trägt somit eine große sozialmedizinische Rolle mit sich (5-7). Neben kognitiven Einschränkungen und frühzeitiger Berentung ist die Lebenserwartung im Durchschnitt um 7-10 Jahre reduziert (8-12). Obwohl MS Patienten eine erhöhte Infektneigung aufweisen, sind es in über 50% die MS-Symptome, die direkt zum Tod führen (4, 13).

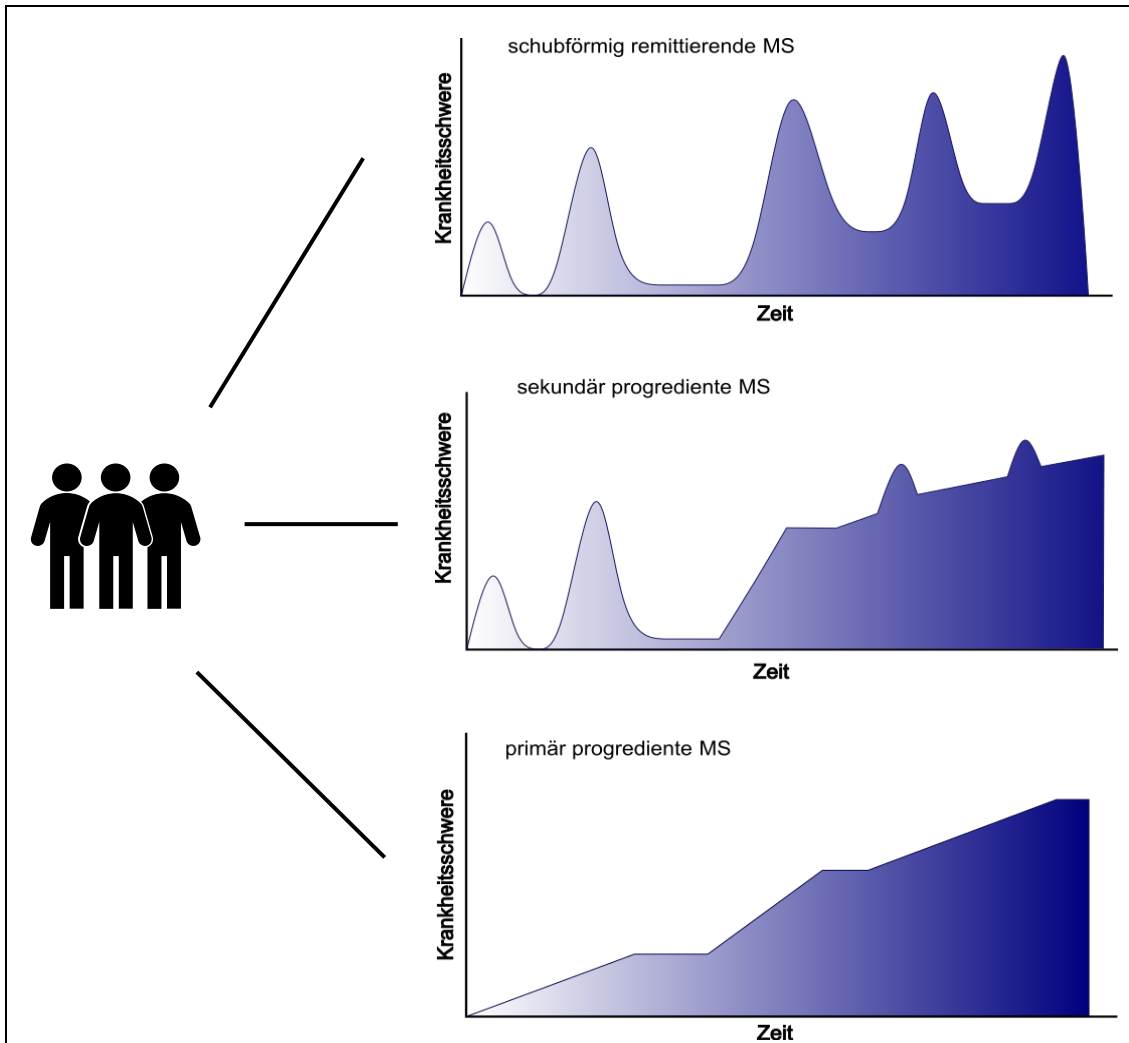
Charakteristisch für diese neurodegenerative Erkrankung sind herdförmige Läsionen im ZNS, die durch Demyelinisierung und axonale Schädigung entstehen. MS manifestiert sich häufig klinisch erstmals durch ein klinisch isoliertes Syndrom (KIS). Hier zeigen die Patienten neuronale Ausfälle, erfüllen aber (noch) nicht alle Diagnosekriterien für MS. Grundsätzlich muss ein KIS nicht zur MS-Diagnose führen, allerdings zählt es als starker Risikofaktor für weitere Ausfälle (14, 15). Je nach Lokalisation und Größe der Entzündungsherde kommt es zu heterogenen Ausprägungen der Krankheitssymptomatik. Neben Muskelschwäche und motorischen Störungen kann es zu Sensibilitätsverlust, Fatigue und, besonders charakteristisch, zu Einschränkungen der Sehfähigkeit bei einer Neuritis *nervi optici* kommen (16).

Auch der Krankheitsverlauf zeigt sich hoch variabel und wird u.a. aus Zwecken der Therapieentscheidung in folgende Subtypen eingeteilt: schubförmig remittierende MS (RRMS), primär progrediente MS (PPMS) und sekundär progrediente MS (SPMS). In über 80% der Fälle wird eine RRMS erstdiagnostiziert, welche durch abwechselnde Exazerbationen und Remissionen der Symptome charakterisiert ist (7, 17). Dabei definiert sich eine Exazerbation oder Schub als neurologischer Ausfall, welcher ohne Fieber oder Zeichen einer Infektion mit einer akuten entzündlichen Demyelinisierung

assoziiert ist und länger als 24 Stunden andauert (18). Dieses Defizit bildet sich anfangs häufig komplett zurück. Je häufiger es zu Schüben kommt, desto wahrscheinlicher sind bleibende Schäden. Ohne Therapie und bei Erschöpfung der neuronalen Reserven kommt es zu einer Akkumulation der geschädigten zentralnervösen Bereiche, sodass keine vollständige Remission erreicht werden kann. Die Hälfte der RRMS-Patienten entwickelt im weiteren Verlauf eine SPMS, die durch eine kontinuierliche Verschlechterung mit oder ohne aufgesetzte Schübe gekennzeichnet ist. Bei der PPMS zeigt sich von Beginn an eine kontinuierliche Progression der Erkrankung (**Abbildung 1**).

Wenngleich die Ursachen für MS noch nicht eindeutig identifiziert sind, wurden bereits einige Faktoren erfasst, die einen Einfluss auf die Pathophysiologie haben und das Risiko an MS zu erkranken, erhöhen. So wurde unter anderem eine genetische Assoziation mit sogenannten Humanen Leukozytenantigenen (HLA), beispielsweise vom Typ HLA-DRB1\*15:01, gefunden (19). Daneben zeigen Studien, dass Frauen im Verhältnis von ca. 3:1 häufiger als Männer von MS betroffen sind und das weibliche Geschlecht als Risikofaktor gilt (20). Zudem erhöhen Rauchen und Adipositas das Risiko, an MS zu erkranken (5). Auch ein niedriger Vitamin-D-Spiegel oder eine verminderte Vitamin-D-Produktion durch zu wenig UVB-Exposition sind mit MS assoziiert, sodass die orale Vitamin-D-Gabe therapeutisch eingesetzt wird (21). Darüber hinaus werden exogene Ursachen diskutiert, wie z.B. eine unbekannt virale Enzephalitis mit starker autoimmuner Reaktion (22). Der bisher stärkste Risikofaktor wurde erst kürzlich identifiziert: eine Infektion mit dem Epstein-Barr-Virus erhöht das Risiko an MS zu erkranken um das 32-fache und wird somit als eine Hauptursache für MS diskutiert (23).

Diese multifaktorielle Genese führt zu einem ebenso komplexen pathophysiologischen Prozess entlang der unterschiedlichen Krankheitsstadien.



**Abbildung 1 Schematische Darstellung der verschiedenen Krankheitsverläufe von MS-Patienten**

Die Krankheitschwere in Abhängigkeit der Zeit zeigt unterschiedliche MS-Verläufe. Der schubförmig-remittierende Verlauf ist gekennzeichnet durch abwechselnde Krankheitsschübe und Remissionen. Hieraus kann sich ein sekundär progredienter Verlauf mit kontinuierlichem Anstieg der Symptomschwere entwickeln. Der primär progrediente Verlauf zeigt von Beginn an einen kontinuierlichen Anstieg.

Zur Diagnose von MS werden die McDonald-Kriterien herangezogen (24). Gewertet werden Anzahl der Schübe, Oligoklonale Banden (OKB) im Liquor und im MRT zu beurteilende demyelinisierende Läsionen. Diese müssen eine zeitliche und/oder räumliche Dissemination aufweisen. Je nach Befund wird so eine frühzeitige Diagnosestellung erlaubt, sodass eine zeitnahe Therapieeinleitung erfolgen kann.

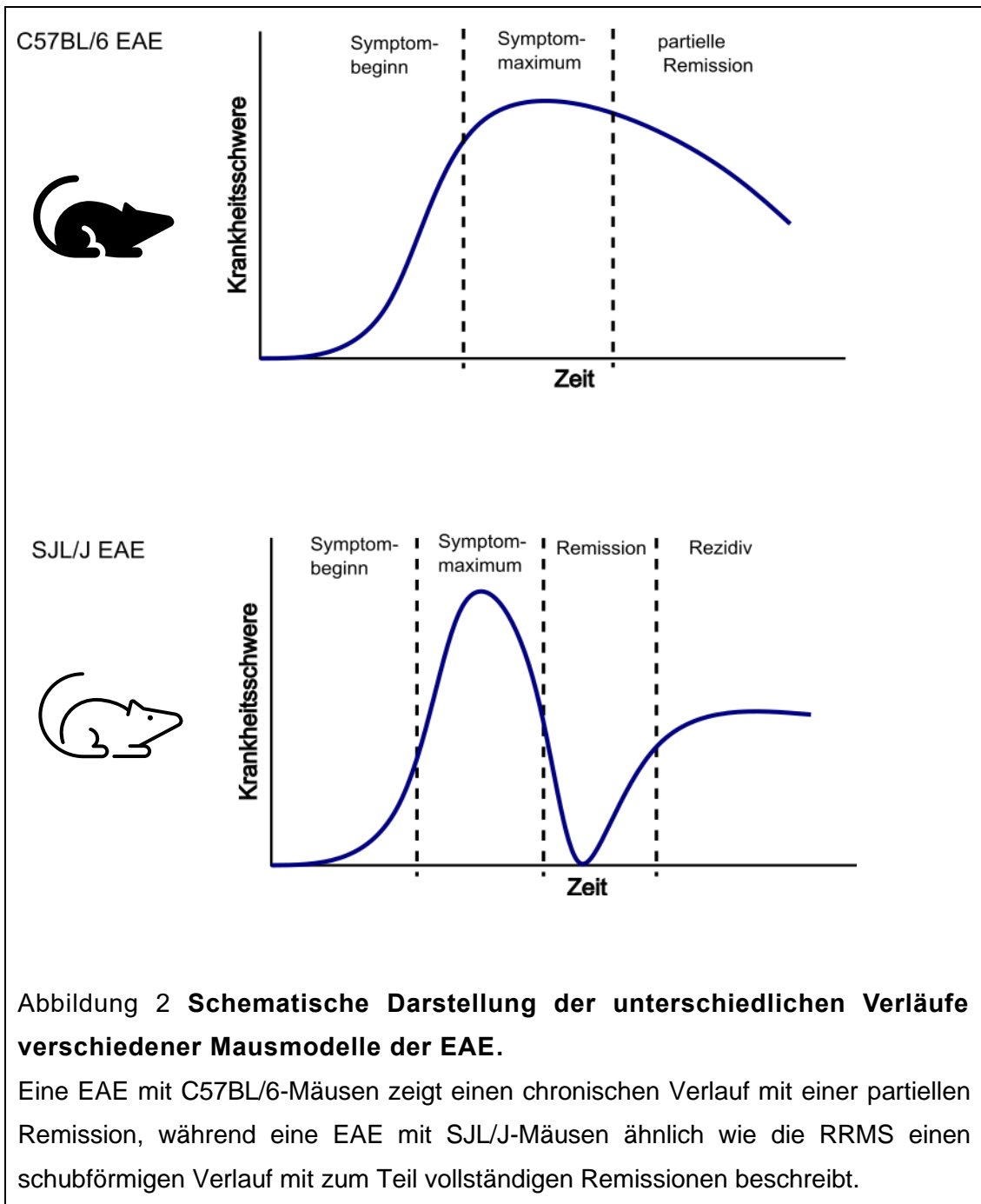
### **1.1.2 Das Mausmodell Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis zur Analyse der Multiplen Sklerose**

Um die pathophysiologischen Mechanismen der Erkrankung und ihren Verlauf zu untersuchen, wurde das Tiermodell der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE) etabliert und weitreichend verwendet (25). Für die Induktion der aktiven EAE werden ZNS-eigene Peptide wie z.B. Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein (MOG) (26) oder Proteolipid-Protein (PLP) (27) subkutan (s.c.) in bestimmte Mausstämme injiziert, welche daraufhin eine T-Zell-Reaktion stimuliert (28). Durch die Injektion des Pertussis-Toxins (des Bakteriums *Bordetella Pertussis*) wird die Permeabilisierung der Blut-Hirn-Schranke (BHS) herbeigeführt, die, ähnlich wie bei MS, peripheren Immunzellen erlaubt in das ZNS Gewebe zu infiltrieren (7). Vor allem proinflammatorische T-Helfer-1-Zellen (Th1) und T-Helfer-17-Zellen (Th17) werden hierbei aktiviert, rekrutieren gewebsschädigende myeloide Zellen und greifen Strukturen im ZNS an, was zu einer Demyelinisierung und axonale Schädigungen führt. Phänotypisch zeigen die Mäuse MS-ähnliche Symptome, welche mithilfe von Symptomwerten (3.2.8.4) operationalisiert und somit analysiert und beurteilt werden können.

Im Rahmen der Induktion einer passiven EAE, auch Zelltransfer-EAE genannt, werden Myelin-spezifische CD4<sup>+</sup> T-Helfer-Zellen direkt injiziert, die dann mit vergleichbarer Pathogenese wie in der aktiven EAE die chronisch-entzündliche Erkrankung hervorrufen.

Ähnlich zu den MS Patienten können auch in EAE Mäusen unterschiedliche Krankheitsverläufe induziert und beobachtet werden. So führt beispielsweise die s.c. MOG<sub>35-55</sub>-Injektion in C57BL/6-Mäusen zu einem chronischen Verlauf, während PLP<sub>139-152</sub> eine schubförmig-remittierende Progression hervorruft (29, 30) (**Abbildung 2**).

Mit Hilfe der Mausmodelle ist es möglich tiefgreifende Erkenntnisse über die Dynamik und Interaktionen von Zellpopulationen im neuroinflammatorischen Verlauf der Erkrankungen sowie mögliche Therapieansätze zu gewinnen.



### 1.1.3 Pathogenese der MS und EAE

Die Krankheitsentwicklung kann in unterschiedliche pathologische Prozesse unterteilt werden: Inflammation, Demyelinisierung, Verlust von Axonen und Narbenbildung (Gliose). Das pathologische Korrelat für einen akuten Schub ist die Inflammationsreaktion und darauffolgende Demyelinisierung. Sowohl bei MS als auch in der EAE werden autoaggressive periphere Immunzellen in zentralnervösem Gewebe gefunden, welche zu den im MRT und in der histologischen Aufbereitung nachweislichen Läsionen in der grauen und weißen Substanz führen (1, 31, 32). Charakteristisch ist zudem eine Störung der BHS, welche die Immigration der

verschiedenen autoimmunen Zelllinien ermöglicht. Die Ursache der Autoreaktion und Infiltration dieser Zellen bleibt allerdings nach wie vor unbekannt und wird daher intensiv erforscht. Eine Theorie besagt, dass eine periphere Aktivierung der T-Helfer-Zellen auf einer molekularen Mimikry basiert (33-35). Dem zufolge wird diesen Zellen ein fremdes Antigen präsentiert, welches einem eigenen Protein ähnelt und somit zur autoimmunen Reaktion führt. Die Immigration und Aktivität der autoreaktiven T-Zellen durch die gestörte BHS führt zu einem Untergang von zentralnervösem Gewebe und somit, abhängig von der Infiltrations- und Demyelinisierungslokation, zu den heterogenen klinischen Symptomen.

Das pathologische Korrelat für die bleibenden neurologischen Ausfälle und einen progressiven Verlauf ist der Schaden oder Verlust von Axonen (36). Postinflammatorisch folgt die Gliose als Reaktion der Astrozyten auf geschädigtes Gewebe im ZNS (37). Zu einem gewissen Grad kommt es zu einer Regeneration des Gewebes und Remyelinisierung, welche aber langfristig zur vollständigen Erholung unzureichend ist (38).

Aufgrund einer großen Heterogenität können die Läsionen von MS Patienten histologisch in vier immunologische Muster, sogenannte *Patterns*, eingeteilt werden (39, 40). *Pattern I* zeigt sich reich an T-Lymphozyten, Makrophagen und Mikroglia mit vollständigem Verlust der Myelinkomponenten. *Pattern II* unterscheidet sich von *Pattern I* nur durch die Anwesenheit von Immunglobulinen (Ig) und Komplementaktivierung. Typisch für eine *Pattern III*- Läsion ist die Apoptose von Oligodendrozyten und einem nur partiellen Verlust der Myelinkomponente. Das seltene *Pattern IV* ist charakterisiert durch einen nicht-apoptotischen Untergang von Oligodendrozyten.

Insgesamt wird von einer Beteiligung und Interaktion verschiedener Zelllinien ausgegangen, wie beispielsweise Makrophagen und Gliazellen, Endothelzellen und Lymphozyten (5, 7, 41), wobei im Folgenden der Fokus auf T- und B-Lymphozyten gesetzt wird.

### **1.1.3.1 Die Rolle von B-Lymphozyten in der MS**

Bereits in frühen Phasen der Erkrankung können CD4<sup>+</sup> T-Helfer-Zellen im zentralnervösen Gewebe nachgewiesen werden (40). Vor allem IFN $\gamma$ -produzierende Th1-Zellen und IL-17-produzierende Th17-Zellen werden zu den proinflammatorischen und somit entzündungstreibenden T-Helfer-Zellen gezählt (42-45). Die Produktion von Zytokinen aktiviert Makrophagen und Mikroglia, welches durch weitere entzündungsfördernde Kaskaden zu Demyelinisierung und axonaler Schädigung führen (46-48). Eine Verschiebung der T-Helfer-Zell-Differenzierung auf



die antiinflammatorischen Th2- und regulatorischen T-Helfer-Zellen (Treg) wird bereits therapeutisch erfolgreich eingesetzt. Hier zu nennen sind Dimethylfumarat (49), IFN $\beta$  (50) und Glatirameracetat (51).

Auch wenn der Fokus über Jahre auf der CD4<sup>+</sup> T-Helfer-Zell-vermittelten Pathogenese der MS und EAE lag, beschreiben nun viele Studien auch eine Beteiligung von B-Zellen. Hier konnten mit der Depletierung von B-Zellen klinisch therapeutische Erfolge erzielt werden, wie z.B. mit Ocrelizumab (52) oder Rituximab (53).

Dass eine Epstein-Barr-Virus-Infektion kürzlich als Hauptrisikofaktor für eine MS-Erkrankung identifiziert worden ist, gibt einen weiteren Hinweis auf eine B-Zell-Beteiligung in der MS-Pathogenese, da das Virus primär B-Zellen befällt und dort auch langfristig persistiert (23, 54).

Wie oben beschrieben können MS-Läsionen in Muster eingeteilt werden. Hierbei zeigen *Pattern II*-Läsionen eine antikörpervermittelte Komponente und suggerieren somit mindestens bei einer Subgruppe von Patienten einen pathophysiologischen B-Zell-Einfluss (55).

Weiterhin wurde gezeigt, dass sich im Rahmen der Neuroinflammation und Infiltration von Immunzellen lymphfollikelähnliche Strukturen bilden können, die als ektope lymphoide Struktur bezeichnet werden (ELS). Diese bestehen aus einem B-Zell-Kern mit einem umgebenden T-Zell-Saum. Wie in einem Keimzentrum von sekundär-lymphatischen Organen können B-Zellen sich hier zu Plasmazellen differenzieren, Antikörper produzieren und sind somit Teil einer aktiven immunologischen Reaktion. Studien zeigen, dass es vor allem bei SPMS-Patienten zur Bildung von ELS kommt, und diese sich besonders im Bereich der Meningen häufen (56, 57). Das Vorkommen von ELS scheint mit kortikalem Schaden und meningealer Inflammation assoziiert zu sein und korreliert mit einem schnelleren und schwereren Krankheitsverlauf (56, 58). Folglich suggeriert die Präsenz von ELS eine B-Zell-Beteiligung in der Neuroinflammation von MS Patienten.

Aufgrund der vielfältigen Funktionen, die B-Zellen im Immunsystem einnehmen, können diese auf verschiedene Arten zur Krankheitsgenese beitragen. Zum einen wird die humorale Beteiligung durch Antikörperproduktion diskutiert. Erste Hinweise hierfür sind die zu Diagnostik eingesetzten Oligoklonale Banden (OKB), die auf antikörpersezernierende Zellen im Liquor von MS-Patienten hinweisen (59). Auch eine antikörperreinigende Plasmapherese kann bei einer Patientensubgruppe therapeutisch eingesetzt werden (60). Allerdings kann dem entgegengesetzt werden, dass die antikörperproduzierenden Plasmazellen nicht CD20 exprimieren und somit unbeeinflusst von der Therapie mit den Anti-CD20 Antikörpern Ocrelizumab und

Rituximab bleiben. So sind die Antikörperspiegel auch nach B-Zell Depletion nicht unmittelbar reduziert (53, 61).

Zum anderen ist neben der Antikörperproduktion auch die Zytokinproduktion der B-Zellen von pathophysiologischer Bedeutung. Bei MS Patienten ist die Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen, wie IL-6 (62) und GM-CSF (63) erhöht und die der antiinflammatorischen Zytokinen, wie z.B. IL-10 reduziert (64).

Nicht zuletzt nehmen B-Zellen eine Rolle als antigenpräsentierende Zellen ein. Der auf der Oberfläche exprimierte *Major Histocompatibility Complex* (MHC) Typ II ist hierbei in der Interaktion mit T-Zellen und somit in der ZNS-Autoimmunität von großer Relevanz (65). Phagozytierte und intrazellulär prozessierte Proteine werden über MHC II präsentiert und interagieren mit dem T-Zell-Rezeptor der CD4<sup>+</sup> T-Zellen. Der darauffolgende Signalweg führt zu einer Aufrechterhaltung und Verstärkung immunologischer T-Zell-vermittelter Prozesse und, im Falle der MS, zu einer vermehrten autoimmunen Antwort (66, 67).

#### **1.1.4 Therapeutische Ansätze für MS-Patienten**

Obwohl MS aktuell als eine nicht heilbare Erkrankung zählt, scheinen die Krankheitsverläufe in den letzten Jahren milder zu sein und mit einer geringeren Mortalität einherzugehen. Neben intensiver Forschung und sensitiveren Diagnosekriterien gibt es mittlerweile eine breite Auswahl an Medikamenten, die eingesetzt werden können, um den Progress der Erkrankung zu verlangsamen (68, 69). Bei der Behandlung kann zwischen der akuten Schubtherapie, der verlaufsmodifizierenden Therapie (*disease modifying therapy*, DMT) und der symptomorientierten Therapie unterschieden werden.

Bei einer akuten Schubsymptomatik wird mittels hochdosierter Glucocorticoide zeitnah eingegriffen, um die unmittelbar überschießende Immunsystemreaktion zu unterbinden und somit eine schnelle Remission der Symptome zu erreichen. Alternativ kann eine Plasmaseparation angewendet werden (70-72).

Zur langfristigen Symptomkontrolle wird eine verlaufsmodifizierende Therapie eingesetzt. Unter dem Konzept NEDA („*No evidence of disease activity*“) wird versucht, den Krankheitsverlauf so zu modifizieren, dass die Krankheitsaktivität langfristig unterdrückt und Schübe oder Krankheitsprogression verhindert werden (73). Angewendet wird ein Stufenschema, das an die jeweilige MS-Form und den Krankheitsverlauf angepasst wird. Zur Verfügung stehen Medikamente, die durch unterschiedliche Angriffspunkte die Immunantwort modulieren oder teilweise oder komplett supprimieren (5, 41, 70, 74).

Darüber hinaus stellt die symptomorientierte Therapie einen ebenso wichtigen Bestandteil der Therapie dar. Der Fokus liegt hierbei auf dem Behandeln und Lindern von persistierenden Symptomen und somit der Besserung der Lebensqualität. Zu diesem multimodalem Behandlungskonzept gehören u.a. Therapieansätze mittels Physiotherapie, adäquate Schmerztherapie und Logopädie (70, 75, 76).

Trotz der umfangreichen Mittel und Ansätze gilt die Therapie als Progressverlangsamend, jedoch nicht als vollständig heilend (77, 78). Insbesondere für die progressiven MS-Formen sind die aktuellen Behandlungsmöglichkeiten begrenzt, da viele für die RRMS etablierte Medikamente hier keinen Benefit zeigten (79). Darüber hinaus geht die medikamentöse MS-Behandlung mit zum Teil nicht unerheblichen Nebenwirkungen einher, sodass die weitere Forschung in diesem Gebiet von größter Bedeutung ist (5, 80).

## 1.2 Follikuläre T-Helfer-Zellen

### 1.2.1.1 Differenzierung und Funktion

Im Rahmen der erweiterten Forschung von B-Zellen in Bezug auf die MS-Pathogenese rückt auch eine noch nicht so ausführlich erforschte T-Zell-Subgruppe in den Fokus der Forschung: die folliculären T-Helfer-Zellen (Tfh). In den Jahren 2000 und 2001 wurden in humanen Tonsillen eine Gruppe an CD4<sup>+</sup> T-Helfer-Zellen beschrieben, die den Chemokinrezeptor CXCR5 (CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 5) exprimierten und sich innerhalb eines B-Zell-Follikels befanden. Dort konnte eine Interaktion mit B-Zellen beobachtet werden, was zu einer Förderung der Immunglobulinproduktion und die Bildung von Keimzentren in folliculären Strukturen führte (81-83). Erst durch die Identifizierung des Haupttranskriptionsfaktors Bcl-6 wurden die Tfh-Zellen als eigene Untergruppe von T-Zellen anerkannt (84-87). Die Differenzierung von naiven T-Helfer-Zellen zu Tfh-Zellen ist noch nicht vollständig ergründet und verstanden. Es gibt einige Ansätze und Modelle, wobei Crotty *et al.* ein mehrstufiges und multifaktorielles Modell der Differenzierung vorschlägt („*multistage, multifactorial model of TFH differentiation*“ (88)). Da sich diese Arbeit mit dem Mausmodell der MS befasst, sind im Weiteren die wichtigsten Schritte der Differenzierung von murinen Tfh-Zellen zusammengefasst beschrieben (88-90) **(Abbildung 3)**.

In der initialen Phase ist eine erste Stimulation von einer antigenpräsentierenden dendritischen Zelle über den T-Zell-Rezeptor notwendig. Im Zusammenspiel mit einigen weiteren Faktoren wie IL-6 und IL-21, verliert die naive T-Helfer-Zelle den T-Zell-*Homing*-Chemokinrezeptor CCR7 und der Transkriptionsfaktor Bcl-6 wird

hochreguliert. Dies ermöglicht unter anderem die Expression von CXCR5, dem B-Zell-*Homing*-Chemokinrezeptor. Hierdurch wird die Migration zur T-Zell-B-Zell-Grenze der Follikel ermöglicht, wo es dann, unter anderem wieder über den T-Zell-Rezeptor, zu einer weiteren Stimulation durch B-Zellen kommt. Diese erneute Stimulation sorgt mittels einer starken Hochregulierung von Bcl-6 und CXCR5 für eine Aufrechterhaltung des Phänotyps der Tfh-Zellen. Im nächsten Schritt reifen die Tfh-Zellen zu Keimzentrum-Tfh-Zellen heran, welche sich im Keimzentrum der B-Zell-Follikel aufhalten und durch eine noch wesentlich höhere Expression beider Marker erkennbar sind. Hier spielen sie eine wichtige Rolle in der Entwicklung und Funktion der B-Zellen im Keimzentrum.

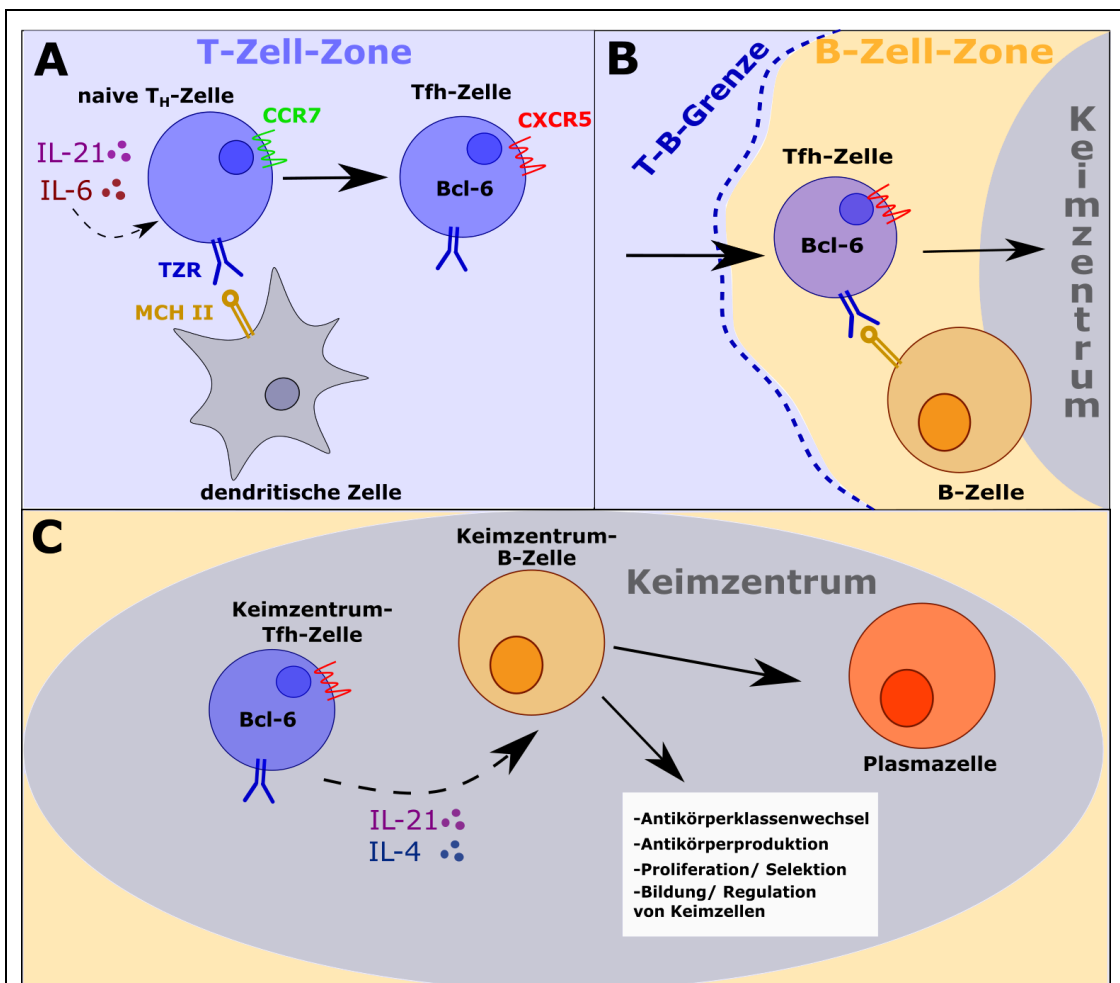


Abbildung 3 **Multifaktorielles Modell der Differenzierung von naiven T-Helfer-Zellen innerhalb eines Lymphfollikels zu Keimzentrum-Tfh-Zellen.**

(A) Naive T-Helfer-Zellen ( $T_H$ -Zellen) werden über den T-Zell-Rezeptor (TZR) und in Anwesenheit von IL-6 und IL-21 durch dendritische Zellen stimuliert. Hierdurch wird CCR7 herunterreguliert und Bcl-6 und CXCR5 hochreguliert. (B) Die Tfh-Zelle wandert mit Hilfe von CXCR5 über die T-Zell-B-Zell Grenze (T-B-Grenze) und

interagiert in der B-Zell-Zone mit B-Zellen. Danach erfolgt die Einwanderung in das Keimzentrum. **(C)** Hier entdifferenziert sich die Tfh-Zelle durch weitere Interaktionen mit B-Zellen zur Keimzentrum-Tfh-Zelle und unterstützt durch Ausschüttung von u.a. IL-21 und IL-4 die Aktivität von B-Zellen sowie Differenzierung zu Plasmazellen.

Die Beziehung von Tfh-Zellen und B-Zellen beruht auf einer gegenseitigen Abhängigkeit. Während Tfh-Zellen zur Differenzierung die Aktivierung durch B-Zellen benötigen, wird die Funktion und Aktivität von B-Zellen maßgeblich durch Tfh-Zellen unterstützt. Diese Rückkopplungsschleife ist von großer Wichtigkeit für die Regulation der Immunität.

Über die Ausschüttung von IL-21 unterstützen Tfh-Zellen die B-Zell-Proliferation und Differenzierung im Keimzentrum und außerhalb des Follikels (91).

Schon sehr früh wurde IL-4, welches auch von Tfh-Zellen produziert wird, als „B-Zell-Stimulationsfaktor“ bezeichnet. Neben einer erhöhten Antikörperproduktion soll es auch die Expression von MHC-Molekülen verstärken (92-94).

Neben Zytokinen können Tfh-Zellen auch über Rezeptoren wie CD40L und den T-Zell-Rezeptor wichtige Signale zur Interaktion mit B-Zellen bereitstellen (88).

Tfh-Zellen regulieren unter anderem die Größe der Keimzentren und fördern die Selektion von B-Zellen mit hoher Affinität (90).

Insgesamt ist die Interaktion zwischen Tfh-Zellen und B-Zellen essenziell für das humorale Immunsystem und somit entscheidend in der Pathogenese für Autoimmunerkrankungen.

### **1.2.2 Follikuläre T-Helfer-Zellen in MS und EAE**

Bereits in einigen anderen Autoimmunerkrankungen konnte ein Einfluss von Tfh-Zellen auf den Krankheitsprozess beschrieben werden. Eine exzessive Tfh-Zell-Antwort führt in bestimmten Mauslinien zur Lupus erythematodes-ähnlichen Phänotypausbildung. Zusätzlich wurden in Lupus-Nephritis-Läsionen eine Aggregation von Tfh-Zellen beobachtet (95), sodass eine wichtige entzündungsfördernde Beteiligung angenommen wird. In denselben Mäusen konnte gezeigt werden, dass eine chronische Dysregulation von Tfh-Zellen in den Lymphknoten von Speicheldrüsen ursächlich für die Induktion eines Sjögren Syndrom sein kann (96). Darüber hinaus weisen Patienten mit rheumatoider Arthritis einen erhöhten Anteil von zirkulierenden Tfh-Zellen auf (97). Daher kann den Tfh-Zellen insgesamt eine proinflammatorische Rolle in autoimmunen Erkrankungen zugesprochen werden.

Im Zusammenspiel mit der oben beschriebenen B-Zell-Beteiligung in der Pathogenese der MS und dem Einfluss, den Tfh-Zellen auf B-Zellen ausüben, liegt eine Einflussnahme von Tfh-Zellen im Krankheitsprogress der MS und EAE nahe.

Viele Studien über Tfh-Zellen in MS-Patienten liegen aktuell noch nicht vor. Es wurde gezeigt, dass MS-Patienten eine Erhöhung der Tfh-Zellen im Blut vorwiesen und dies mit dem Krankheitsverlauf positiv korrelierte (98). Auch im zerebrospinalen Liquor von MS Patienten wurde eine Anreicherung von Tfh-Zellen und B-Zellen beobachtet (99). Ohne explizit Tfh-Zellen zu untersuchen, wurden einige Untersuchungen von Markern, die mit Tfh-Zellen assoziiert sind, ausgeführt. So wurde eine erhöhte Expression von IL-21 und vom IL-21-Rezeptor in Patienten mit progredienter MS gefunden (98). Die IL-21-Expression von infiltrierenden T-Helfer-Zellen in aktiven ZNS-Läsionen war im Vergleich zu inaktiven ZNS-Läsionen verstärkt (100).

Aufgrund der korrelierenden Daten von Tfh-Zellen in MS-Patienten, wird den Tfh-Zellen eine Förderung der MS-Pathogenese zugesprochen. Deshalb rückte die Untersuchung von Tfh-Zellen im Mausmodell der EAE in den Fokus, um die Rolle von Tfh-Zellen in der Neuroinflammation besser verstehen zu können.

Im Jahr 2011 demonstrierten Peters *et al.* die Entwicklung von ELS in einer Th17-induzierten EAE. Die transferierten Th17 Zellen entwickelten zudem Charakteristika von Tfh Zellen (101), was einen ersten Hinweis auf eine Beteiligung von Tfh-Zellen in der EAE-Pathogenese gab.

Weitere Forschungen ergaben, dass die Anzahl infiltrierender Tfh-Zellen mit der Anzahl infiltrierender B-Zellen im Symptommaximum einer Th17-EAE korreliert. Eine Immunisierung von C57BL/6 Mäusen mit kultivierten Tfh-Zellen zeigte, dass diese Zellpopulation selbst keine EAE-Symptome induziert (102). In einem anderen Modell mit MOG<sub>33-55</sub>-immunisierten Mäusen wurde ein erschwerter EAE-Verlauf ohne Erreichen einer Remission nach der Transferierung von aus immunisierten Mäusen isolierten Tfh-Zellen beobachtet. Eine Ko-Transferierung mit B-Zellen zeigte einen noch schwereren Verlauf, welches als Zeichen auf eine Zusammenarbeit von Tfh-Zellen und B-Zellen in der Pathogenese der EAE gewertet wurde (103).

Weiterhin wurde gezeigt, dass Mäuse, die keine Tfh-Zellen besitzen, einen weniger ernsten Krankheitsverlauf vorwiesen (99).

Insgesamt zeigen die korrelativen Daten mehrerer Arbeitsgruppen als Gemeinsamkeit eine Anreicherung von Tfh-Zellen im ZNS bei Entzündung. In den untersuchten Mausmodellen wird den Tfh-Zellen eine eher proinflammatorische, B-Zellen-unterstützende Rolle zugesprochen.

## 2 Ziel der Arbeit

Nachdem B-Zellen eine Beteiligung in der Pathogenese von MS zugesprochen wurde, liegt die Vermutung nahe, dass auch Tfh-Zellen in ihrer B-Zell-unterstützenden Funktion eine bedeutende Rolle in der Neuroinflammation innehaben können.

Jüngste Forschung ergaben bereits erste Hinweise, dass sich Tfh-Zellen in C57BL/6-Mäusen mit einer EAE in der akut-inflammatorischen Phase im ZNS anreichern (103, 104). Die genaue Dynamik und Verteilung von Tfh-Zellen in verschiedenen Geweben blieben jedoch weiterhin unerforscht. Im Rahmen dieser Dissertation wurden drei verschiedene Mausmodellssysteme genutzt, die jeweils einen Teilaspekt der MS repräsentieren. Ziel war es, mit diesen verschiedenen Mausmodellssystemen Erkenntnisse zur Tfh-Zell-Dynamik in den unterschiedlichen EAE-Verläufen und ausgewählten immunologischen Kompartimenten zu gewinnen. Auch sollten erste Einblicke in die B-Zell-unabhängige Eigenaktivität und zur Plastizität des Phänotyps von Tfh-Zellen *in vivo* erhalten werden.

Da eine EAE mit C57BL/6 Mäusen einen chronisch-entzündlichen Verlauf mimt, wurde in dieser Arbeit zudem das schubförmig remittierende SJL/J- EAE-Maus-Modellsystem analysiert und verglichen.

Da der Fund von B-Zell-Follikeln in den Meningen von MS-Patienten und auch von EAE Mäusen beschrieben worden ist (56, 57), wurde in den Versuchen zwischen dem ZNS (Gehirn und Rückenmark) und der äußeren Hirnhaut, der Dura mater, unterschieden.

In der Literatur wurde zuvor gezeigt, dass das Mikrobiom im Darm eine Rolle in der Pathogenese der MS und EAE spielt (105). Um nun einen möglichen Einfluss von Tfh-Zellen der Peyer'schen Plaques auf den Progress der EAE zu untersuchen, wurden im Rahmen dieser Dissertation die im Intestinum gelegenen Peyer'schen Plaques als peripheres Vergleichsorgan gewählt.

Zur Untersuchung der B-Zell-unabhängigen Eigenaktivität von Tfh-Zellen wurden eine *in vitro* Tfh-polarisierte Zellkultur etabliert und in B6.Rag1<sup>-/-</sup>-Mäuse injiziert. Aufgrund genetischer Veränderungen besitzen diese keine reifen B- und T-Lymphozyten (106), sodass eine intrinsische T-Zell-Aktivität, sowie eine Wirkung der Tfh-polarisierten Zellen über die B-Zell-Aktivierung ausgeschlossen werden kann. Neben der Eigenaktivität stand auch die Stabilität bzw. Plastizität des Phänotyps von Tfh-Zellen *in vivo* im Verlauf einer EAE im Fokus der Experimente.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Geräte

<b>Gerät</b>	<b>Hersteller</b>
<b>Analoger Vortex Mixer</b>	VWR International GmbH, Darmstadt (Deutschland)
<b>Autoklave Heraeus</b>	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
<b>BD FACS Canto II</b>	BD Bioscience, Franklin Lakes (USA)
<b>Eppendorf "Research Adjustable-volume" Pipetten</b>	Eppendorf GmbH, Wesseling-Berzdorf (Deutschland)
<b>Gamma-Irradiator Gammacell 2000</b>	Mølsgaard Medical, Risø (Dänemark)
<b>Gefrierschrank (Sanyo)</b>	EWALD Innovationstechnik GmbH, Rodenberg (Deutschland)
<b>Kühl- und Gefrierschrank</b>	Liebherr, Bulle (Schweiz)
<b>MidiMACS und QuadroMACS Separatoren</b>	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach (Deutschland)
<b>Neubauer Zellzählkammer</b>	Brand, Wertheim (Deutschland)
<b>Operationsinstrumente</b>	Fine Science Tools Inc., Heidelberg (Deutschland)
<b>Pipetus®</b>	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co.KG, Eberstadt (Deutschland)
<b>Schüttelplattform</b>	Edmund Bühler GmbH, Hechingen (Deutschland)
<b>Wasserbad Aqualine AL18</b>	Lauda GmbH & CO. KG, Lauda-Königshofen (Deutschland)
<b>Werkbank "Horizontal Laminar Flow Hood Heraguard"</b>	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)



<b>Zellkultur Inkubator</b>	Binder GmbH, Tuttlingen (Deutschland)
<b>Zellkultur Lichtmikroskop</b>	Hund, Wetzlar (Deutschland)
<b>Zentrifuge Heraeus Fresco 21</b>	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
<b>Zentrifuge Multifuge Heraeus XIR</b>	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)

### 3.1.2 Labor- und Verbrauchsartikel

<b>Produkt</b>	<b>Hersteller</b>
<b>Eppendorf Röhrchen 1,5 ml + 2 ml</b>	Eppendorf GmbH, Wesseling-Berzdorf (Deutschland)
<b>Falcon™ Zentrifugenröhrchen, Polypropylen (PP), 15 ml + 50 ml</b>	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen (Deutschland)
<b>Injektionsnadeln 20 G + 27 G</b>	BD Microlance, Gateshead (UK)
<b>MACS LS Säulen</b>	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach (Deutschland)
<b>Mikrotiterplatte, 24-Well, 48-Well, 96-Well</b>	BD Bioscience, Franklin Lakes (USA)
<b>Pipettenspitzen 10 Öl, 200 Öl, 1000 Öl</b>	VWR International GmbH, Darmstadt (Deutschland)
<b>Pipettenspitzen mit Filtern 10 Öl, 200 Öl, 1000 Öl</b>	Starlab, Hamburg (Deutschland)
<b>Polystyrol Teströhrchen mit Rundboden 5 ml (FACS Röhrchen)</b>	BD Bioscience, Franklin Lakes (USA)
<b>Pr�-Separationsfilter, 30 �m</b>	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach (Deutschland)
<b>Serologische Pipetten, Polystyrol, 5 ml + 10 ml + 25 ml</b>	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen (Deutschland)
<b>Skalpelle</b>	B. Braun AG, Melsungen (Deutschland)

<b>Spritzen, 1 ml + 2 ml + 30 ml</b>	B. Braun AG, Melsungen (Deutschland)
<b>Zellkulturschale, Polystyrol, Ø = 100 mm</b>	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen (Deutschland)
<b>Zellsieb, Nylon, 100 µm</b>	BD Bioscience, Franklin Lakes (USA)

### 3.1.3 Chemikalien und Reagenzien

<b>Chemikalien und Reagenzien</b>	<b>Hersteller</b>
<b>7-AAD (7-Aminoactinomycin) “Viability- Staining-Solution”</b>	BioLegend, San Diego (USA)
<b>Albumin, bovin, (BSA)</b>	Serva Electrophoresis, Heidelberg (Deutschland)
<b>Ammoniumchlorid (NH<sub>4</sub>Cl)</b>	Sigma-Aldrich Corp., St Louis (USA)
<b>Aqua bi. destilliertes Wasser steril</b>	B. Braun AG, Melsungen (Deutschland)
<b>Brefeldin A</b>	Sigma-Aldrich Corp., St Louis (USA)
<b>D-Glucose</b>	Carl Roth GmbH, Karlsruhe (Deutschland)
<b>Dispase</b>	R&D Systems, Inc., Minneapolis (USA)
<b>DNase I</b>	F. Hoffmann-La Roche AG, Basel (Schweiz)
<b>Dulbeccos PBS mit Ca<sup>2+</sup> und Mg<sup>2+</sup> (PBS)</b>	Gentaur, Kampenhout (Belgien)
<b>Dulbeccos PBS ohne Ca<sup>2+</sup> und Mg<sup>2+</sup> (PBS)</b>	Gentaur, Kampenhout (Belgien)
<b>EDTA Dinatriumsalz (Na<sub>2</sub>EDTA) Lösung (0.5 M)</b>	Sigma-Aldrich Corp., St Louis (USA)
<b>Ethanol 100 % (v/v) (EtOH)</b>	AppliChem GmbH, Darmstadt (Deutschland)

<b>Ethanol 70 % (v/v) (EtOH)</b>	AppliChem GmbH, Darmstadt (Deutschland)
<b>Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)</b>	Carl Roth GmbH, Karlsruhe (Deutschland)
<b>Fetales Bovin Serum, hitzeinaktiviert (FBS)(FCS)</b>	Biochrom AG, Berlin (Deutschland)
<b>HEPES</b>	Life Technologies Corp., Grand Island (USA)
<b>IMDM</b>	Life Technologies Corp., Grand Island (USA)
<b>Isofluran</b>	Abbot, Wiesbaden (Deutschland)
<b>Ketamin</b>	Hameln Pharma Plus GmbH, Hameln (Deutschland)
<b>Kollagenase</b>	R&D Systems, Inc., Minneapolis (USA)
<b>Kollagenase VIII</b>	F. Hoffmann-La Roche AG, Basel (Schweiz)
<b>L-Glutamin (200 mM)</b>	Sigma-Aldrich Corp., St Louis (USA)
<b>Lipopolysaccharid (LPS)</b>	Enzo Life Sciences GmbH, Lörrach (Deutschland)
<b>NaCl Lösung 0,9 %</b>	B. Braun AG, Melsungen (Deutschland)
<b>Paraformaldehyd (PFA)</b>	Carl Roth GmbH, Karlsruhe (Deutschland)
<b>Penicillin / Streptomycin (P/S) (10.000 Einheiten Penicillin und 10 mg Streptomycin pro ml)</b>	Sigma-Aldrich Corp., St Louis (USA)
<b>Percoll®</b>	Sigma-Aldrich Corp., St Louis (USA)
<b>Propidiumiodid (PI)</b>	Sigma-Aldrich Corp., St Louis (USA)
<b>Rompun 2 % Injektionslösung (Xylazin)</b>	Bayer Health Care, Leverkusen
<b>RPMI 1640</b>	Life Technologies Corp., Grand Island (USA)

<b>Saponin</b>	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe (Deutschland)
<b>Trypanblau</b>	Sigma-Aldrich Corp., St Louis (USA)
<b>β-Mercaptoethanol</b>	Sigma-Aldrich Corp., St Louis (USA)

### 3.1.4 Kits

<b>Kit</b>	<b>Hersteller</b>
<b>CD4 T-Zell Isolationskit</b>	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach (Deutschland)
<b>CD45R (B220) B-Zell Isolationskit</b>	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach (Deutschland)
<b>Hooke Kit™ MOG<sub>35-55</sub>/CFA Emulsion + PTX</b>	Hooke Laboratories, Inc. Lawrence (USA)
<b>Hooke Kit™ PLP<sub>139-151</sub>/CFA Emulsion + PTX</b>	Hooke Laboratories, Inc. Lawrence (USA)

### 3.1.5 MicroBeads

<b>MicroBeads</b>	<b>Isotyp</b>	<b>Hersteller</b>
<b>CD45R (B220) MicroBeads</b>	rat-α-mouse monoclonal IgG2a	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach (Deutschland)
<b>CD62L MicroBeads</b>	rat-α-mouse monoclonal IgG2a	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach (Deutschland)
<b>CD8a (Ly-2) MicroBeads</b>	mouse-α-mouse monoclonal IgG2a	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach (Deutschland)
<b>CD90.2 MicroBeads</b>	rat-α-mouse monoclonal IgG2b	Miltenyi Biotec GmbH,

		Bergisch Gladbach (Deutschland)
--	--	------------------------------------

### 3.1.6 Zytokine

Zytokine	Hersteller
huTGF- $\beta$	R&D Systems, Inc., Minneapolis (USA)
IL-12	R&D Systems, Inc., Minneapolis (USA)
IL-18	MBL International Corporation, Woburn (UK)
IL-2	R&D Systems, Inc., Minneapolis (USA)
IL-21	BioLegend, San Diego (USA)
IL-23	R&D Systems, Inc., Minneapolis (USA)
IL-4	R&D Systems, Inc., Minneapolis (USA)
IL-6	R&D Systems, Inc., Minneapolis (USA)

### 3.1.7 Puffer und Lösungen

Puffer/Lösungen	Zusammensetzung
Anästhetikum	20 ml 50 mg/ml Ketamin 2,5 ml 2% Rompun in 77,5 mL 0,9 % NaCl Lösung
FACS Puffer	0,5 % BSA in PBS
Lyse Puffer	8,29 g/l NH <sub>4</sub> Cl 1 g/l KHCO <sub>3</sub> 37,2 mg/l, NA <sub>2</sub> EDTA in dH <sub>2</sub> O
MACS Puffer	0,5 % BSA

	0,5 M EDTA in PBS
<b>Paraformaldehyd (PFA) Puffer 4 %</b>	40 g Paraformaldehyd + 1000 ml 0,1 M PBS-Puffer, pH 7,0 – 7,4
<b>Saponin Puffer</b>	0,5 % Saponin 0,5 % BSA in PBS

### 3.1.8 Kulturmedien

<b>Kulturmedien</b>	<b>Zusammensetzung</b>
<b>Mausmedium (MM)</b>	10 % FCS 1 % P/S 1 % L-Glutamin 0,1 % $\beta$ -Mercaptoethanol 1 % HEPES in RPMI
<b>Waschmedium (WM)</b>	5 % FCS 1 % P/S 1 % HEPES in RPMI

### 3.1.9 Antikörper

<b>Antikörper</b>	<b>Klon</b>	<b>Isotyp</b>	<b>Konzentra tion</b>	<b>Hersteller</b>
<b><math>\alpha</math>CD16/ <math>\alpha</math>CD32 (FC-block)</b>	2.4G2	rat- $\alpha$ -mouse monoclonal IgG2b, $\kappa$	0,5 mg/ml	BD Bioscience, Franklin Lakes (USA)
<b><math>\alpha</math>CD28</b>	37.51	hamster- $\alpha$ -mouse monoclonal IgG2, $\lambda$ 1	0,5 mg/ml	BD Bioscience, Franklin Lakes (USA)

<b>αCD3e</b>	145-2C11	hamster-α-mouse monoclonal IgG1, κ	0,5 mg/mL	BD Bioscience, Franklin Lakes (USA)
<b>αIFN-γ</b>	XMG1.2	rat-α-mouse monoclonal IgG1	8.25 mg/mL	BioXCell, West Lebanon (USA)
<b>αIL-12</b>	C17.8	rat-α-mouse monoclonal IgG2a	7,48 mg/ml	BioXCell, West Lebanon (USA)
<b>αIL-4</b>	11B11	rat-α-mouse monoclonal IgG1, κ	6,72 mg/ml	BioXCell, West Lebanon (USA)

### 3.1.10 FACS Antikörper

<b>FACS Antikörper</b>	<b>Klon</b>	<b>Isotyp</b>	<b>Konzentra tion</b>	<b>Hersteller</b>
<b>αBcl-6-PeCy7</b>	7D1	rat-α-mouse monoclonal IgG2a, κ	0,2 mg/ml	BioLegend, San Diego (USA)
<b>αCD11b-Pe/Cy7</b>	M1/70	rat-α-mouse monoclonal IgG2b, κ	0,2 mg/mL	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
<b>αCD11b-PerCP- Cy5.5</b>	M1/70	rat-α-mouse monoclonal IgG2b, κ	0,2 mg/ml	BioLegend, San Diego (USA)
<b>αCD19-FITC</b>	eBio1D3	mouse-α-mouse monoclonal IgG2a, κ	0,5 mg/ml	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
<b>αCD3-APC</b>	145-2C11	hamster-α- mouse monoclonal IgG1, κ	0,2 mg/ml	BD Bioscience, Franklin Lakes (USA)

<b>αCD3-PE</b>	145-2C11	hamster-α-mouse monoclonal IgG1, κ	0,2 mg/ml	BD Bioscience, Franklin Lakes (USA)
<b>αCD45.2-AF700</b>	104	mouse-α-mouse monoclonal IgG2a, κ	0,2 mg/ml	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
<b>αCD45-BV605</b>	30-F11	rat-α-mouse monoclonal IgG2b, κ	0,2 mg/ml	BD Bioscience, Franklin Lakes (USA)
<b>αCD4-AF700</b>	RM4-5	rat-α-mouse monoclonal IgG2a, κ	0,2 mg/ml	BD Bioscience, Franklin Lakes (USA)
<b>αCD4-Horizon (V450)</b>	RM4-5	rat-α-mouse monoclonal IgG2a, κ	0,2 mg/ml	BD Bioscience, Franklin Lakes (USA)
<b>αCD4-PECy7</b>	RM4-5	rat-α-mouse polyclonal IgG2a, κ	0,2 mg/ml	BD Bioscience, Franklin Lakes (USA)
<b>αCD62L-APC</b>	MEL-14	rat-α-mouse monoclonal IgG2a, κ	0,2 mg/ml	BD Bioscience, Franklin Lakes (USA)
<b>αCXCR5 (CD185)- FITC</b>	L138D7	rat-α-mouse monoclonal IgG2b, κ	0,2 mg/ml	BioLegend, San Diego (USA)
<b>αGM-CSF-PE</b>	MP1-22E9	rat-α-mouse monoclonal IgG2a, κ	0,2 mg/ml	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
<b>αIFN-γ-Horizon (V450)</b>	XMG1.2	rat-α-mouse monoclonal IgG1, κ	0,2 mg/ml	BD Bioscience, Franklin Lakes (USA)
<b>αIL-10-APC</b>	JES5-16E3	rat-α-mouse monoclonal IgG	0,2 mg/ml	BD Bioscience, Franklin Lakes (USA)
<b>αIL-17A-APC</b>	eBio17B7	rat-α-mouse monoclonal IgG2a, κ	0,2 mg/ml	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)



<b>αIL21-APC</b>	FFA21	rat-α-mouse monoclonal IgG2a, κ	0,2 mg/ml	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
<b>αPD-1 (CD279)- PE</b>	29F.1A12	rat-α-mouse monoclonal IgG2a, κ	0,2 mg/ml	BioLegend, San Diego (USA)
<b>αTNF-α-AF700</b>	MP6-XT22	rat-α-mouse monoclonal IgG1, κ	0,2 mg/ml	BD Bioscience, Franklin Lakes (USA)

### 3.1.11 Mäuse

#### 3.1.11.1 Wildtyp Mäuse

Stamm	Labor
<b>C57BL/6 (B6)</b>	Janvier Labs, Laval (France)
<b>SJL/J</b>	Janvier Labs, Laval (France)

#### 3.1.11.2 Genetisch Veränderte Mäuse

Stamm	Labor
<b>B6.Rag1<sup>-/-</sup></b>	Janvier Labs, Laval (France)
<b>B6.2D2</b>	(107)

### 3.1.12 Software

Software	Anwendung	Hersteller
<b>FACSDiva</b>	FACS-Analysen	BD Bioscience, Franklin Lakes (USA)

<b>FlowJo 10.0</b>	FACS-Analysen	Tree Star, Ashland (USA)
<b>GraphPad Prism 7/9</b>	Statistische Analysen	GraphPad Software, Inc., La Jolla (USA)
<b>Microsoft Office 2013/2019</b>	Textverarbeitung, Berechnungen, Figurenverarbeitung	Microsoft Corp., Redmond (USA)
<b>Inkscape 1.1</b>	Grafikerstellung	Inkscape Community, freie Software, GPL Lizenz

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Arbeiten mit Zellkulturen

Alle Experimente mit Zellkulturen wurden unter einer sterilen Sicherheitswerkbank unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die Materialien wurden vor Gebrauch mit 70% Ethanol desinfiziert. Die Zellen wurden bei 37°C in einer 5% CO<sub>2</sub> Atmosphäre mit 95% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Die Autoklavierung des Abfalls erfolgte bei 121 °C und 1 bar für 20 min.

### 3.2.2 Manuelles Zählen der Zellen

Die zu zählenden Zellen wurden in einem definierten Volumen aufgenommen. In einem Verhältnis von 1:10 wurde die Zellsuspension mit Trypanblau vermischt und auf die Neubauer Zählkammer gegeben. Durch die Zugabe von Trypanblau kann lichtmikroskopisch zwischen lebenden und toten Zellen unterschieden werden. Unter einem Lichtmikroskop wurden nun die Zellen der Quadranten gezählt und die mittlere Zellzahl berechnet. Die absolute Zellzahl der lebenden Zellen wurde mit folgender Formel berechnet:

Absolute Zellzahl=  $\text{gezählte Zellen} / \text{Quadrant} \times 10^4 \text{ (Zählkammerkoeffizient)} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \text{Volumen der Zellsuspension}$

### 3.2.3 Magnetic activated Cell Sorting (MACS)

Mithilfe von MACS (*Magnetic activated Cell Sorting*) ist es möglich, bestimmte Zellpopulationen anhand ihrer Oberflächenmoleküle zu trennen (Miltenyi et al., 1990). Hierfür werden mit magnetischen Beads markierte Antikörper verwendet,

die beim Binden an ihrer spezifischen Oberflächenstruktur Zellpopulationen magnetisch-aktiv kennzeichnen. Für die MACS-vermittelte Zellpopulationstrennung wurden Kits von Miltenyi Biotec benutzt und, falls nicht anders beschrieben, die Anweisungen des Herstellers befolgt.

Die Zellen wurden für 5-15 min bei 4 °C in MACS-Puffer mit dem entsprechenden magnetischem Bead inkubiert. Zur Entfernung von ungebundenen Beads wurden nach Inkubation 35 ml MACS-Puffer zugegeben und zentrifugiert, bei 550 g, 4 °C für 5 min. Das Zellpellet wurde in 1 ml MACS-Puffer pro  $3 \times 10^8$  Zellen resuspendiert und durch einen Prä-Separationsfilter (30 µm) auf eine MACS-Säule gegeben. Diese befand sich in dem magnetischen Feld eines MACS-Separators, wodurch die mit den magnetischen Antikörpern markierten Zellen in der Säule hängen blieben und nur Zellen ohne besagte Oberflächenstruktur befanden sich letztendlich in dem Durchfluss. Vor der Gabe der Zellsuspension wurden die Säulen mit 3 ml MACS-Puffer vorgespült. Das Nylonsieb diente zum Verhindern von Zellverklumpungen und Verstopfungen. Nach dem Transfer der Suspension wurde die Pipettenspitze in einem 1 ml MACS-Puffer enthaltenden Eppendorfer Röhrchen resuspendiert um Zellen für die Reinheitskontrolle („prä-MACS-Probe“) zu gewinnen. Zum Durchspülen wurde nach komplettem Durchlaufen der Probe durch die Säule 3 ml MACS-Puffer dazu gegeben.

### 3.2.4 FACS Analysen

FACS (*fluorescence activated cell sorting*) ist eine Methode, um sowohl die Morphologie von Zellen als auch die Expression verschiedener Oberflächenmoleküle und intrazelluläre Moleküle quantitativ zu bestimmen und zu analysieren. Dabei werden Laser von unterschiedlichen Wellenlängen auf die mit fluoreszierenden Antikörpern markierten Zellen gerichtet. Durch die entsprechende Streuung und Beugung der Strahlen können Rückschlüsse auf die morphologischen Eigenschaften verschiedener Zellpopulationen gezogen werden. Dabei gibt das Vorwärtsstreulicht (*Forward Scatter*; FSC) die relative Zellgröße wieder, während das Seitwärtsstreulicht (*Sidewards Scatter*; SSC) die intrazellulären Eigenschaften wie Vesikelgehalt oder Granularität spiegelt.

In den Experimenten dieser Arbeit wurde das Gerät FACS Canto II zur durchflusszytometrischen Analyse verwendet.

Zur Färbung von Oberflächenstrukturen (3.2.4.1) oder Intrazellulärmoleküle (3.2.4.3) wurden unten beschriebene Prozeduren durchgeführt. Die Analyse der erhaltenen FACS-Daten erfolgte mit der Software FlowJo 10.0.

### 3.2.4.1 Extrazellulärfärbung

Zur Färbung von Oberflächenmolekülen wurden die Zellproben nach zwei Waschschritten mit 1 ml FACS mit 500 g bei 4 °C für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und es wurden pro  $10 \times 10^6$  Zellen 100 µl der Färbelösung, bestehend aus den fluoreszierenden Antikörpern in der jeweiligen Verdünnung in FACS-Puffer, auf die Pellets gegeben. Darauf folgte eine 10-minütige Inkubation bei 4 °C in Dunkelheit. Zur Entfernung ungebundener Antikörper erfolgte ein weiterer Waschschrift mit 1 ml FACS Puffer durch Zentrifugieren bei 500 g bei 4 °C für 5 min. Die Proben wurde je Zellzahl in 200-300 µl FACS-Puffer aufgenommen und in FACS-Röhrchen überführt. Die Extrazellulärfärbung der *in vivo* Tfh-Zellen erfolgte mit folgenden Antikörpern in unterschiedlichen Verdünnungen: αCD4-V450 (1:400), αCD4-PeCy7 (1:1000), αCD4-AF700 (1:200), αCD3-APC (1:200), αCD45.2- AlexaFluor 700 (1:400) (C57BL/6 Mäuse), αCD45-BV605 (1:200) (SJL/J Mäuse), αCD11b-Pe/Cy7 (1:200), αCD11b-PerCP-Cy5.5 (1:200), αCXCR5-FITC (1:200), αPD-1-PE (1:200), αBcl6-PECy7 (1:50), und αIL-21-APC (1:50).

### 3.2.4.2 Lebend-Tod-Differenzierung

Die Unterscheidung der Zellen hinsichtlich ihrer Viabilität erfolgte durch die Farbstoffe 7-AAD und Propidiumjodid (PI).

7-AAD ist ein DNA-interkalierender Farbstoff, der in Zellen ohne intakte Zellmembran eindringen und sich somit ausschließlich in nicht-lebenden Zellen einlagert. Mit Hilfe dieses Avitalfarbstoffes können tote Zellen von lebenden Zellen in den FACS-Analysen differenziert werden. Die Lebend-Tod-Färbung mit 7-AAD erfolgte gleichzeitig mit der Inkubation der Antikörperfärbung mit 2,5 µl/ $10^6$  Zellen. Auch PI markiert tote Zellen, indem es durch nicht-intakte Zellmembranen diffundiert und in der Zelle mit der DNA interkaliert. Bei der Anwendung wurde 1 µl dieses Farbstoffs erst unmittelbar vor der Messung am FACS-Gerät hinzugefügt, um das Eindringen von PI in gesunde Zellen zu minimieren und möglichst nur tote Zellen anzufärben.

### 3.2.4.3 Intrazellulärfärbung

Voraussetzung für die Intrazellulärfärbung war die Fixierung und die Permeabilisierung der Zellen. Dafür wurden die Zellen zentrifugiert (550 g, 5 min, 4 °C) und mit PBS gewaschen. Zur Fixierung wurde die Zellen in 1 ml 2% PFA-Puffer (500 µl PBS + 500 µl 4% PFA-Puffer) für 20 min bei 4 °C in Dunkelheit inkubiert. Darauf erfolgte ein weiterer Waschschrift mit 2 ml PBS (ab hier

Zentrifugationsschritte bei 1000 g bei 4 °C für 5 min). Zur Permeabilisierung der Zellmembran wurde mit 2 ml Saponin gewaschen. Die Blockade der unspezifischen F<sub>C</sub>-Fragmente erfolgte in einer Lösung aus  $\alpha$ CD16/ $\alpha$ CD32, 1:70 in Saponin-Puffer für 10 min bei 4 °C in Dunkelheit. Für die Intrazellulärfärbung wurde nun 20  $\mu$ l der Färbelösung mit den entsprechenden fluoreszierenden Antikörpern in Saponin-Puffer hinzugegeben und für weitere 20 min bei 4 °C in Dunkelheit inkubiert. Die Verdünnung der Antikörper wurde auf ein absolutes Volumen von 100  $\mu$ l berechnet (70  $\mu$ l+ 20  $\mu$ l+ Zellpellet). Darauf folgte ein Waschschrift mit 1 ml Saponin-Puffer und ein zweiter mit 1 ml FACS-Puffer. Die Zellen wurden abhängig von der Zellzahl in 200-300  $\mu$ l FACS-Puffer aufgenommen und in die FACS-Röhrchen überführt.

#### **3.2.4.4 FACS-Analysen/ -Gating**

Mit Hilfe des BD FACS Canto II und der Software FACS Diva wurden die Zellen anhand ihrer Fluoreszenzsignale eingelesen und anschließend mit der Software FlowJo 10.0 ausgewertet. Die gesuchte Zellpopulation wurde durch sogenanntes *Gating* umrandet und eingefasst, sodass die Informationen über diesen Zellanteil erfasst und analysiert werden konnten. Neben den prozentualen Anteilen wurde auch die Mean Fluorescence Intensity (MFI) zur Auswertung herangezogen. Diese wird in den FACS-Analysen benutzt, um die Veränderung von der Intensität der Fluoreszenzen zu messen.

#### **3.2.5 Arbeiten mit Mäusen**

Vor der Isolation der gewünschten Organe wurden die benötigten Instrumente mit Ethanol gesäubert. Die Mäuse wurden entweder durch Nackenbruch getötet oder durch die Anästhesielösung (Ketamine und Rompun in 0,9%iger NaCl-Lösung) eingeschlafert. Sobald der Zwischen-Zehen-Reflex nicht mehr auslösbar war, wurde mit der Operation und Entnahme der Organe begonnen. Alle Tierexperimente wurden durch lokale Behörden genehmigt (Landesuntersuchungsamt Rheinlandpfalz) und auf Grundlage des *Deutschen Tierschutzgesetzes* durchgeführt.

##### **3.2.5.1 Isolation der Milz**

Zur Präparation der Milz wurde die Bauchhöhle mit einer sterilen Schere aufgeschnitten. Mit sterilen Pinzetten wurde die Milz entnommen, mögliche Pankreasreste entfernt und zur weiteren Verarbeitung in ein 15 ml Falcon mit

5 ml Waschmedium (WM) gelegt. Unter sterilen Bedingungen wurde der gesamte Inhalt des Falcons durch ein Nylonsieb (100 µm) gerieben und in 50 ml WM resuspendiert. Nach der Zentrifugation bei 500 g, 5 min, 4 °C wurden die Erythrozyten in 10 ml Lyse-Puffer lysiert. Die Reaktion wurde mit 5 ml WM gestoppt. Die Zellen wurden erneut zentrifugiert, abhängig von der Pelletgröße in 20-50 ml MACS-Puffer aufgenommen und gezählt (3.2.2).

### **3.2.5.2 Isolation der Lymphknoten**

Die inguinalen, axialen und brachialen Lymphknoten wurden mithilfe von sterilen Pinzetten entnommen und in ein 15 ml Röhrchen mit 5 ml WM für die weitere Verarbeitung vereinigt. Unter sterilen Bedingungen wurde der gesamte Inhalt des Röhrchens durch ein Nylonsieb (100 µm) gerieben und in 50 ml WM resuspendiert. Nach der Zentrifugation bei 500 g, 5 min, 4 °C wurden die Erythrozyten in 10 ml Lyse-Puffer lysiert. Die Reaktion wurde mit 5 ml WM gestoppt. Die Zellen wurden erneut zentrifugiert, abhängig von der Pelletgröße in 20-50 ml MACS-Puffer aufgenommen und gezählt (3.2.2).

### **3.2.5.3 Isolation und Verarbeitung der Peyer'schen Plaques**

Zur erstmaligen Etablierung einer Aufarbeitung von Peyer'schen Plaques in dieser Arbeitsgruppe wurden diese makroskopisch sichtbaren Immunzellansammlungen aus dem Dünndarm der Maus isoliert. Dafür wurde die Bauchhöhle mit einer steilen Schere geöffnet und an den Übergängen von Magen zu Dünndarm und Dünndarm zum Dickdarm einen Schnitt gesetzt und der gesamte Dünndarm in eine Petrischale gefüllt mit PBS gelegt. Die Peyer'schen Plaques wurden nun mit einer sterilen Schere herausgeschnitten und in 5 ml WM gelegt.

Zur weiteren Verarbeitung wurde unter sterilen Bedingungen der gesamte Inhalt des Röhrchens durch ein Nylonsieb (100 µm) gerieben und in 50 ml WM resuspendiert. Nach der Zentrifugation bei 500 g, 5 min, 4 °C wurden potenziell verbleibende Erythrozyten in 10 ml Lyse-Puffer lysiert. Die Reaktion wurde mit 5 ml WM gestoppt. Die Zellen wurden erneut zentrifugiert, abhängig von der Pelletgröße in 20-50 ml MACS-Puffer aufgenommen und gezählt (3.2.2).

### **3.2.5.4 Isolation und Verarbeitung des ZNS**

Vor der Isolation des zentralen Nervensystems wurden die Mäuse mit PBS perfundiert, um zu vermeiden, dass sich Zellen des vesikulären Blutkreislaufs im zentralnervösen Gewebe befinden. Dafür wurde der Brustkorb geöffnet und ein

kleiner Schnitt in den rechten Ventrikel gesetzt. Zur gleichmäßigen Perfusion wurde mit der Pumpe 20-30 ml PBS durch eine Nadel in den linken Ventrikel injiziert. Nach der Perfusion wurden Gehirn und Rückenmark vorsichtig entfernt und in ein mit 5 ml IMDM gefülltes Röhrchen platziert.

Zur weiteren Verarbeitung wurde das ZNS mit dem IMDM in eine Petrischale überführt und dort mit Hilfe eines Skalpell fragmentiert. Um eine Isolierung einzelner Zellen des zentralnervösen Gewebes zu erlauben und Kollagen sowie DNA und Fibronectin zu entfernen, wurden die Proben mit 10 mg/ml Kollagenase/Dispase, 10 mg/ml Kollagenase und 200 U/ml DNase behandelt.

Diese enzymatische „Verdauung“ fand statt in einem Wasserbad für 30 min bei 37 °C mit einer Vermischung durch den Vortex Mixer alle 5 min. Darauf erfolgte das Reiben durch ein Nylonsieb (70-100 µm). Nach einem Waschschrift mit 45 ml IMDM und der Zentrifugation bei 550 g für 5 min bei 4 °C folgte der Separationsvorgang mit einem 40/70 Percollgradienten. Hierfür wurden die ZNS-Zellpellets in 5 ml 40% Percoll mit IMDM aufgenommen und resuspendiert. Danach wurden 5 ml 70% Percoll mit PBS vorsichtig über die Zellsuspension überschichtet. Eine Zentrifugation über 30 min bei 750 g und Raumtemperatur wurde mit einer Beschleunigungs- und Bremsstufe auf jeweils 1 durchgeführt. Die obere Fettschicht wurde vorsichtig mit einer 1 ml Pipette entfernt und verworfen. Zum Einsammeln der Zielzellen wurde die Schicht zwischen der 40% Percollschicht und der 70% Percollschicht mit einer 1 ml Pipette abpipettiert und in ein 50 ml Röhrchen mit 40 ml Mausmedium (MM) übertragen. Eine weitere Zentrifugation erfolgte bei 550 g, 5 min und 4°C. Das Zellpellet wurde in 1 ml MM resuspendiert und gezählt (3.2.2).

### **3.2.5.5 Isolation und Verarbeitung der Dura Mater**

Erstmalig wurde in dieser Arbeitsgruppe ein Protokoll zur Aufarbeitung der Durae matris etabliert. Wie bei der ZNS-Isolation beschrieben (4.2.4.5) wurden die Mäuse mit PBS perfundiert. Die obere Schädeldecke wurde entfernt und in ein mit 5 ml PBS+ 2% FCS gefülltes Röhrchen platziert. Danach wurde sie in eine PBS gefüllte Petrischale gelegt und mithilfe von Pinzetten wurde unter Mikroskopie die Dura Mater abgezogen und in eine mit PBS gefüllte Kavität einer 48-Well-Platte gelegt.

Um einzelne Zellen isolieren zu können, wurden die Durae matris mit 2 mg/ml Kollagenase VIII und 200 U/ml DNase behandelt und für 30 min bei 37 °C und 160 Runden pro Minute in einen Schüttelinkubator platziert. Die Reaktion wurde daraufhin mit 400 µl PBS+ 2% FCS gestoppt und die Zellsuspension resuspendiert

und homogenisiert. Mit Prä-Separations-Filtern (30 µm) wurde die Zellsuspension gefiltert und daraufhin in 1,5 ml Eppendorfer Röhrchen überführt. Die Mikrotiterplatte wurden mit je 400 µl PBS+ 2% FCS gewaschen und auf den Filter überführt. Es folgte eine Zentrifugation bei 500 g und 5 °C für 5 min. Daraufhin wurde das Zellpellet in 200 µl PBS+ 2% FCS aufgenommen und resuspendiert und abhängig von der Pelletgröße gegebenenfalls gezählt (3.2.2).

### 3.2.6 T-Helfer-Zellkulturen

Zur Differenzierung von den verschiedenen T-Helfer-Zellen wurden naive T-Zellen ko-kultiviert mit antigenpräsentierenden Zellen (APZ) und/oder mit B-Zellen und in Anwesenheit von verschiedenen Zytokin-Konstellationen.

#### 3.2.6.1 Isolation von naiven CD4<sup>+</sup> T-Zellen

Für die Isolation naiver T-Helfer-Zellen wurden gesunde C57BL/6 oder B6.2D2 Mäuse durch einen Nackenbruch getötet. Die Milz (3.2.5.1) und die Lymphknoten (3.2.5.2) wurden entfernt und weiterverarbeitet. Um das angemessene Volumen für die magnetische *bead*-basierte Zellsortierung von naiven CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>hi</sup> Zellen berechnen zu können, wurden die Zellen manuell ausgezählt (3.2.2). Die magnetische *bead*-basierte Zellsortierung von naiven CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>hi</sup> Zellen wurde mit einem Miltenyi CD4 Isolation-Kit gefolgt von einer CD62L-positiv-Zellsortierung nach Anleitung des Herstellers und wie zuvor beschrieben (3.2.3) durchgeführt. Dafür wurde das Zellpellet in 40 µl MACS-Puffer und 10 µl CD4 T-Zell Biotin Antikörper Mix je  $1 \times 10^7$  Zellen resuspendiert. Nach einer Inkubation von 10 min bei 4 °C wurden 30 µl MACS-Puffer und 20 µl Anti-biotin-Microbeads pro  $10^7$  Zellen hinzugefügt, sowie 5 µl CD8 Microbeads um eine mögliche Kontamination mit CD8<sup>+</sup> Zellen zu vermeiden. Eine weitere Inkubation von 5 min bei 4 °C folgte. Die Effizienz der Zellsortierung wurde mit Hilfe der Durchflusszytometrie kontrolliert. Dazu erfolgte nach jeder Zellsortierung eine Extrazellulärfärbung (3.2.4.1) mit αCD4-PeCy7 (1:1000) und αCD3-APC (1:600). Die Reinheit der CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> Zellen erreichte >90% der Lymphozyten. Der CD62L-positiv-Sort wurde im Anschluss durchgeführt. Die CD4<sup>+</sup> Zellen wurden in 960 µl MACS-Puffer und 40 µl CD62L Microbeads für 15 min bei 4 °C inkubiert und danach über die Magnetsäulen gegeben. Auch hier wurde die Effizienz via Durchflusszytometrie überprüft. Dazu wurde eine Extrazellulärfärbung mit αCD4-Pe/Cy7 (1:1000) und αCD62L-APC (1:200) Antikörper durchgeführt. Nur naive T-Helfer-Zellen mit einer Reinheit >95% wurden für folgende Experimente einbezogen.



### 3.2.6.2 Isolation von APZ

Für die Isolierung von APZ wurden Milzen von gesunden C57BL/6 Mäusen entfernt und weiterverarbeitet (3.2.5.1). Das Zellpellet wurde in 50 ml MACS-Puffer aufgenommen und manuell gezählt (3.2.2) um das angemessene Volumen für die CD90.2 magnetische *bead*-basierte Zellsortierung zu bestimmen. MACS wurde ausgeführt wie beschrieben (3.2.3). Dafür wurde das Zellpellet in 95  $\mu$ l MACS-Puffer und 5  $\mu$ l CD90.2 Microbeads je  $1 \times 10^7$  Zellen resuspendiert. Die Inkubationszeit betrug 15 min bei 4 °C. Die CD90.2-Beads wurden zur Markierung von Zellen, die nicht antigenpräsentierend sind, verwendet, sodass diese bei der magnetischen Zellsortierung von den Magneten abgefangen wurden. Der Durchfluss beinhaltete folglich nur APZ. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Zellpellet in 10 ml steril gefiltertem MM aufgenommen. Um zu verhindern, dass die APZ während der Ko-Kultur selbst proliferieren wurden diese bestrahlt in einem Gamma-Irradiator bei 3000 rad (entspricht 30 Gy). Danach wurden die Zellen wieder zentrifugiert, abhängig von dem Pellet in 20-30 ml MM aufgenommen und manuell gezählt.

### 3.2.6.3 Isolation von B Zellen

Die Isolation der B-Zellen erfolgte anfänglich gleichermaßen wie die APZ (3.2.6.2). Anstelle der magnetischen Sortierung von CD90.2<sup>+</sup> Zellen und der Bestrahlung erfolgt die B220-magnetische *bead*-basierte Zellsortierung. Dafür wurde das Zellpellet in 90  $\mu$ l MACS-Puffer und 10  $\mu$ l B220 Microbeads je  $1 \times 10^7$  Zellen resuspendiert. Die Inkubationszeit betrug 15 min bei 4 °C. Die Effizienz der Zellsortierung wurde mit Hilfe von Durchflusszytometrie kontrolliert. Dazu erfolgte nach jeder Zellsortierung eine Extrazellulärfärbung (3.2.4.1) mit  $\alpha$ CD4-PeCy7 (1:1000),  $\alpha$ CD3-PE (1:200),  $\alpha$ C45R-AF700 (1:200),  $\alpha$ CD19-FITC (1:200) und  $\alpha$ CD62L-APC (1:200).

### 3.2.7 T-Zell Kulturen und Differenzierung

Zur Differenzierung von naiven T-Helfer-Zellen (3.2.6.1) in Th1, Th2 und Th17 wurden die Zellen in folgender Zytokinmischung und T-Zell-APZ-Verhältnis initial auf einer 24-Well Platte stimuliert. Insgesamt wurden  $6 \times 10^6$  Zellen in 2 ml MM pro Kavität ausplattiert.

**Tabelle 1**

Kulturbedingungen der verschiedenen T-Helfer-Zell-Subgruppen

<b>T-Zell-APZ-Verhältnis</b>		<b>Zytokinmischung</b>
<b>Th1</b>	1:5	IL-12 [50ng/ml] IL-18 [25ng/ml] αIL-4 [10µg/ml] α-CD3 [2µl/ml]
<b>Th2</b>	1:5	IL-4 [10ng/ml] Anti-IL-12 [10µg/ml] Anti-IFNγ [10µg/ml] Anti-CD3 [2µl/ml]
<b>Th17</b>	1:10	huTGF-β [3ng/ml] IL-23 [20ng/ml] IL-6 [20ng/ml] Anti-IL-4 [10µg/ml] Anti-IFNγ[10µg/ml] Anti-CD3 [2µl/ml]

An Tag 3 wurden die Zellen aufgrund der Proliferation aufgeteilt. Zuerst wurde das Volumen resuspendiert und 1 ml jeder Kavität in eine leere Kavität übertragen. Alle zellenbeinhalteten Kavitäten wurden wieder auf 2ml mit MM aufgefüllt sowie folgende Zytokine zur Differenzierung hinzugegeben.

**Tabelle 2**

Konditionen der Zellaufteilung der verschiedenen T-Helfer-Zell-Subgruppen

<b>Zytokine</b>	
<b>Th1</b>	IL-2 [100U/ml]
<b>Th2</b>	IL-2 [100U/ml] IL-4 [10ng/ml]
<b>Th17</b>	IL-2 [50U/ml] IL-23 [10µg/ml]

An Tag 5 erfolgte ein Differenzierungskontrolle durch eine Überprüfung der Zytokinproduktion (3.2.7.5).

### 3.2.7.1 Th1-Zell Kultur

Die initiale Stimulation zur Differenzierung erfolgte mit einer Zytokinmischung (**Tabelle 1**) sowie ein T-Zell-APZ-Verhältnis von 1:5.

Dafür wurden auf einer 24-Well Platte je  $5 \times 10^6$  APZ in 1 ml MM ausplattiert und für 5-10 min bei 37 °C inkubiert.  $1 \times 10^6$  naive T-Zellen in 0,5 ml MM sowie die Zytokinmischung in 0,5 ml MM wurden hinzugegeben und in den Inkubator bei 37 °C gestellt. An Tag 3 wurden die Zellen gesplittet, d.h. resuspendiert und 1 ml jeder Kavität in eine leere Kavität übertragen. Alle zellenbeinhalteten Kavitäten wurden wieder auf 2 ml mit MM aufgefüllt, wobei weitere Zytokine zur Differenzierung hinzugegeben wurden (**Tabelle 2**).

An Tag 5 erfolgte ein Differenzierungskontrolle durch eine Überprüfung der Zytokinproduktion.

### 3.2.7.2 Th2-Zell Kultur

Die initiale Stimulation zur Differenzierung erfolgte mit einer Zytokinmischung (**Tabelle 1**) sowie ein T-Zell-APZ-Verhältnis von 1:5.

Dafür wurden auf einer 24-Well Platte je  $5 \times 10^6$  APZ in 1 ml MM ausplattiert und für 5-10 min bei 37 °C inkubiert.  $1 \times 10^6$  naive T-zellen in 0,5 ml MM sowie die Zytokinmischung in 0,5ml MM wurden hinzugegeben und in den Inkubator bei 37 °C gestellt. An Tag 3 wurden die Zellen gesplittet, d.h. resuspendiert und 1 ml jeder Kavität in eine leere Kavität übertragen. Alle zellenbeinhalteten Kavitäten wurden wieder auf 2 ml mit MM aufgefüllt, wobei weitere Zytokine zur Differenzierung hinzugegeben wurden (**Tabelle 2**).

An Tag 5 erfolgte eine Differenzierungskontrolle durch eine Überprüfung der Zytokinproduktion.

### 3.2.7.3 Th17-Zell Kultur

Die initiale Stimulation zur Differenzierung erfolgte mit einer Zytokinmischung (**Tabelle 1**) sowie ein T-Zell-APZ-Verhältnis von 1:10.

Dafür wurden auf einer 24-Well Platte je  $5,4 \times 10^6$  APZ in 1 ml MM ausplattiert und für 5-10 min bei 37 °C inkubiert.  $0,6 \times 10^6$  naive T-zellen in 0,5 ml MM sowie die Zytokinmischung in 0,5 ml MM wurden hinzugegeben und in den Inkubator bei 37 °C gestellt. An Tag 3 wurden die Zellen gesplittet, d.h. resuspendiert und 1 ml

jeder Kavität in eine leere Kavität übertragen. Alle zellenbeinhalteten Kavitäten wurden wieder auf 2 ml mit MM aufgefüllt, wobei weitere Zytokine zur Differenzierung hinzugegeben wurden (**Tabelle 2**).

An Tag 5 erfolgte ein Differenzierungskontrolle durch eine Überprüfung der Zytokinproduktion.

### 3.2.7.4 Tfh-Zell-polarisierte Kultur

Zur Etablierung eines Protokolls für eine *in vitro* Tfh-Zell-polarisierter Kultur wurde der Erfolg von verschiedenen Protokollen untersucht und verglichen.

Eine Kultivierung mit einem APZ-T-Zell-Verhältnis von 1:1 wurde mit unterschiedlichen Zytokinzusammensetzungen durchgeführt und analysiert (Konfiguration 1 und 2). Daneben wurde das bestehende Protokoll für die Tfh-B-Zell Ko-Kultur von *Kolenbrander et al.* (108) wie folgt modifiziert und umgesetzt. Bei einem B-Zell- T-Zell Verhältnis von 1:2 und einem APZ-T-Zell-Verhältnis von 1:5 erfolgte die initiale Stimulierung zur Zelldifferenzierung mit folgender Zytokinmischung (**Tabelle 3**).

**Tabelle 3**

Kulturbedingungen Tfh-Zell-polarisierte Kultur

Verhältnisse		Zytokinmischung
<b>Tfh-B-Zell Ko-Kultur</b>	B-Zell: T-Zell= 1:2 APZ: T-Zell= 1:5	IL-21 [50ng/ml], IL-6 [20ng/ml], Anti-IL-4 [10µg/ml], Anti-IFNγ[10µg/ml], Anti-CD3 [2µl/ml]
<b>Tfh-Kultur Konfiguration 1</b>	APZ: T-Zell 1:1	α- CD3: [2µg/ml] α- IFNγ: [10µg/ml] α- IL-4: [10µg/ml] IL-21 [50ng/ml]
<b>Tfh-Kultur Konfiguration 2</b>	APZ: T-Zell 1:1	α- CD3: [2µg/ml] α- IFNγ: [10µg/ml] α- IL-4: [10µg/ml] IL-21 [50ng/ml] IL-6: [20ng/ml]

Dafür wurden auf einer 24-Well Platte je  $0,75 \times 10^6$  APZ in 0,5 ml MM und  $1,75 \times 10^6$  B Zellen ausplattiert und mit LPS (1:1000) für 5-10 min bei 37 °C inkubiert.  $3,5 \times 10^6$  naive T-zellen in 0,5 ml MM sowie die Zytokinmischung in 0,5 ml MM wurden dazugegeben und in den Inkubator bei 37 °C gestellt.

An Tag 3 wurden die Zellen wie oben beschrieben gesplittet, ohne weitere Zytokine hinzuzugeben und auf 2 ml mit MM aufgefüllt. An Tag 5 erfolgte ein Differenzierungsskontrolle durch eine Überprüfung der Zytokinproduktion.

### 3.2.7.5 Überprüfung der Zytokinproduktion

Die Zytokinproduktion erfolgte routinemäßig an Tag 5 der Zellkultur. 24 Stunden vor der Überprüfung wurde eine Kavität pro Kultur mit  $\alpha$ CD3e und  $\alpha$ CD28 Antikörpern beschichtet. Hierfür wurden 120  $\mu$ L PBS mit 3  $\mu$ g/mL  $\alpha$ CD3e und 2.5  $\mu$ g/mL  $\alpha$ CD28 auf eine Kavität einer 48-Well Platte gegeben, welche in mit 70 % Ethanol eingesprühte Frischhaltefolie eingewickelt bei 4 °C über Nacht inkubiert wurde. Für die Stimulierung wurden diese Suspension wieder entnommen und 1 ml resuspendierte T-Zell-Kultur sowohl auf ein beschichtetes als auch zur Kontrolle auf eine unbeschichtete Kavität gegeben. Die Zytokin-Ausschüttung wurde schließlich durch Gabe von 5  $\mu$ g/mL Brefeldin A gestoppt. Nach 4 Stunden wurde die Überprüfung der Zytokinproduktion per Durchflusszytometrie anhand der Extra- (3.2.4.1) und/oder Intrazellulärfärbung (3.2.4.3) mit unterschiedlichen Antikörpermischungen durchgeführt (**Tabelle 4**).

**Tabelle 4**

FACS-Färbungen der verschiedenen T-Helfer-Zell-Subgruppen

	Extrazellulär	Intrazellulär
<b>Th1</b>	$\alpha$ CD4- PeCy7 (1 :1000)	$\alpha$ IFN $\gamma$ - Horizon (1:200) $\alpha$ IL-10- APC (1:200) $\alpha$ TNF $\alpha$ - AF700 (1:200)
<b>Th2</b>	$\alpha$ CD4- PeCy7 (1 :1000)	$\alpha$ IFN $\gamma$ - Horizon (1:200) $\alpha$ IL-10- APC (1:200) $\alpha$ TNF $\alpha$ - AF700 (1:200)
<b>Th17</b>	$\alpha$ CD4- PeCy7 (1 :1000)	$\alpha$ IFN $\gamma$ - Horizon (1:200) $\alpha$ IL-17A- APC (1:200) $\alpha$ TNF $\alpha$ - AF700 (1:200)

		αGM-CSF- PE (1:200)
<b>Tfh-polarisiert</b>	αCD4- PeCy7 (1:1000) αCXCR5- FITC (1:200) αPD-1- PE (1:200)	αIFNγ- Horizon (1:200) αTNFα- AF700 (1:200) αIL-17A- APC (1:200)

### 3.2.8 Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis (EAE)

Alle Tierexperimente wurden auf Grundlage des Deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt. Die Haltung der Mäuse erfolgte in separat ventilierten Käfigen mit pathogenfreiem Millieu bei Gruppen von 2-5 Mäuse pro Käfig. Der Tag/Nacht-Rhythmus betrug je 12 Stunden. Zur regelrechten Akklimatisierung wurden die Mäuse mindestens eine Woche vor den Experimenten in den Tierstall vor Ort umgesetzt. Beim Umgang mit den Mäusen wurde stets auf die entsprechende Hygiene und keimfreie Arbeit geachtet.

#### 3.2.8.1 B6 EAE

Für die aktive C57BL/6 EAE wurden die Mäuse subkutan (s.c.) mit 200 µl einer Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein (MOG)<sub>35-55</sub>-Emulsion in *Complete Freund Adjuvant* (CFA) immunisiert (Hooke Kit). CFA enthält abgetötetes Mykobakterium tuberculosis (H37RA Stamm), welches die Immunantwort der Tiere verstärkt. Zusätzlich wurde 200 ng Pertussistoxin (PTX) zum Immunisierungszeitpunkt, sowie 24 Stunden später intraperitoneal (i.p.) injiziert.

#### 3.2.8.2 SJL EAE

Für die aktive SJL/J EAE wurden die Mäuse subkutan (s.c.) mit 200 µl ein Proteolipid-Protein (PLP)<sub>139-151</sub> Emulsion in 200 µL CFA (Hooke kit) immunisiert. SJL/J Mäuse erhielten zusätzlich 500 ng PTX i.p. zum Immunisierungszeitpunkt.

#### 3.2.8.3 B6.Rag1<sup>-/-</sup> EAE

Für die Zelltransfer-EAE wurden 10-30x10<sup>6</sup> 2D2 Tfh-polarisierte Zellen (3.2.7.4) und 400 ng/Maus PTX intravenös (i.v.) in B6.Rag1<sup>-/-</sup> Mäuse injiziert.

### 3.2.8.4 Klinische Einschätzung des Krankheitsverlaufs

Die immunisierten Mäuse wurden täglich begutachtet und nach ihren klinischen Symptomen beurteilt. Die Operationalisierung erfolgte je nach Ausprägung und Schwere der Symptomatik mit Hilfe von Symptomwerten (**Tabelle 5**).

**Tabelle 5**

Klinische Einschätzung des Krankheitsverlaufs der EAE Mäuse (nach Birkner et al. (109))

Symptomwert	klinische Symptome
0	keine Symptome einer EAE ersichtlich
0,5	Parese des Schwanzes
1	Plegie des Schwanzes
2	Parese der Hinterbeine
3	Plegie der Hinterbeine
3,5	Plegie der Hinterbeine und Parese der Vorderbeine
4	Plegie der Hinter- und Vorderbeine
5	moribund oder verstorben

### 3.2.9 Statistische Analysen

Die statistischen Analysen wurden, falls nicht anderweitig erwähnt, mit GraphPad Prism 7 durchgeführt. *Mean group differences* wurden mit der *one-way ANOVA* gefolgt von *Tukey's multiple comparison test*, *Mann-Whitney test* oder *independent-sample t-tests* ausgewertet. Korrelationen wurden mittels linearer Regression berechnet. Das Signifikanzniveau wurde auf  $\alpha = 0,05$  gesetzt mit \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ; \*\*\*\* $p < 0.0001$ . Falls nicht anders angegeben entsprechen die gezeigten Daten dem Mittelwert  $\pm$  Standardfehler (SEM). Die ROUT Methode von GraphPad wurde genutzt, um Ausreißer auszuschließen.

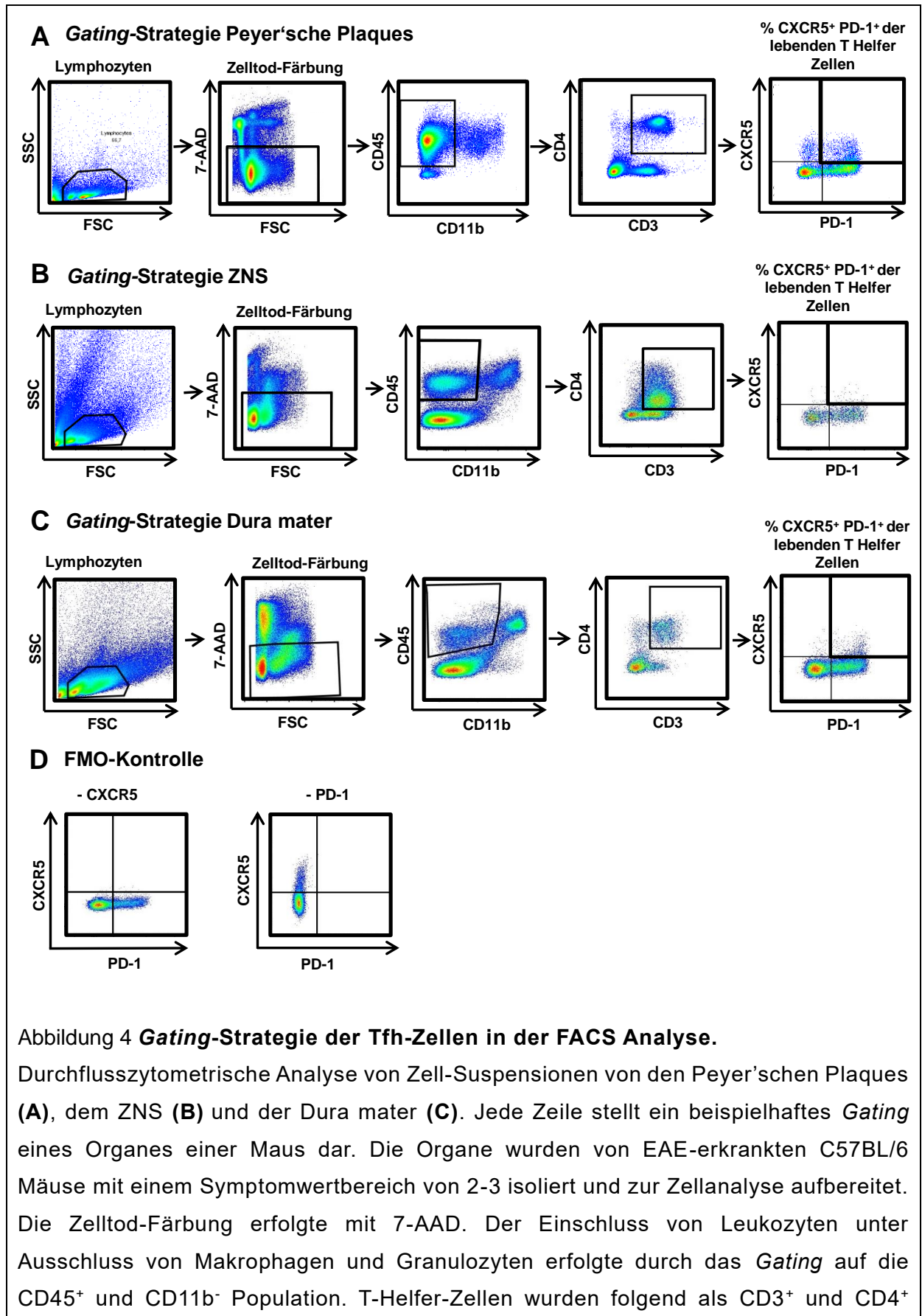
## 4 Ergebnisse

### 4.1 Die Charakterisierung von Tfh Zellen erfolgt in der Durchflusszytometrie als CXCR5<sup>+</sup> und PD-1<sup>+</sup>.

Zur Untersuchung der Dynamik von Tfh-Zellen in verschiedenen EAE-Mausmodellen wurden im Rahmen dieser Dissertation umfangreiche durchflusszytometrische Analysen durchgeführt. Zu diesem Zweck stand vorab eine eindeutige Identifikation der Tfh-Zellen im Fokus der Arbeit.

Die Abgrenzung der Tfh-Zellen zu anderen T-Helfer-Zell-Subtypen ist nicht einheitlich definiert. Allerdings hat sich in den letzten Jahren eine Kombination an Oberflächenmarkern herauskristallisiert, die zur Bestimmung dienlich sind und die daher in dieser Arbeit angewendet wurden. Hierzu gehören CXCR5, PD-1 (Programmed cell death protein 1), sowie die T-Helfer-Zell-Oberflächenmoleküle CD3 und CD4 (103, 110, 111). Um die Tfh-Zellen noch präziser einzukreisen, wurde zudem ein Gating auf CD45<sup>+</sup> Leukozyten gesetzt und CD11b<sup>+</sup> Zellen ausgeschlossen. Somit wurde die Zielpopulation wie folgt charakterisiert: CD45<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup>CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CXCR5<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup> lebende Zellen (**Abbildung 4 A-D**).





definiert. Die Zielpopulation der Tfh-Zellen wurde charakterisiert als Prozentzahl an CXCR5<sup>+</sup> PD-1<sup>+</sup> der lebenden T-Helfer-Zellen.

Zur Negativ-Kontrolle der relevanten Antikörper wurde die *Fluorescence Minus One* (FMO)-Kontrolle durchgeführt (**D**). Mit der FMO-Kontrolle können in einer mehrfarbigen Antikörpermischung ungewollte falsch-positive Signale des zu interessierenden Antikörpers ausgeschlossen werden, indem eine Färbung mit Antikörpermischung spezifisch ohne diesen Antikörper durchgeführt und betrachtet wird, ob Autofluoreszenzen oder Kompensationsfehler bestehen.

(Abbildung abgewandelt publiziert in: Baniahmad et al. (112))

Zudem wurden beispielhaft bei einem C57BL/6-EAE-Durchlauf die Bcl-6- Expression und IL-21-Produktion in den lebenden CD45<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup>CD4<sup>+</sup>CXCR5<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup> Zellen gemessen, um eine Tfh-typische Zellaktivität zu bestätigen. Hierbei zeigte sich in jedem Stadium und Organ eine vermehrte Bcl-6 *Mean Fluorescence Intensity* (MFI) und somit eine erhöhte Bcl-6 Expression verglichen mit der *Fluorescence Minus One* (FMO)-Kontrolle (**Abbildung 5 A**). Zusätzlich war in allen analysierten Tfh-Zellen eine IL-21 Expression in allen Stadien der EAE nachweisbar (**Abbildung 5 B**).

Insgesamt diente diese *Gating*-Strategie dazu, die Population der Tfh-Zellen zu identifizieren. Die Spezifität des *Gatings* wurde dabei durch die Analyse der Bcl-6 Expression und IL-21 Produktion bestätigt.

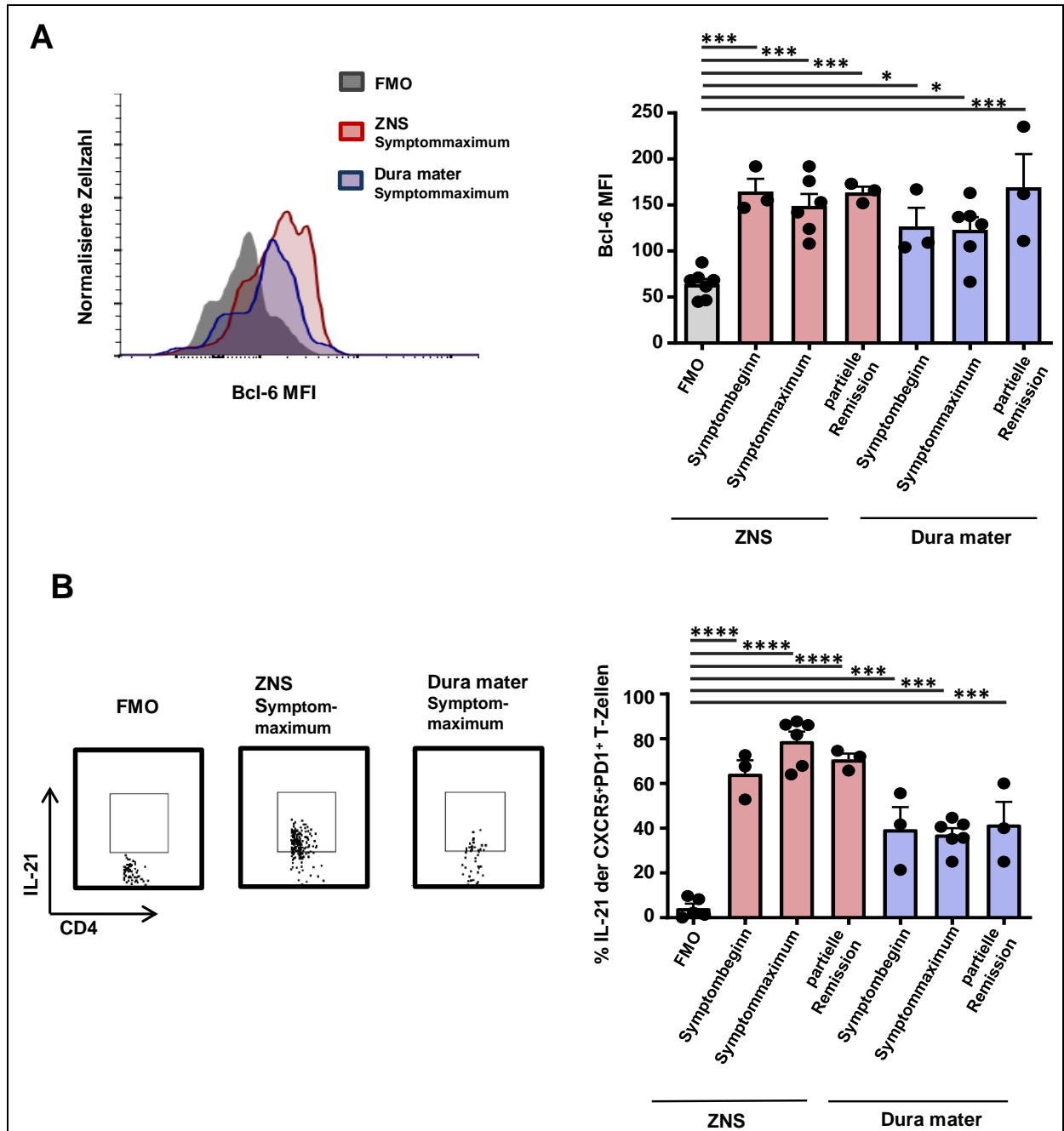


Abbildung 5 **Alle analysierten Tfh-Zellen exprimieren Bcl-6 und IL-21.**

Die C57BL/6 EAE wurde mittels MOG<sub>33-35</sub> Peptid induziert. Die Organe wurden isoliert, Einzelzellsuspensionen gewonnen und zur Zellanalyse aufbereitet. Die Zellen wurden mit einer Antikörpermischung immunmarkiert. **(A)** Die durchschnittliche Fluoreszenzintensität von Bcl-6 in lebenden CD45<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup>CD4<sup>+</sup>CXCR5<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup>Zellen ist beispielhaft für Zellen, die während des Symptommaximums isoliert wurden, in einem Histogramm für ZNS (rot) und Dura mater (blau) dargestellt (links), sowie im Vergleich mit der FMO-Kontrolle quantifiziert über den EAE Verlauf im Symptombeginn (n=3), Symptommaximum (n=6) und in der partiellen Remission (n=3) (rechts). **(B)** Der prozentuale Anteil von IL-21 in lebenden CD45<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup>CD4<sup>+</sup>CXCR5<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup> Zellen

repräsentative in Zellen, die zum Symptommaximum im ZNS und der Dura mater isoliert wurden, im Punktediagramm (links) und quantifiziert im Vergleich mit der FMO-Kontrolle während des gesamten Krankheitsverlaufs mit Symptombeginn (n=3), Symptommaximum (n=6) und partieller Remission (n=3) im ZNS und in der Dura mater dargestellt. Die statistischen Analysen wurden mittels *one-way ANOVA* gefolgt von *Tukey's multiple comparison test* durchgeführt. \*p < 0.05; \*\*p < 0.01; \*\*\*p < 0.001; \*\*\*\*p < 0.0001. Die gezeigten Daten entsprechen dem Mittelwert ± Standardfehler. (Abbildung abgewandelt publiziert in: Baniahmad et al. (112))

## 4.2 Tfh-Zellen sind in der Dura mater von C57BL/6-Mäusen in der EAE nachweisbar.

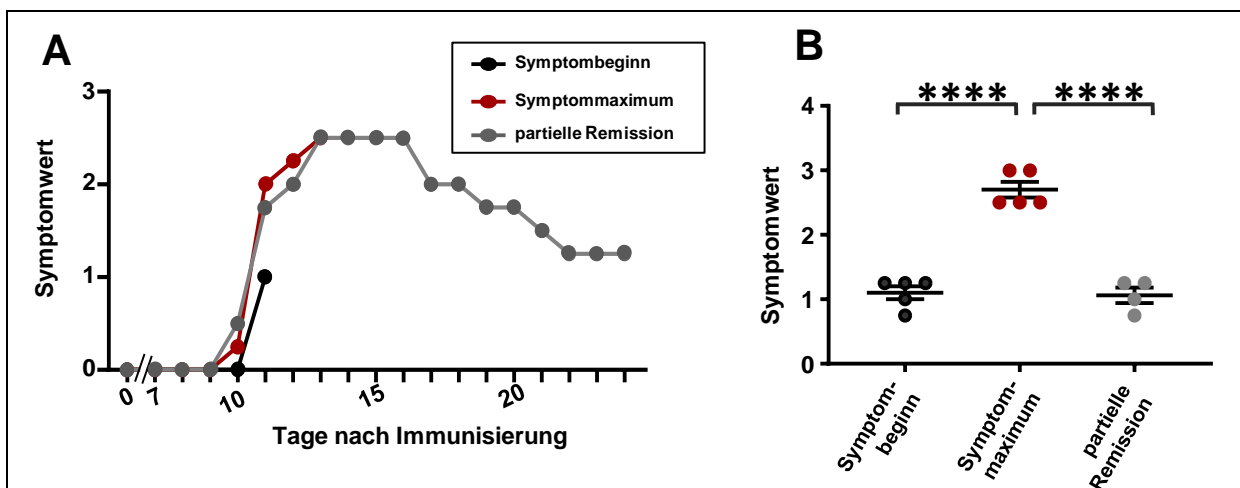


Abbildung 6 **Verlauf der C57BL/6-EAE und klinischer Symptomwert zu den untersuchten Krankheitsstadien.**

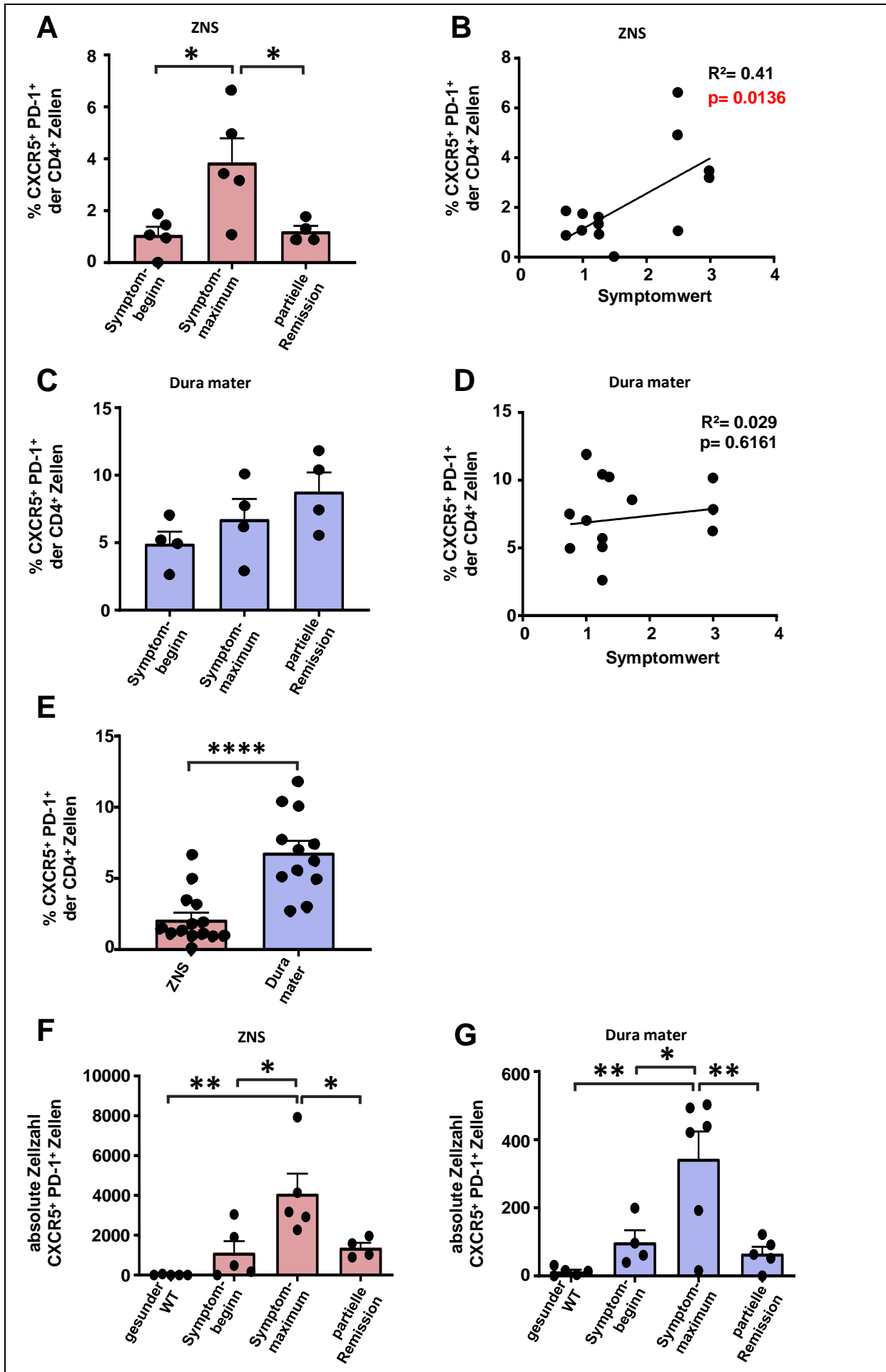
Die C57BL/6 EAE wurde mittels MOG<sub>35-55</sub> Peptid induziert. **(A)** Jedes Krankheitsstadium wird von jeweils einer Maus repräsentativ dargestellt. Der Symptombeginn (n=5) lag durchschnittlich am Tag 10-12 nach Immunisierung (TnI) 10–12, das Symptommaximum (n=5) am TnI 12–16 und die partielle Remission (n=4) am TnI 22–24. **(B)** Der mittlere Symptomwert (MSW) wurde zwischen den drei Krankheitsstadien verglichen. Symptombeginn: MSW=1,1 (Bereich 0,75-1,25); Symptommaximum: MSW=2,7 (Bereich 2,5-3,0); partielle Remission: MSW=1,063 (Bereich 0,75-1,25). Die Ergebnisse repräsentieren zwei unabhängige Experimente. Die statistischen Analysen wurden mittels *one-way ANOVA* gefolgt von *Tukey's multiple comparison test* durchgeführt. \*p < 0.05; \*\*p < 0.01; \*\*\*p < 0.001; \*\*\*\*p < 0.0001. Die gezeigten Daten entsprechen dem Mittelwert ± Standardfehler.

(Abbildung abgewandelt publiziert in: Baniahmad et al. (112))

Der Krankheitsverlauf der C57BL/6-EAE wurde in drei verschiedene Stadien eingeteilt, abhängig von dem jeweiligen Symptomwert und dem Tag nach der Immunisierung (Tag nach Immunisierung, TnI). Der Symptombeginn lag im Durchschnitt am TnI 10-12 mit einem Symptomwert-Bereich von 0,5–1,25. Das inflammatorische Symptommaximum wurde im Schnitt am TnI 12–16 mit einem Symptomwert-Bereich von 2,5–3 und die partielle Remission am TnI 22–24 mit einem Symptomwert-Bereich von 0–1,25 gemessen (**Abbildung 6 A+B**).

Im ZNS konnte ein signifikanter Anstieg des prozentualen Anteils von Tfh-Zellen an den CD4<sup>+</sup> T-Helfer-Zellen vom Symptombeginn zum Symptommaximum der Erkrankung beobachtet werden. Kongruent mit der Entzündungsaktivität erfolgte ein signifikanter Abfall zur partiellen Remission hin (**Abbildung 7 A**). Eine signifikante Korrelation zwischen Krankheits-Symptomwert und der Tfh-Zell-Population konnte festgestellt werden ( $R^2= 0,41$ ;  $p= 0,0136$ ) (**Abbildung 7 B**).

In der Dura mater konnten hingegen keine relevanten Unterschiede in der Tfh-Zell-Dynamik gezeigt werden (**Abbildung 7 C**). Allenfalls lässt sich eine leichte Tendenz beschreiben mit einem kontinuierlichen zeitlichen Anstieg über Symptommaximum und partieller Remission. Auch konnte hier keine Korrelation zwischen Krankheits-Symptomwert und der Tfh-Zell-Population gezeigt werden (**Abbildung 7 D**). Bemerkenswerterweise ist der Tfh-Anteil unabhängig vom Krankheitsstadium in der Dura mater höher als im ZNS (**Figure 7 E**). Die Kontrolle der absoluten Zellzahlen im Vergleich mit gesunden Wildtypmäusen zeigte eine signifikante Anreicherung von Tfh-Zellen in beiden Organen im Symptommaximum der Erkrankung (**Abbildung 7 F+G**).



**Abbildung 7 Prozentualer Tfh-Zell-Anteil in C57BL/6-EAE-Mäusen in ZNS und Dura mater mit Korrelation zum klinischen Symptomwert.**

Die C57BL/6 EAE wurde mittels MOG<sub>35-55</sub> Peptid induziert. Die Zellen wurden zu den verschiedenen Krankheitsstadien aus den angegebenen Organen isoliert, mit einer Antikörpermischung immunmarkiert und mittels Durchflusszytometrie analysiert. **(A-D)**

Die Prozentzahl der CXCR5<sup>+</sup> PD-1<sup>+</sup> Tfh-Zellen von den lebenden CD4<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup>CD45<sup>+</sup> Lymphozyten wurden an den unterschiedlichen Krankheitsstadien verglichen sowohl im ZNS **(A)** als auch in der Dura mater **(C)**. Anschließend wurde der prozentuale Tfh-Anteil der lebenden Lymphozyten des ZNS **(B)** und der Dura mater **(D)** mit dem klinischen Symptomwert korreliert.

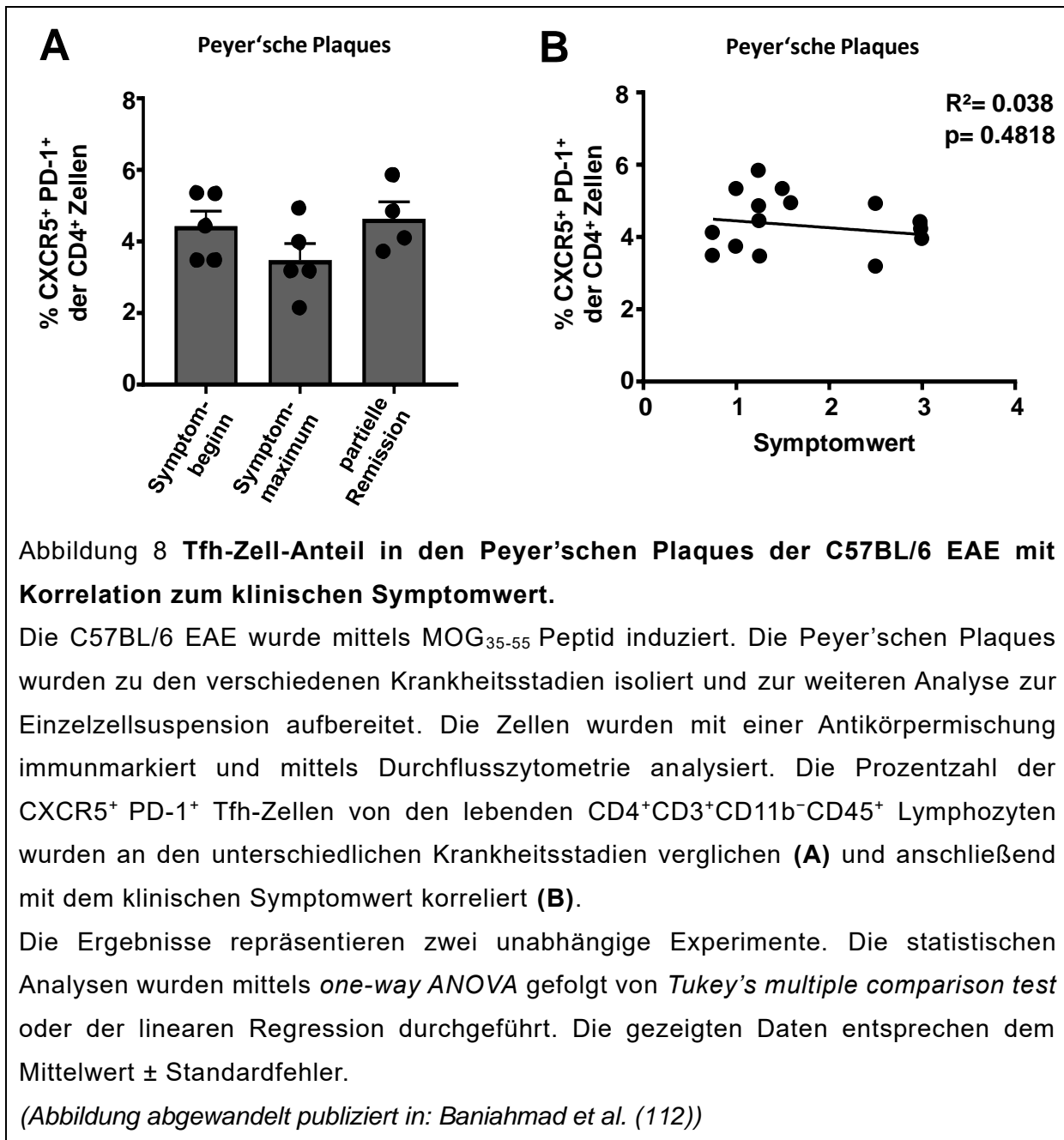
Die Tfh-Zell-Prozente von allen drei Krankheitsstadien (Symptombeginn, Symptommaximum, partielle Remission) wurden jeweils für das ZNS und die Dura mater vereint und verglichen **(E)**.

**(F-G)** Die absoluten Zellzahlen der CD4<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup>CD45<sup>+</sup>CXCR5<sup>+</sup> PD-1<sup>+</sup> Tfh-Zellen von gesunden Wildtyp (WT) C57BL/6-Mäusen wurden mit den absoluten Zellzahlen in ZNS **(F)** und Dura mater **(G)** der drei Krankheitsstadien der C57BL/6 EAE verglichen.

Die Ergebnisse repräsentieren zwei unabhängige Experimente. Jeder Punkt stellt eine einzelne Maus dar. Die statistischen Analysen wurden mittels *one-way ANOVA* gefolgt von *Tukey's multiple comparison test* **(A, C, E-G)** oder der linearen Regression **(B, D)** durchgeführt. \*p < 0.05; \*\*p < 0.01; \*\*\*p < 0.001; \*\*\*\*p < 0.0001. Die gezeigten Daten entsprechen dem Mittelwert ± Standardfehler.

(Abbildung abgewandelt publiziert in: Baniahmad et al. (112))

Es ist bekannt, dass das Mikrobiom im Darm eine Rolle in der Pathogenese der MS und EAE spielt (105, 113). Es wurde außerdem gezeigt, dass eine Subpopulation von Tfh-Zellen in den Peyer'schen Plaques von dem dort lokalisiertem Mikrobiom zur Differenzierung und zur IL-21-Expression angeregt werden (114). Auch wurde ein Einfluss von in den Peyer'schen Plaques gelegenen Tfh-Zellen auf andere Autoimmunerkrankungen beschrieben (115). Um zu untersuchen, ob die Tfh-Zellen in den Peyer'schen Plaques auch während der Pathogenese der EAE eine Rolle spielen, analysierten wir hier die Tfh-Dynamik über den EAE-Verlauf. Hier wurden keine signifikanten Änderungen in dem Tfh-Prozentsatz im Verlauf der C57BL/6-EAE beobachtet **(Abbildung 8 A)**, was darauf hindeutet, dass das Mikrobiom keinen lokalen Effekt auf die Tfh-Zellen im Verlauf der EAE zeigt. Eine Korrelation zwischen Krankheits-Symptomwert und der Tfh-Zell-Population wurde weder in der Dura mater noch in den Peyer'schen Plaques erfasst **(Abbildung 8 B)**.



Zusammengefasst lassen die Ergebnisse auf eine proinflammatorische Rolle der Tfh-Zellen in der C57BL/6-EAE schließen. Veränderungen des Tfh-Anteils vor allem im ZNS sind mit der inflammatorischen Krankheitsausprägung assoziiert, während der konstant höhere Anteil in der Dura mater auf ein persistierendes Reservoir hinweisen könnte. Ein Effekt von lokal ausgeschütteten Faktoren des Mikrobioms im Darm auf die Tfh-Zellen konnte hingegen nicht gezeigt werden.



### 4.3 Der Tfh-Zell-Anteil ist in SJL/J-EAE-Mäusen mit hohem klinischem Symptomwert reduziert.

Wie bereits beschrieben, fokussierten sich die bisherigen Forschungsarbeiten bei der Untersuchung der Tfh-Zellen in der EAE nur auf C57BL/6-Mäuse. Da die RRMS mit ihrem schubförmig-remittierendem Verlauf häufig beim Patienten mit MS zu finden ist, ist auch die Untersuchung des entsprechenden Mausmodels mit SJL/J-Mäusen von hoher Bedeutung. In der vorliegenden Arbeit hier wurde der Krankheitsverlauf in SJL/J-Mäusen in verschiedene Phasen eingeteilt, abhängig von dem jeweiligen Symptomwert und dem Tag nach der Immunisierung. Der Symptombeginn lag hier im Durchschnitt am TnI 9–11 mit einem Symptomwert-Bereich von 0,5–1,25. Das Symptommaximum der Entzündungsaktivität wurde im Schnitt am TnI 11-13 mit einem Symptomwert-Bereich von 2,5–3 erreicht. Die Remission lag am TnI 16-17 mit einem Symptomwert-Bereich von 0–1,25 und das Rezidiv am TnI 34-36 mit einem Symptomwert-Bereich von 1-2 (**Abbildung 9 A+B**).

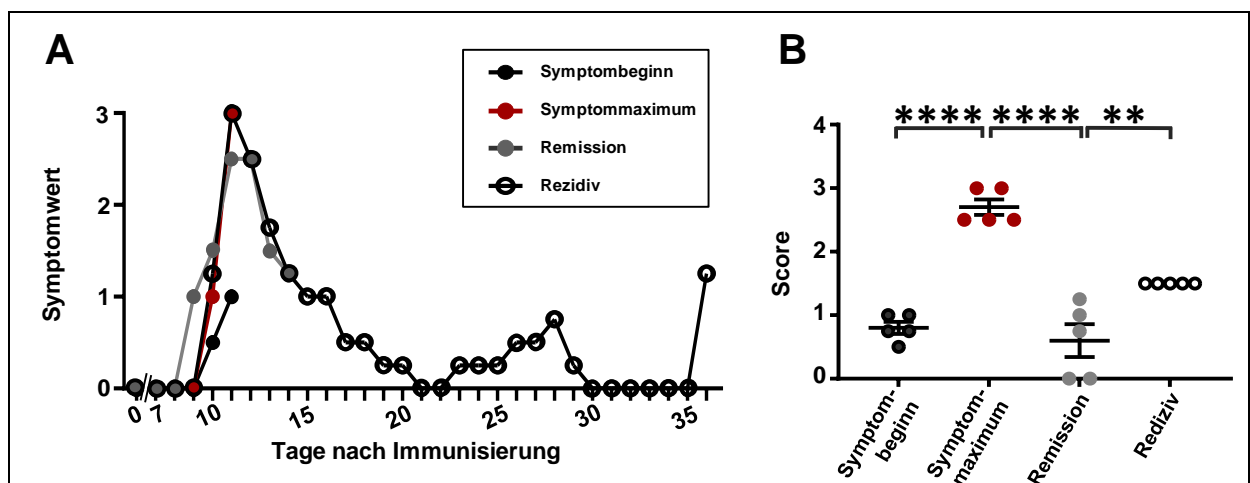


Abbildung 9 Verlauf der SJL/J-EAE und klinischer Symptomwert zu den untersuchten Krankheitsstadien.

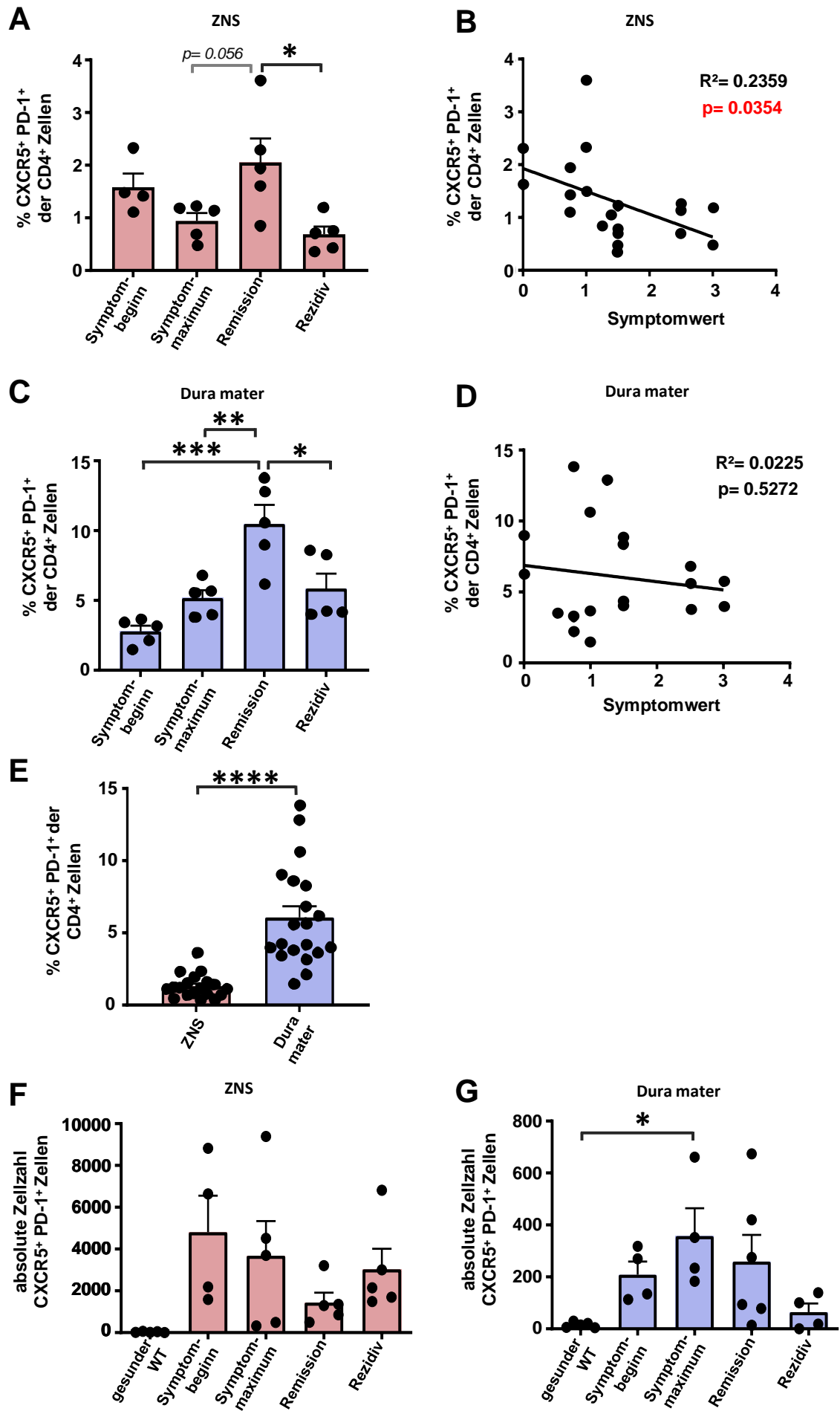
Die SJL/J-EAE wurde mittels PLP<sub>139-151</sub> Peptid induziert. **(A)** Jedes Krankheitsstadium wird von jeweils einer Maus repräsentativ dargestellt. Der Symptombeginn (n=4) lag hier durchschnittlich am TnI 9–11, das Symptommaximum (n=5) am TnI 11–13, die Remission (n=5) an TnI 16–17 und der Rezidiv (n=5) an TnI 34–36. **(B)** Der mittlere Symptomwert (MSW) wurde zwischen den drei Krankheitsstadien verglichen. Symptombeginn: MSW=0,8 (Bereich 0,5-1,0); Symptommaximum: MSW=2,7 (Bereich 2,5-3,0); Remission: MSW=0,6 (Bereich 0-1,25); Rezidiv: MSW=1,5 (Bereich 1,5-1,5). Jeder Punkt steht für eine aufgearbeitete Maus. Die statistischen Analysen wurden mittels *one-way ANOVA* gefolgt von *Tukey's multiple comparison test* durchgeführt. \*p

< 0.05; \*\*p < 0.01; \*\*\*p < 0.001; \*\*\*\*p < 0.0001. Die gezeigten Daten entsprechen dem Mittelwert ± Standardfehler.

*(Abbildung abgewandelt publiziert in: Baniahmad et al. (112))*

Interessanterweise zeigte sich hierbei im ZNS eine Verminderung des Tfh-Anteils in dem inflammatorischen Rezidiv im Vergleich zur fast entzündungsfreien Remission (**Abbildung 10 A**). In der Dura mater zeigt sich ein ähnliches Bild mit einem zuvor signifikanten Anstieg der Tfh-Frequenz vom Symptombeginn und Symptommaximum zur Remission und dann einem Abfallen zum Rezidiv (**Abbildung 10 C**). Eine Korrelation mit dem klinischen Symptomwert konnte in der Dura mater nicht nachgewiesen werden (**Abbildung 10 D**). Des Weiteren finden sich wie in dem C57BL/6-EAE-Modell auch hier unabhängig von dem Krankheitsstadium höhere Tfh-Zell-Anteile in der Dura mater als im ZNS (**Abbildung 10 E**).

Obwohl die absoluten Zellzahlen hier tendenziell eher der Tfh-Dynamik der C57BL/6-EAE ähneln (**Abbildung 10 F-G**), konnte eine statistisch signifikante, negative Korrelation des Krankheits-Symptomwerts und des prozentualen Tfh-Zell-Anteils der CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T-Helfer-Zellen im ZNS gezeigt werden (**Abbildung 10 B**). Dies steht im starken Gegensatz zu der positiven Korrelation der Tfh-Zellen zum Symptomwert der C57BL/6-EAE und lässt einen konträren Effekt der Tfh-Zellen in den jeweiligen Mausmodellen vermuten.



**Abbildung 10 Prozentualer Tfh-Zell-Anteil in SJL/J-EAE-Mäusen in ZNS und Dura mater mit Korrelation zum klinischen Symptomwert.**

Die SJL/J-EAE wurde mittels PLP<sub>139-151</sub> Peptid induziert. Die Organe wurden zu den verschiedenen Krankheitsstadien isoliert und zur weiteren Analyse zur Einzelzellsuspension aufbereitet. Die Zellen wurden mit einer Antikörpermischung immunmarkiert und mittels Durchflusszytometrie analysiert. **(A-D)** Die Prozentzahl der CXCR5<sup>+</sup> PD-1<sup>+</sup> Tfh-Zellen von den lebenden CD4<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup>CD45<sup>+</sup> Lymphozyten wurden an den unterschiedlichen Krankheitsstadien verglichen sowohl im ZNS **(A)** als auch in der Dura mater **(C)**. Anschließend wurde der prozentuale Tfh-Anteil der lebenden Lymphozyten des ZNS **(B)** und der Dura mater **(D)** mit dem klinischen Symptomwert korreliert.

Die Tfh-Zell-Prozente von allen vier Krankheitsstadien (Symptombeginn, Symptommaximum, Remission, Rezidiv) wurden jeweils für das ZNS und die Dura mater vereint und verglichen **(E)**.

**(F-G)** Die absoluten Zellzahlen der CD4<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup>CD45.2<sup>+</sup>CXCR5<sup>+</sup> PD-1<sup>+</sup> Tfh-Zellen von gesunden Wildtyp (WT) SJL/J-Mäusen wurden mit den absoluten Zellzahlen in ZNS **(F)** und Dura mater **(G)** der drei Krankheitsstadien der SJL/J-EAE verglichen.

Die Ergebnisse repräsentieren zwei unabhängige Experimente. Die statistischen Analysen wurden mittels *one-way ANOVA* gefolgt von *Tukey's multiple comparison test* **(A, C, E-G)** oder der linearen Regression **(B, D)** durchgeführt. \*p < 0.05; \*\*p < 0.01; \*\*\*p < 0.001. Die gezeigten Daten entsprechen dem Mittelwert ± Standardfehler.

(Abbildung abgewandelt publiziert in: *Baniahmad et al. (112)*)

Auch in der SJL/J-EAE wurden keine signifikanten Änderungen des Tfh-Zell-Anteils über den Krankheitsverlauf in den Peyer'schen Plaques festgestellt **(Abbildung 11 A)**. Eine Korrelation mit dem klinischen Symptomwert konnte ebenso nicht gezeigt werden **(Abbildung 11 B)**.

Insgesamt kann auch hier eine Auswirkung der Tfh-Zellen auf das lokal entzündete ZNS Gewebe vermutet werden, allerdings mit einem, im Kontrast zu der C57BL/6-EAE, anti-inflammatorischem Effekt. In beiden Mausmodellen scheinen die Tfh-Zellen besonders im zentralnervösen Gewebe eine Rolle zu spielen. Da die absoluten Zellzahlen den Verlauf der prozentualen Anteile der Tfh-Zellen von den CD4<sup>+</sup> Lymphozyten nicht widerspiegeln **(Abbildung 10 F-G)**, ist davon auszugehen, dass der Anteil im Verhältnis zu anderen T-Helfer-Zellen die wichtigere Rolle spielt.

Wie auch in der C57BL/6-EAE konnten keine Hinweise auf einen lokalen Einfluss des Mikrobioms auf die Tfh-Zellen der Peyer'schen Plaques gefunden werden.

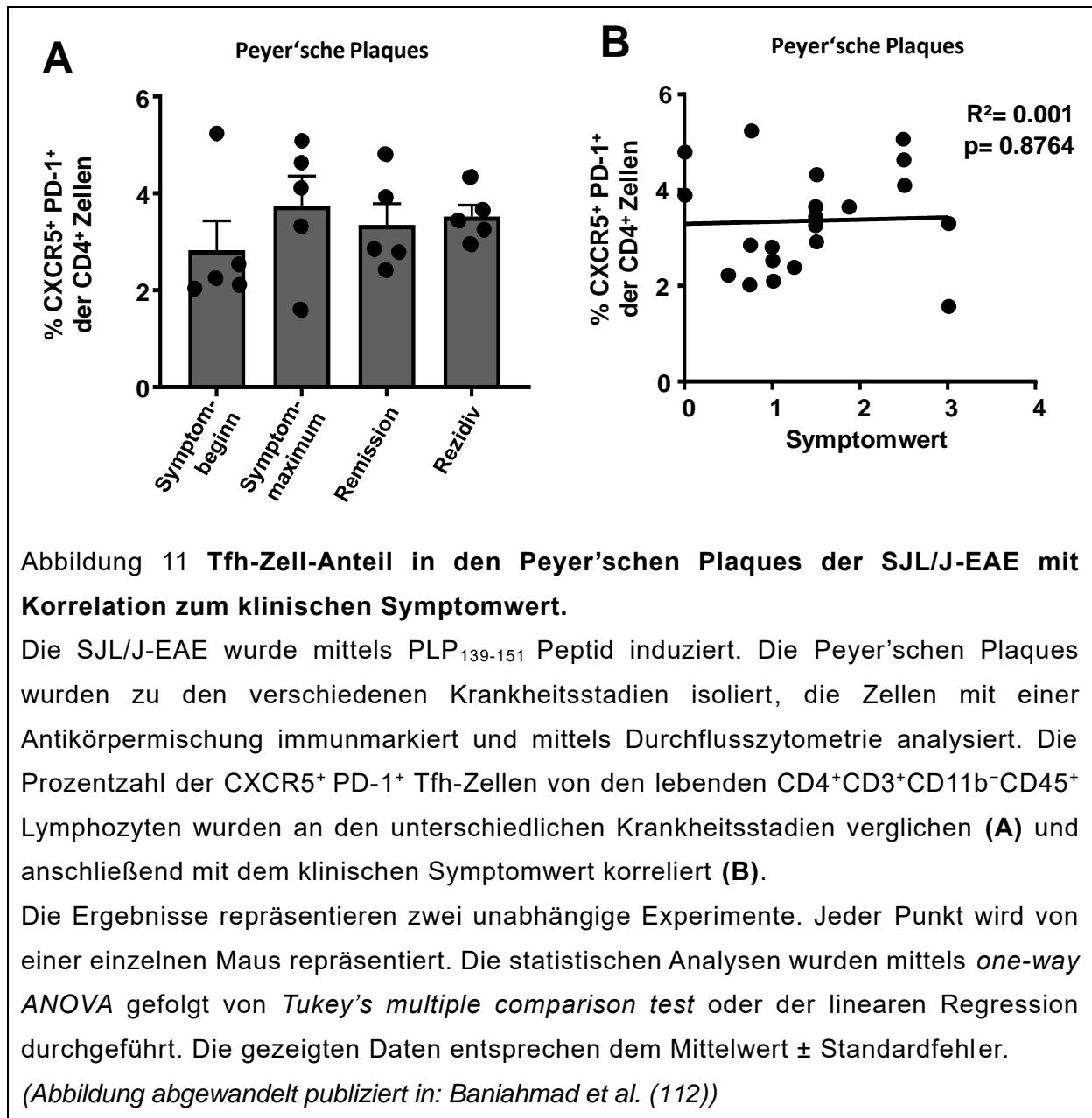


Abbildung 11 Tfh-Zell-Anteil in den Peyer'schen Plaques der SJL/J-EAE mit Korrelation zum klinischen Symptomwert.

Die SJL/J-EAE wurde mittels PLP<sub>139-151</sub> Peptid induziert. Die Peyer'schen Plaques wurden zu den verschiedenen Krankheitsstadien isoliert, die Zellen mit einer Antikörpermischung immunmarkiert und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die Prozentzahl der CXCR5<sup>+</sup> PD-1<sup>+</sup> Tfh-Zellen von den lebenden CD4<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup>CD45<sup>+</sup> Lymphozyten wurden an den unterschiedlichen Krankheitsstadien verglichen (A) und anschließend mit dem klinischen Symptomwert korreliert (B).

Die Ergebnisse repräsentieren zwei unabhängige Experimente. Jeder Punkt wird von einer einzelnen Maus repräsentiert. Die statistischen Analysen wurden mittels *one-way ANOVA* gefolgt von *Tukey's multiple comparison test* oder der linearen Regression durchgeführt. Die gezeigten Daten entsprechen dem Mittelwert  $\pm$  Standardfehler.

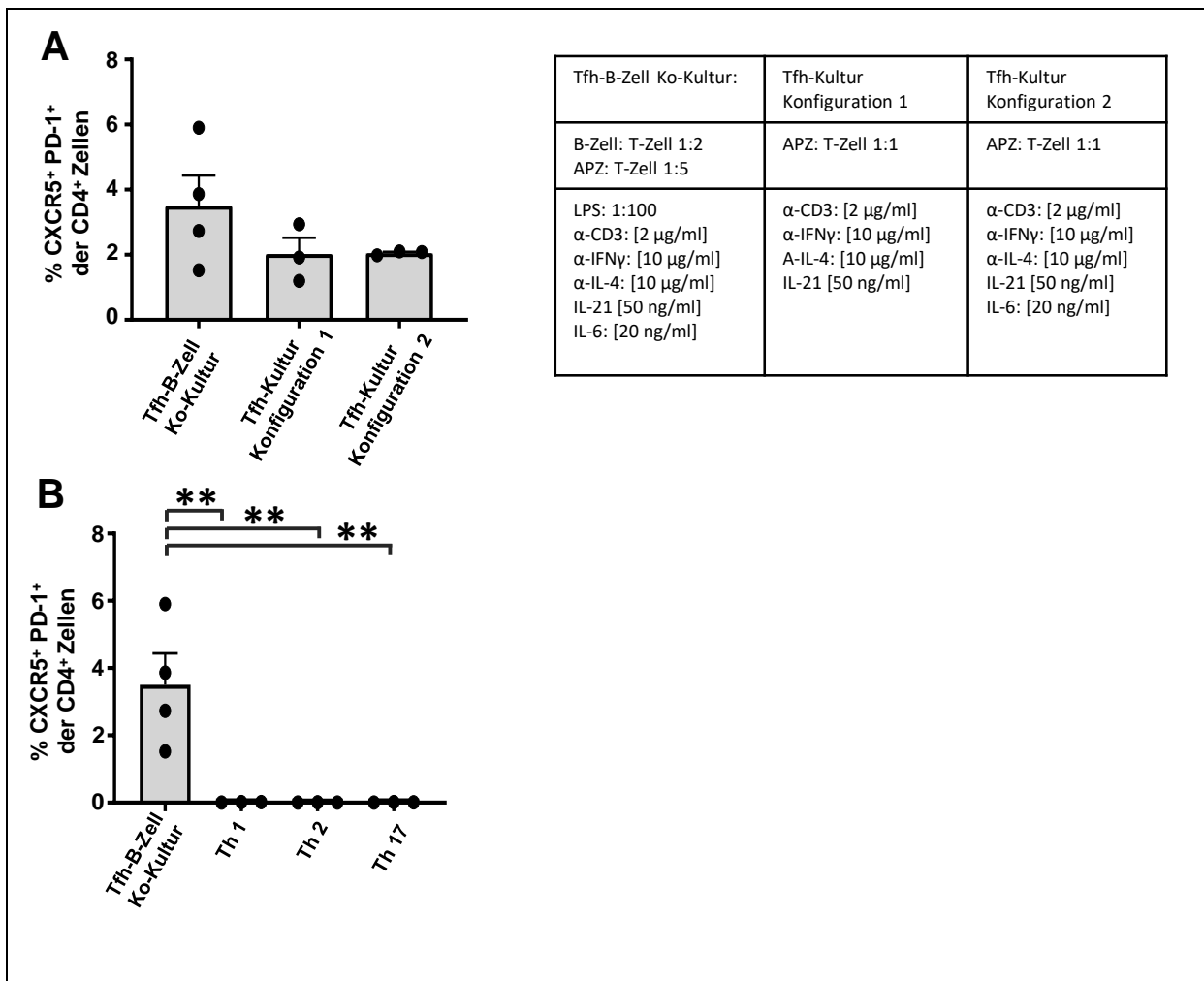
(Abbildung abgewandelt publiziert in: Baniahmad et al. (112))

#### 4.4 Tfh-polarisierte Zellen können mit einer B-Zell Ko-Kultur generiert werden.

Um die Funktion und Plastizität von Tfh-Zellen besser verstehen zu können, wurde die Entwicklung eines Protokolls zur *in vitro* Differenzierung von Tfh-polarisierten Zellen angestrebt. Da die Basis der *in vitro* Zellkultur magnetisch sortierte CD4<sup>+</sup> naive T-Helfer-Zellen sind, konnte hierbei auf den Ausschluss von Nicht-Leukozyten sowie myeloider Zellen verzichtet werden und die Zielpopulation als CXCR5 und PD-1 doppelpositive CD4<sup>+</sup> T-Helfer-Zellen definiert werden. Die Differenzierung von Tfh-

Zellen ist, wie bereits beschrieben, bisher noch nicht komplett erforscht und aufgeklärt. So ergaben sich bereits bei der Reproduktion und Modifikation der existenten Protokolle (108, 116) Abweichungen. Bei drei verschiedenen Konfigurationen mit unterschiedlichen Zytokinzusammensetzungen und Verhältnissen zwischen T-Zellen und antigenpräsentierende Zellen (APZ's), wurde eine modifizierte Form des B-Zell Ko-Kultur Protokoll von *Kolenbrander et al. (108)* als am effektivsten bei der Generation von CXCR5<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup> T-Helfer-Zellen identifiziert. Es erfolgte eine Anpassung der Zytokinkonzentrationen (hier: 2 µg/ml Anti-CD3, 20 ng/ml IL-6, 50 ng/ml IL-21, 10 µg/ml Anti-IL-4 and 10 µg/ml Anti-IFN $\gamma$ ) sowie die Ko- Kultivierung mit CD90<sup>-</sup> Milzzellen anstelle dendritischer Zellen. Trotz der Optimierungen blieb der generelle Anteil von Tfh- polarisierten Zellen bei allen Konfigurationen gering (**Abbildung 12 A**).

In etablierten T-Helfer-Zellen *in vitro* Kulturen anderer Subtypen (Th1, Th2, Th17) zeigte sich keine Differenzierung zu CXCR5<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup> T Helfer Zellen, was darauf schließen lässt, dass dies ein einzigartiges Charakteristikum der kultivierten Tfh-polarisierten Zellen ist (**Abbildung 12 B**).



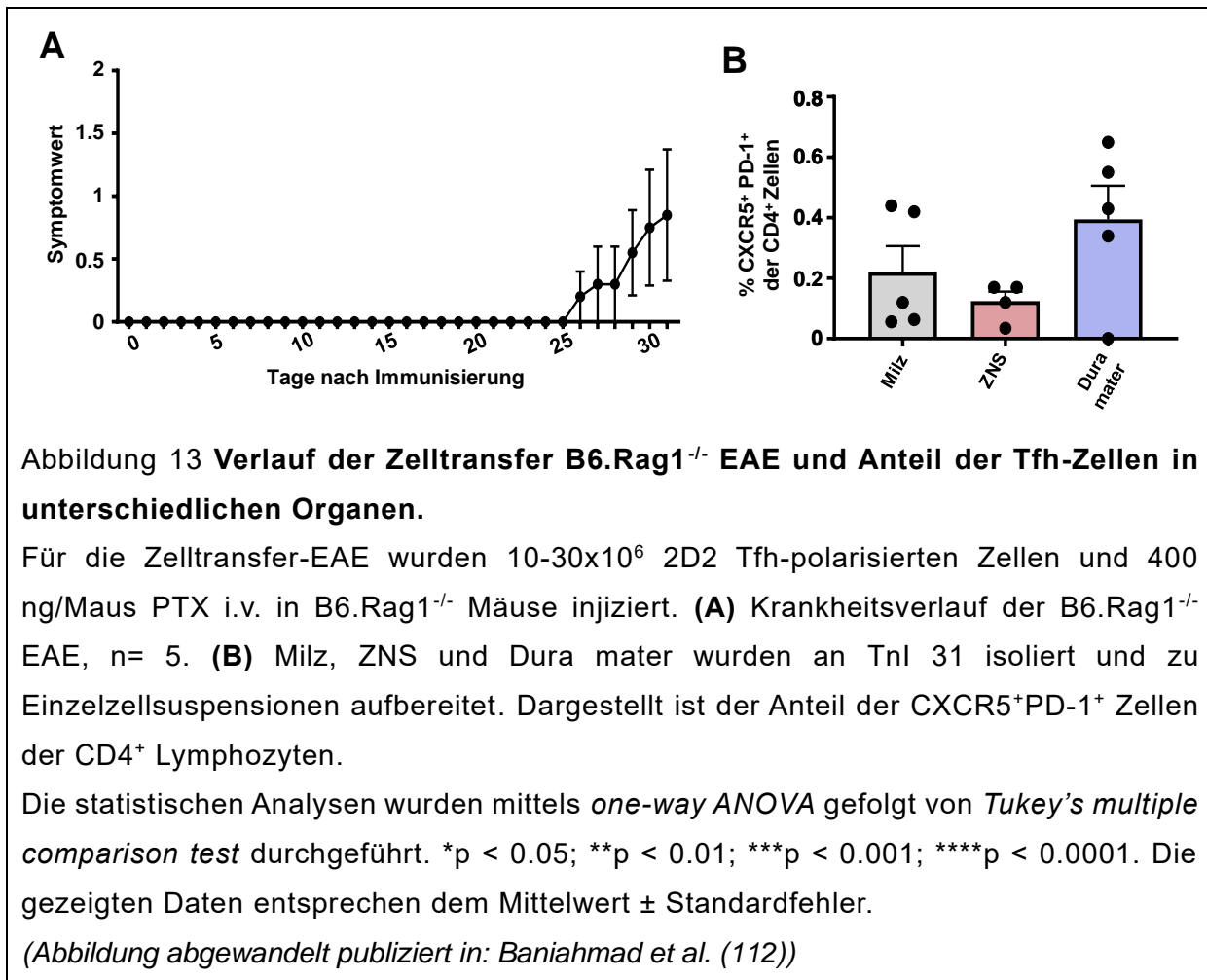
**Abbildung 12 Vergleich unterschiedlicher Konditionen zur in vitro Differenzierung von Tfh-Zellen.**

Naive CD4<sup>+</sup> T-Helfer-Zellen wurden aus Milz und Lymphknoten von gesunden C57BL/6 Mäusen isoliert. **(A)** Die Kultivierung von Tfh-Zellen erfolgte in vitro unter unterschiedlichen Bedingungen: Tfh-B-Zell Ko-Kultur mit einem B-Zell-T-Zell Verhältnis von 1:2 und einem APZ-T-Zell Verhältnis von 1:5 in der Präsenz von 2 µg/ml anti-CD3, 20 ng/ml IL-6, 50 ng/ml IL-20, 10 µg/ml anti-IL-4 und 10 µg/ml anti-IFN $\gamma$ . Zwei verschiedene Konfigurationen von Tfh Kulturen mit einem APZ-T-Zell-Verhältnis von 1:1 in der Präsenz von einer ähnlichen Zytokinmischung, wobei Konfiguration 1 ohne IL-6, und Konfiguration 2 mit 20 ng/ml IL-6 durchgeführt worden ist. **(B)** Die durchflusszytometrische Analyse von Tfh-polarisierten Zellen (CXCR5<sup>+</sup>PD-1\* der CD4<sup>+</sup> Zellen) erfolgte in Th1-, Th2- und Th17-Kulturen im Vergleich zu der Tfh-B-Zell Ko-Kultur. Tfh-B-Zell Ko-Kultur n= 4, Tfh-Kultur Konfiguration 1 n= 3, Tfh-Kultur Konfiguration 2 n= 3, Th1-Kultur n= 3, Th2-Kultur n= 3, Th17-Kultur n= 3. Die statistischen Analysen wurden mittels *one-way ANOVA* gefolgt von *Tukey's multiple comparison test* durchgeführt. \*p < 0.05; \*\*p < 0.01. Die gezeigten Daten entsprechen dem Mittelwert  $\pm$  Standardfehler.

(Abbildung abgewandelt publiziert in: Baniahmad et al. (112))

#### **4.5 Der Transfer von *in vitro* kultivierten Tfh-polarisierten Zellen induziert Symptome einer EAE in B6.Rag1<sup>-/-</sup> Mäusen.**

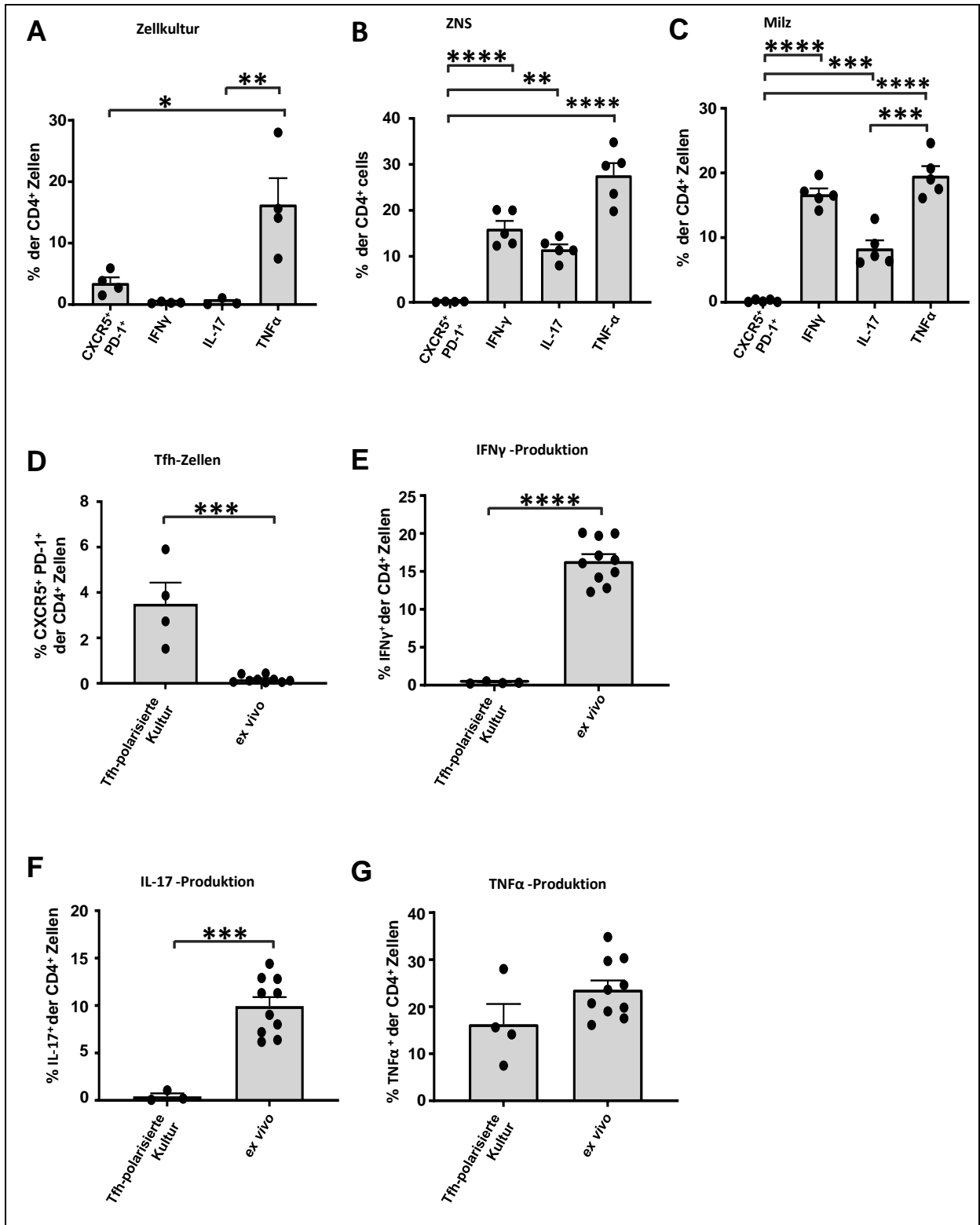
Trotz der erhöhten Aufmerksamkeit, die den Tfh-Zellen im Verlauf einer EAE in den letzten Jahren zuteilgeworden ist, sowie den Versuchen, Tfh-*in vitro*-Kulturen zu generieren, gibt es noch keine Daten über die Stabilität der *in vitro* differenzierten Tfh-polarisierten Zellen *in vivo*. Um hierüber zu mehr Aufschluss zu gelangen, wurden die kultivierten Tfh-polarisierten Zellen in B6.Rag1<sup>-/-</sup> Mäuse transferiert. Diese Mäuse sind genetisch verändert und besitzen keine reifen B- und T-Lymphozyten (106), sodass eine intrinsische T-Zell-Aktivität, sowie eine ausschließliche Wirkung der Tfh-polarisierten Zellen über B-Zell Aktivierung ausgeschlossen werden konnte. Die Isolation der Organe erfolgte am Tnl 31. Als peripheres Vergleichsorgan wurde hierbei die Milz analysiert.



Verglichen mit dem Verlauf, der typischerweise bei einer Zelltransfer-EAE nach Transferierung von proinflammatorischen Th17-Zellen induziert wird (117, 118) zeigte sich der Symptombeginn der EAE nach Immunisierung mit Tfh-polarisierten Zellen verspätet und der Progress und die Symptome stellte sich milder dar (**Abbildung 13 A**). Somit kann von einer geringeren Kapazität der EAE-Induktion ausgegangen werden. Zu beachten ist, dass sich die prozentualen Anteile der Tfh-Zellen an Tnl 31 in allen analysierten Organen unter 1 % befanden (**Abbildung 13 B**) und man somit von einem instabilen Phänotyp der *in vitro* generierten Tfh- polarisierten Zellen *in vivo* ausgehen muss. Bei dem Vergleich der Zytokinlevel der Tfh-polarisierten Zellen der *in vitro* Kultur am Tag des Transfers (**Abbildung 14 A**) mit den Zytokinlevel des Tfh-Zell-Anteils in ZNS (**Abbildung 14 B**) und Milz (**Abbildung 14 C**) am Tag der Organisation zeigten sich erhöhte Produktionen von IFN $\gamma$  und IL-17 *ex vivo* (**Abbildung 14 D+E**). Der Anteil der Tfh-Zellen hingegen sank gegen null in beiden Organen (**Abbildung 14 F**). Der Tumornekrose-Faktor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) wird unter anderem von aktivierten T-Zellen produziert (119) und zeigte hier, dass sowohl die *in vitro* Zellkultur als auch die aus den Organen entnommenen T-Zellen dasselbe Aktivitätslevel aufwiesen (**Abbildung 14 G**).



Dies zeigt, dass von den untersuchten Protokollen das gewählte Protokoll zur *in vitro* Kultivierung zwar den höchsten Gewinn an Tfh-polarisierten Zellen erbringt, diese allerdings einen instabilen Phänotyp *in vivo* präsentieren, weshalb weitere Rückschlüsse aus den aktuell verfügbaren *in vitro*-generierten Kulturen folglich mit Vorsicht interpretiert werden sollten.



**Abbildung 14 Analyse der Tfh-Dynamik und Zytokinproduktion ex vivo im Vergleich mit der Tfh-polarisierten Zellkultur.**

**(A-C)** Analyse des Anteils der Tfh-polarisierten Zellen sowie die Bestimmung der Produktion von IFN $\gamma$ , IL-17 und TNF $\alpha$  in der T-Zell- B-Zell Ko-Kultur (n= 4) **(A)**, dem ZNS **(B)** sowie der Milz **(C)** der B6.Rag1<sup>-/-</sup> Mäuse an Tnl 31 (n= 5). Zur Untersuchung der Tfh-Zell- und Zytokin- Dynamik wurden der Anteil von CXCR5<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>-Zellen **(D)**, die IFN $\gamma$ -Produktion **(E)**, die IL-17-Produktion **(F)** und die TNF $\alpha$ -Produktion **(G)** in der in vitro Tfh-polarisierten Kultur am Tag der Immunisierung mit den vereinten Daten von ZNS und Milz ex vivo am Tag der Organisolation verglichen.

Die statistischen Analysen wurden mittels *one-way ANOVA* gefolgt von *Tukey's multiple comparison test* durchgeführt. \*p < 0.05; \*\*p < 0.01; \*\*\*p < 0.001; \*\*\*\*p < 0.0001. Die gezeigten Daten entsprechen dem Mittelwert  $\pm$  Standardfehler.

*(Abbildung abgewandelt publiziert in: Baniahmad et al.,(112))*

## 5 Diskussion

Die Forschung zum Thema Multiple Sklerose hat in den letzten Jahren einen rasanten Aufschwung erlebt. Besonders für die medikamentöse Behandlung haben viele Arzneimittel in kurzer Zeit ihre Zulassung erhalten, sodass eine Anpassung der Therapie an den individuellen Verlauf möglich ist. Aber auch die Ursachenforschung der Erkrankung nimmt einen großen Teil der Forschungsarbeit ein. Obwohl man anfänglich davon ausgegangen ist, dass MS eine T-Zell-vermittelte Autoimmunerkrankung ist, gibt es mittlerweile ausreichend Hinweise über eine Beteiligung von B-Zellen an den neuroinflammatorischen Prozessen (52, 120-122). Folglich sind auch die Tfh-Zellen in ihrer B-Zell-aktivierenden Rolle (81, 88, 123) in den Fokus der Wissenschaft geraten. Nachdem bereits ein proinflammatorischer Einfluss in anderen autoimmunologischen Krankheitsbildern beschrieben worden war (95-97, 124), rückte die Untersuchung der Rolle von Tfh-Zellen in MS und dem Mausmodell EAE in den Mittelpunkt (101-104). Trotzdem wird dieser Themenkomplex noch stark debattiert, jedoch erschwert das Fehlen von standardisierten Ansätzen und einheitlichen Markern die funktionalen Analysen und Vergleichbarkeit. Bereits die eindeutige Identifizierung von Tfh-Zellen gestaltet sich als schwierig, da es keine einheitliche Standardisierung der Oberflächenmarker gibt.

Initial wurden die Tfh-Zellen in humanen Tonsillen gefunden und als T-Helfer-Subgruppe mit Expression des B-Zell-*Homing*-Rezeptors CXCR5 beschrieben (81). Dieser Rezeptor ist das wichtigste Bindeglied bei der Interaktion mit B-Zellen und ermöglicht die Migration in die B-Zell-Follikel (82, 125). CXCR5 wird allerdings auch von anderen Zelllinien exprimiert, sodass eine Charakterisierung allein durch CXCR5 nicht zielführend ist. Neben CXCR5 wird auch PD-1 von Tfh-Zellen exprimiert (88, 126, 127). Besonders die im Keimzentrum von Follikeln lokalisierten Tfh-Zellen regulieren diesen Oberflächenmarker hoch (88, 94, 128). Allerdings wird auch PD-1 von anderen Zelllinien exprimiert (129, 130), sodass vor allem die Kombination CXCR5 und PD-1 doppelpositiv nun vermehrt zur Identifizierung von Tfh-Zellen benutzt wird (126). Auch in dieser Arbeit wurden die Oberflächenmarker CXCR5 und PD-1 als Basis der Charakterisierung herangezogen. Durch Ausschluss von CD11b<sup>+</sup> Zellen wurde die Kontamination von Makrophagen und Granulozyten

verhindert. Durch Fokussierung auf CD45<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup> Zellen konnte die genaue Eingrenzung auf T-Helfer-Zellen erfolgen. Wichtig für die Identifizierung von Tfh-Zellen ist der Transkriptionsfaktor Bcl-6, der als Regulator der Differenzierung gilt, aber auch in Follikel lokalisierten B-Zellen zu finden ist (131).

Zur Aktivität der Tfh-Zellen gehört die Ausschüttung des Zytokins IL-21, welches eine Rolle in der Induktion von Plasmazellen und Proliferation von B-Zellen spielt (88, 132).

Sowohl Bcl-6 als auch IL-21 konnten bei der oben beschriebenen Zielpopulation nachgewiesen werden und bestätigen somit die Identifizierung als Tfh-Zellen. Beide Marker besitzen keine hundertprozentige Spezifität für Tfh-Zellen und können von anderen Zelllinien ebenfalls exprimiert werden. Diese uneinheitliche Charakterisierung erschwert die Vergleichbarkeit zwischen den Forschungsgruppen. So war in dieser Arbeit eine möglichst genaue Erfassung der Tfh-Zellen mit Hilfe von vielen Oberflächenmarkern folglich für die weiteren Experimente von großer Bedeutung.

Um Vergleiche mit anderen Mausmodellen anstreben zu können, wurden durchflusszytometrische Untersuchungen von der Tfh-Dynamik in der chronisch-progressiv mimenden C57BL/6-EAE durchgeführt.

Die zu diesem Mausmodell kürzlich veröffentlichten Arbeiten zeigten korrelativ zu der inflammatorischen Phase von C57BL/6-EAE-Mäusen eine vermehrte Tfh-Zell-Ansammlung im zentralnervösen Gewebe (102, 103). Auch in dieser Dissertation wurde ein Anstieg von Tfh-Zellen im ZNS von C57BL/6-EAE-Mäusen im Symptommaximum der Erkrankung beobachtet. Somit konnten die zuvor publizierten Beobachtungen unterstützt werden. Dies legt folglich eine proinflammatorische Einflussnahme von Tfh-Zellen im Entzündungsgeschehen besonders im ZNS von C57BL/6-Mäusen nahe.

Durch die Unterstützung der B-Zell-Aktivität fördern Tfh-Zellen die Bildung von Follikeln. Solche Follikelstrukturen befinden sich in sekundär lymphatischem Gewebe, wie in Lymphknoten oder in der Milz. Ektopische lymphoide Strukturen (ELS) weisen einen follikelähnlichen Aufbau auf und wurden unter anderem im ZNS von MS-Patienten und EAE-Mäusen, besonders im Bereich der inneren Hirnhäute, den Leptomeningen, gefunden (56, 58).

Die Dura mater stand, trotz ihrer reichlichen Anzahl an Gefäßen, nicht im Fokus der MS-Forschung. Wie eine Brücke zwischen den peripheren und zentralen

nervalen Strukturen kann die Dura mater inflammatorischen Prozessen einen möglichen Zugang zum zentralnervösen Gewebe bieten und kann somit als Verbindungsstruktur von großer Bedeutung sein. In MS-Patienten wurde kürzlich eine vermehrte Kontrastmittelanreicherung im MRT in der Dura mater gesehen, was auf entzündliche Prozesse in diesem Bereich hindeutet (133).

Zur Untersuchung der Beteiligung an inflammatorischen Prozessen wurde die Dura mater in dieser Arbeit durchflusszytometrisch untersucht.

Im Vergleich zu gesunden Mäusen konnte eine Anreicherung von Tfh-Zellen in dem inflammatorischen Stadium sowohl in C57BL/6-EAE-Mäusen, als auch in SJL/J-EAE-Mäusen beobachtet werden, was ihre Rolle während der inflammatorischen Erkrankung bestärkt.

Zusätzlich konnte in beiden EAE-Modellen beobachtet werden, dass insgesamt unabhängig vom Krankheitsstadium mehr Tfh-Zellen in der Dura mater lokalisiert waren als im ZNS.

Ob sich hier folliculäre Strukturen gebildet haben, ist noch unklar, weshalb eine histologische Präparation und Analyse sinnvoll wäre. Darüber hinaus wären weitere Untersuchungen über den Ursprung der infiltrierenden Tfh-Zellen von Interesse, denn unklar bleibt noch, ob die Infiltration beispielsweise von der peripheren Blutversorgung kommt oder sekundär über das Inflammationsgeschehen im ZNS herbeigeführt wird.

Folliculäre Strukturen kommen physiologisch als sekundär lymphatisches Gewebe auch im Intestinum vor. Die Peyer'schen Plaques stellen eine wichtige Schaltstelle für das Immunsystem im Darm dar und scheinen auch in der EAE einen immunoregulatorischen Aspekt innezuhaben (134, 135).

Sowohl in der C57BL/6-EAE als auch in der SJL/J-EAE zeigte der Tfh-Anteil in den Peyer'schen Plaques keine Dynamik, was Hinweise darauf gibt, dass die peripher in den Darmfollikel gelegenen Tfh-Zellen Krankheitsphasen-unabhängig fungieren.

In B6.Rag1<sup>-/-</sup>-EAE-Mäuse waren keine Peyer'schen Plaques makroskopisch sichtbar, was durch die Abwesenheit von B-Zellen erklärbar ist.

Lange Zeit galt die durch MOG<sub>35-55</sub>-induzierte C57BL/6-EAE als B-Zell-unabhängig. In diesem Sinne konnte gezeigt werden, dass Mäuse trotz B-Zell-Depletion bei Injektion mit dem MOG<sub>35-55</sub>-Peptid ebenso schwer wie Wildtyp-Mäuse erkrankten (136). Aktuelle Forschungsergebnisse deuten allerdings auf eine Beteiligung der B-Zellen in der Pathogenese der MOG<sub>35-55</sub>-induzierten

EAE hin, sodass dieses Modell zunehmend für Untersuchungen von B-Zellen in der EAE Anwendung findet. So wurde unter anderem gezeigt, dass eine Depletion der B-Zellen vor der MOG<sub>35-55</sub>-Immunisierung sogar zu einem verschärften Krankheitsverlauf führt. Darüber hinaus bewirkte eine B-Zell-Depletion während des Symptommaximums eine Verbesserung der EAE-Symptome (137). Eine weitere Studie zeigt, dass eine MOG<sub>35-55</sub>-induzierte Zelltransfer-EAE mit B-Zellen und Tfh-Zellen zu keinen Veränderungen in dem Symptombeginn, allerdings zu einer Verspätung der Remission führte (103). Daraus lässt sich schlussfolgern, dass eine Beteiligung von B-Zellen mit regulatorischer Einflussnahme bei Krankheitsinduktion mit MOG<sub>35-55</sub> möglich ist und dass die proinflammatorische B-Zell-Aktivität bei diesem Krankheitsmodell insbesondere im späteren Verlauf relevant wird. Insgesamt kann gesagt werden, dass die durch MOG<sub>35-55</sub>-induzierte EAE nicht als B-Zell-unabhängig einzuordnen ist. Die kürzlich erschienenen Arbeiten, die sich mit dem Thema der Rolle von Tfh-Zellen in der EAE befassten, nutzten die Immunisierung mit MOG<sub>35-55</sub> (99, 102, 103). Auch in dieser Arbeit kann die Tfh-Zell-Erhöhung in der Inflammation indirekt als eine B-Zell-Beteiligung in der mit MOG<sub>35-55</sub>-induzierten C57BL/6-EAE interpretiert werden, wobei eine B-Zell-unabhängige Wirkung der Tfh-Zellen nicht auszuschließen ist.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zum ersten Mal Tfh-Zellen in mehreren Mausmodellen untersucht, die unterschiedliche Krankheitsverläufe nachahmen (29, 30). Neben der C57BL/6-EAE, die den Verlauf einer chronischen MS widerspiegelt, wurde auch der Progress einer schubförmig-remittierenden MS mit Hilfe der SJL/J-EAE dargestellt. Die Daten suggerieren hier eine gegensätzliche Dynamik der Tfh-Zellen. Interessanterweise konnte der höchste Tfh-Anteil im ZNS und auch in der Dura mater in dem nicht-inflammatorischen Stadium der Remission gefunden werden, mit einem Abfall zum Rezidiv hin. Folglich würden Tfh-Zellen in diesem Modell eher die Remission der entzündlichen Aktivität unterstützen.

Ursächlich für die unterschiedliche Tfh-Zell-Aktivität in der C57BL/6-EAE und der SJL/J-EAE könnten unterschiedliche immunologische Variationen zwischen den Mausstämmen sein (138, 139). SJL/J-Mäusen wird eine Reihe von immunologischen Besonderheiten zugesagt. So soll ein Genpolymorphismus im Vergleich zu C57BL/6-Mäusen die Aktivität des Zytokins IL-12 steigern, während es die Produktion des Zytokins IL-4 einschränkt (140, 141). Eine

Studie konnte eine Suppression der Tfh-Zell-Differenzierung unter Applikation von IL-12 nachweisen. Eine Verstärkung des Transkriptionsfaktor T-bet, welcher die Tfh-Zell-Differenzierung unterdrückt und die Th1-Zell-Entwicklung unterstützt, wird vermutet (142). Folglich könnte die stark erhöhte IL-12-Aktivität in den Entzündungsstadien von SJL/J-Mäusen die Tfh-Differenzierung hemmen. Da Tfh-Zellen selbst IL-4 produzieren, wäre die Aktivität bei vorliegendem Genpolymorphismus vermutlich reduziert. Die Abnormitäten von beiden Interleukinen könnten demnach die Tfh-Zell-Funktion im Rahmen der autoentzündlichen Erkrankung modifizieren.

Zudem wurde bereits gezeigt, dass das B-Zell-T-Zell-Verhältnis sich in den beiden oben genannten Mausstämmen unterscheidet. Während der Anteil der B-Zellen in C57BL/6-Mäusen höher ist als in SJL/J-Mäusen, kehrt sich das Bild beim Anteil der CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Helfer-Zellen (143). Ob die B-Zellen auch unterschiedliche Aktivität zeigen, ist noch nicht ausreichend untersucht. Es gibt jedoch Hinweise, dass B-Zellen in der immunologischen Antwort bei einer Neuroinflammation entgegenstehende Rollen einnehmen können (137, 144, 145). So ist das B-Zell-depletierende Ocrelizumab bereits für die MS zugelassen und führt hier auch zu einem Rückgang der Symptome (52). Die Phase-II-Studie für ein anderes B-Zell-depletierendes Medikament, Atacicept, musste allerdings aufgrund einer erhöhten Rezidiv-Rate im Vergleich zur Kontrollgruppe abgebrochen werden (146). Der genaue Grund für die Krankheitsverschlechterung ist nicht geklärt. Es wurde aber vermutet, dass die Anwendung von Atacicept zu einer unvollständigen B-Zell-Depletion führt und zu einem Ungleichgewicht von proinflammatorischen B-Zellen und den antiinflammatorischen regulatorischen B-Zellen (Bregs) führt.

Bregs sind eine Subpopulation von B-Zellen, die durch die Ausschüttung des Zytokins IL-10 zu einer antiinflammatorischen Immunantwort beitragen (147). In der EAE sind sie beteiligt an der Immunsuppression und der Genesung (137, 148). Sind die B-Zellen durch das Atacicept also zu Ungunsten der Bregs unterdrückt, kann es zu einer Verschlechterung der Entzündungssymptomatik kommen.

In der C57BL/6-EAE deutet die in dieser Dissertation beobachtete Tfh-Zell-Erhöhung in Dura mater und ZNS auf eine Verstärkung der proinflammatorischen B-Zell-Antwort, während die negative Korrelation von Tfh-Zellen mit dem klinischen Symptomwert im ZNS der SJL/J-EAE-Mäuse auf eine Unterstützung der antiinflammatorischen Bregs hindeuten kann.

Da regulatorische Funktionen von B-Zellen bekanntermaßen für Remissionsprozesse wichtig sind (149), könnte eine überwiegende Aktivierung von Bregs in SJL/J-Mäusen auch die Ursache für die stärkere Remission bei SJL/J-EAE im Vergleich zu C57BL/6-EAE sein.

Neben Bregs spielen auch regulatorische Tfh-Zellen (Tfr) eine Rolle in der Autoregulation von Entzündungsreaktionen. Diese erst kürzlich beschriebene Tfh-Zell-Subpopulation besitzt einen ähnlichen Phänotyp wie die Tfh-Zellen mit zusätzlicher Expression des Regulationsfaktor FoxP3<sup>+</sup> und wirkt antiinflammatorisch indem Tfh-Zell- und B-Zell-Aktivität gehemmt wird (150, 151). In MS-Patienten konnte eine Dysregulation der Tfh- und Tfr-Zellen mit einer Erhöhung der proinflammatorischen Tfh-Zellen und einer Erniedrigung der antiinflammatorischen Tfr-Zellen beobachtet werden (152). Ein erhöhtes Tfh/Tfr- Verhältnis scheint mit der intrathekalen IgG-Synthese in MS-Patienten zu korrelieren (153). Da in dieser Arbeit nicht zwischen Tfh-Zellen und FoxP3<sup>+</sup> Tfr-Zellen differenziert wurde, besteht folglich die Möglichkeit, dass der beobachtete Anstieg der CXCR5<sup>+</sup> T-Helfer-Zellen in der Remission der SJL/J-EAE vor allem auf einer Ansammlung und Proliferation von Tfr-Zellen beruht, die die Krankheitsaktivität herunterregulieren. In den C57BL/6-EAE Mäusen scheinen die B-Zell-unterstützenden Tfh-Zellen in den inflammatorischen Stadien zu dominieren. Zur genauen Differenzierung wäre die Tfh/Tfr-Verhältnisse Bestimmung in weiteren Experimenten zielführend.

Da nur der prozentuale Anteil der Tfh-Zellen, aber nicht die absolute Zellzahl während der Remission der SJL/J-EAE erhöht war und mit dem Symptomwert signifikant negativ korreliert, kann angenommen werden, dass besonders der relative Anteil der Tfh-Zellen an den gesamten T-Helfer-Zellen im Vergleich zu anderen Subgruppen von Bedeutung ist.

Zur weiteren Untersuchung der Rolle der Tfh-Zellen wären histologische Färbungen bezüglich der Beurteilung der Tfh-Zell-Dynamik und Lokalisation in den einzelnen Organen mit Anfärbung von B-Zell-Follikeln und Tfh-Zell-Oberflächenmolekülen in jedem Stadium des EAE-Verlaufes anzudenken. Vor allem in der Dura Mater wäre es von Interesse zu ermitteln, ob sich follikuläre Strukturen in der Entzündungsphase darstellen können. In diesem Fall sollte dargestellt und beobachtet werden, ob jene über die Remissionen dort verbleiben und somit den erhöhten Tfh-Anteil erklären könnten, oder ob die Dynamik hier ein anderes Bild zeigt.

Die Identifizierung der einzelnen Interaktionen zwischen Tfh-Zellen mit den einzelnen B-Zell-Subtypen ist ein wichtiger weiterer Schritt.



Um die B-Zell-unabhängige Eigenaktivität der Tfh-Zellen zu ermitteln, wurden *in vitro* kultivierte Tfh-polarisierten Zellen in immundepletierte B6.Rag1<sup>-/-</sup>-Mäuse injiziert und beobachtet. Hier wurde eine Änderung der Phänotypen von CXCR5 und PD-1 positiven Tfh-Zellen zu IL-17 und IFN $\gamma$  produzierenden T-Helfer-Zellen beobachtet. Obwohl die Zahl der transferierten Tfh-Zellen mit 7% niedrig war, war dieser Phänotypenwechsel zu pro-inflammatorischen T-Helfer-Zellen ausreichend, um milde EAE-Symptome in den B6.Rag1<sup>-/-</sup>-Mäusen zu induzieren. Ursächlich für den Phänotypenwechsel kann die Tfh-Plastizität sein, also die Flexibilität, sich trotz der Differenzierung zu Tfh-Zellen, den Phänotyp von anderen T-Helfer-Subgruppen anzunehmen (154).

Die Plastizität und *in vivo* Stabilität von Tfh-Zellen ist noch nicht ausreichend untersucht. Es ist allerdings bekannt, dass die Bcl-6-Expression durch Unterdrückung des Blimp-1-Signalweges die Differenzierung zu Nicht-Tfh T-Helfer-Zellen limitiert (84).

So wurde gezeigt, dass unter bestimmten Umgebungskonditionen Tfh-Zellen in der Lage sind, Charakteristika von anderen T-Helfer-Zelllinien zu zeigen. Es wurden Tfh-Zellen beobachtet, die unter Infektionen mit starken induktiven Signalen für Th1-Zellen, IFN $\gamma$  produzierten (84, 94, 155). Die Th2-Zell-typische IL-4-Produktion kann sowohl in Abhängigkeit oder unabhängig von weiteren Th2-Charakteristika vorkommen, sodass zu Beurteilung von der Plastizität die IL-4-Produktion nicht allein betrachtet werden darf (88, 156). Allerdings zeigte die Untersuchung von IL-5 oder IL-13 in Kombination mit GATA3 im Rahmen einer Th2-aktivierenden Schistosoma-Infektion, dass Th2-Charakteristika von Tfh-Zellen präsentiert werden können (157). Es gibt auch erste Hinweise auf Tfh-Zellen mit Th17-ähnlichem Phänotyp (158).

Andersherum wurde demonstriert, dass sich andere T-Helfer-Zelllinien Eigenschaften von Tfh-Zellen aneignen können. Peters et al. beobachteten Th17-Zellen, die in EAE-Mäusen unter anderem CXCR5 und Bcl-6 exprimierten und somit einen Tfh-ähnlichen Phänotyp annahmen (101).

Bisher wurde demnach gezeigt, dass Charakteristika von anderen T-Helfer-Zelllinien ko-exprimiert worden sind. Ein vollständiger Phänotypenwechsel, wie in dieser Arbeit suggeriert werden würde, konnte bisher noch nicht beobachtet werden, sodass die Möglichkeit einer Differenzierung von mitinjizierten naiven T-Helfer-Zellen zu proinflammatorischen Th1- und Th17-ähnliche Zellen in Betracht gezogen werden sollte. Demnach würden die Tfh-polarisierten Zellen *in vivo* untergehen und die unter Einfluss unbekannter Faktoren differenzierten

Th1- und Th17-ähnliche Zellen zu der symptomverursachenden Neuroinflammation in den B6.Rag1<sup>-/-</sup>-Mäusen führen.

Zur Unterscheidung und weiteren Untersuchungen dahingehend müssen weiterführend die *in vitro* Zellkulturbedingungen überarbeitet und optimiert werden, um einen stabileren Tfh-Phänotyp zu generieren und somit weitere Fragen zur Tfh-Plastizität und Eigenaktivität *in vivo* zu klären und weitere Interpretationen zuzulassen. Durch die noch zum Teil unbekanntem Differenzierungsschritte von naiven T-Zellen zu Tfh-Zellen wird die Entwicklung einer hochreinen *in vitro* Tfh-Kultur mit derselben Aktivität und Funktion wie Tfh-Zellen *in vivo* eine Herausforderung. Nur das modifizierte Protokoll von Kohlebrander *et al.* (108) zeigte eine, wenn auch geringe, Differenzierung zu Tfh-Zellen. Da diese *in vitro* den Phänotyp mit den Oberflächenmarker CXCR5 und PD-1 Tfh-Zellen besitzen, allerdings kein Nachweis über eine *in vivo*-Funktionalität erbracht worden ist und keine vollständige Differenzierung erreicht wurde, werden die Zellen hier als Tfh-polarisiert bezeichnet. Um die Funktionalität zu verifizieren, sollte die IL-21 Produktion gemessen werden und Interaktionen mit B-Zellen mikroskopisch dargestellt werden.

Bei erfolgreicher Etablierung einer *in vitro* Tfh-Reinkultur mit bewiesener *in vivo* Funktion wäre es sinnvoll, die Zelltransfer EAE mit B6.Rag1<sup>-/-</sup>-Mäusen zu wiederholen und zu beobachten, ob sich wieder das Bild einer Phänotypenänderung zeigt und somit die Theorie des Phänotypenwechsels von Tfh-Zellen auf Th1- oder Th17-Zellen bekräftigt, oder die Mäuse, wie bei einer Tfh-Zell-Kultur zu erwarten gewesen wären, einen unauffälligen Verlauf zeigen und somit gesund bleiben. Im nächsten Schritt kann eine Ko-Immunisierung mit B-Zellen und Tfh-Zellen durchgeführt werden, um das Ausmaß des Einflusses von Tfh-Zellen auf B-Zellen genauer zu datieren.

## 5.1 Literaturdiskussion

Im selben Zeitraum dieser Dissertation wurden zwei unabhängige wissenschaftliche Arbeiten publiziert, die sich auch mit der Rolle von Tfh-Zellen in dem Mausmodell EAE beschäftigt haben. Im Folgenden werden Übereinstimmungen und Unterschiede diskutiert.

Die Publikation von Quinn *et al.* erschien im Februar 2018 mit dem Titel: „*Role of TFH Cells in Promoting T Helper 17-Induced Neuroinflammation*“ (104). Hier wurden unter anderem Zelltransfer-EAEs in C57BL/6-Mäusen mit einerseits

Th17-Zellen und andererseits Tfh-Zellen induziert und die Dynamik der Tfh-Zellen in verschiedenen Organen beobachtet. Die Tfh-Zellen wurden als CXCR5 und PD-1 positiver Anteil von den CD4<sup>+</sup> T-Helfer-Zellen charakterisiert. Von dieser Zellpopulation wurde zudem die Expression von ICOS und IL-21 im Vergleich zu den CXCR5 und PD-1 negativen T-Helfer-Zellen gemessen. Als Zielorgane wurden zentral das Gehirn und das Rückenmark gewählt, sowie peripher die Milz. In der Th17-induzierten EAE wurde ähnlich wie in dieser Arbeit eine zentralnervöse Anreicherung von Tfh-Zellen im inflammatorischen Symptommaximum beobachtet.

Im nächsten Schritt wurden Tfh-Zellen kultiviert. Das verwendete Protokoll ist ähnlich zu einer Kultivierungsmethode, welche in der vorliegenden Dissertation als unzureichend für eine geeignete Tfh-Polarisierung identifiziert wurde. Es führte in der PCR-Analyse zu einer im Vergleich zu den ebenfalls *in vitro* kultivierten Th17-Zellen 20-40-fach erhöhten Bcl-6- und CXCR5-Expression. Zudem war die PD-1-Expression in der Durchflusszytometrie vergleichbar mit aus Gewebe isolierten Tfh-Zellen. In dieser Arbeit konnte die CXCR5-Expression unter diesen Kulturbedingungen mittels Durchflusszytometrie nicht bestätigt werden. Ursächlich hierfür können die unterschiedlichen Quantifizierungsmethoden sein. So kann das verwendete Protokoll die mRNA-Bildung für CXCR5 anregen und somit in der PCR-Analyse detektierbar sein. Auf Proteinebene könnte es allerdings zu einer nur geringen Ausprägung geführt haben, sodass sich in der Durchflusszytometrie nur niedrige CXCR5-Level darstellen lassen.

Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit die Ko-Kultivierung mit B-Zellen etabliert und hier ein besseres Ergebnis an Tfh-Zellen auf Proteinebene erlangt.

Im Gegensatz zu dieser Dissertation wurden von Quinn et al. kultivierte Tfh-Zellen in gesunde C57BL/6-Mäusen injiziert, die ein vollausgebildetes Immunsystem besitzen. Eine schwere EAE-Symptomatik wurde hierdurch nicht induziert und es war keine ZNS-Infiltration von Tfh-Zellen darstellbar. Es kann angenommen werden, dass in diesem Fall die injizierten Tfh-Zellen mit bereits vorhandenen T-Helfer-Zellen in der Aktivität konkurrieren und durch diese unterdrückt und reguliert werden, sodass keine Entzündungsreaktion hervorgerufen wird.

In der von Guo et al. im Mai 2018 veröffentlichten Arbeit mit dem Titel: „*T Follicular helper-like cells are involved in the Pathogenesis of experimental*

*autoimmune encephalomyelitis*“ (103) wurden, wie in dieser Arbeit, C57BL/6-EAEs mit MOG-Peptid induziert und die Dynamik der Tfh-Zellen in verschiedenen Organen beobachtet. Im ZNS wurde, wie in dieser Arbeit, eine Anreicherung von Tfh-Zellen mit positiver Korrelation zum klinischen Symptomwert beobachtet, sodass geschlussfolgert werden kann, dass Tfh-Zellen im entzündlichen Geschehen im Rahmen der MS-Pathogenese insbesondere in zentralnervösen Strukturen agieren.

Als periphere Vergleichsorgane wurden Milz und Lymphknoten analysiert, die im Gegensatz zu den Peyer'schen Plaques auch eine Anreicherung von Tfh-Zellen mit positiver Korrelation zum klinischen Symptomwert aufweisen. Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass die Milz und die Lymphknoten systemisch in der Entzündungsphase mitreagieren, während die Tfh-Zellen in den Peyer'schen Plaques lokal im Intestinum eine eher untergeordnete Rolle zu spielen scheinen.

In der Arbeit von Guo et al. wurde ebenfalls eine Tfh-Zelltransfer-EAE in C57BL/6-Mäusen induziert, allerdings wurden die zu transferierenden CXCR5<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> Tfh-Zellen *ex vivo* aus Milzzellen magnetisch isoliert und dann entweder ohne oder mit B-Zellen in präimmunisierte Mäuse injiziert. Hier wurde beobachtet, dass die kombinierte Injektion von Tfh-Zellen und B-Zellen zu einem schwereren EAE-Verlauf führte als ein alleiniger Tfh-Zell- oder B-Zell-Transfer. Dies unterstreicht die B-Zell-unterstützende, in diesem Fall proinflammatorische Funktion, die Tfh-Zellen innehaben.

Die im Januar 2020 erschienene Arbeit von Schafflick et al. mit dem Titel: „*Integrated single cell analyse of blood and cerebrospinal fluid leukocytes in multiple sclerosis*“ (99) beschäftigt sich besonders mit der Analyse von zerebrospinalen Liquor von MS-Patienten. Hier wurde eine erhöhte Tfh-Population detektiert, sodass im Folgenden die Effekte von Tfh-Zellen auf die Neuroinflammation in der EAE untersucht werden sollte. Hierfür wurden in CD4<sup>Cre</sup>Bcl6<sup>fl/fl</sup> Mäuse, welche ein Fehlen von Tfh-Zellen vorweisen, mittels MOG<sub>33-55</sub> eine EAE induziert. Diese zeigte eine verminderte Krankheitsschwere und eine verminderte Anzahl von Läsionen in Gehirn und Rückenmark. Des Weiteren wurde eine Zelltransfer EAE mit Th17-Zellen in MOG-spezifische 2D2.CD4<sup>Cre</sup>Bcl6<sup>fl/fl</sup> Mäuse durchgeführt, wo sich ebenfalls eine verminderte Schwere des Krankheitsverlaufs zeigte.

Somit kann auch hier eine proinflammatorische Einflussnahme von Tfh-Zellen in den modifizierten C57BL/6 Mäusen bestätigt werden.

Zusammenfassend wurde die proinflammatorische Rolle von Tfh-Zellen auf die C57BL/6-EAE Mäuse in unterschiedlichsten EAE-Modellen in den letzten Jahren verstärkt beschrieben. Der in dieser Arbeit dargelegte Aspekt einer antiinflammatorischen Einflussnahme von Tfh-Zellen in der SJL/J-EAE wurde bisher noch nicht untersucht und unterstreicht die Wichtigkeit und Komplexität dieser Zellpopulation, insbesondere im Hinblick für zukünftige therapeutische Entwicklungen der MS-Therapie.

## 5.2 Ausblick

Im Rahmen dieser Dissertation wurden weitere Erkenntnisse zur Rolle von Tfh-Zellen im Entzündungsgeschehen der Pathogenese von EAE und somit auch, im weiteren Sinne, der Pathogenese von MS erlangt. Nichtsdestotrotz bleibt vieles im Unbekannten, sodass weitere Experimente erforderlich sind, um die Strukturen und Mechanismen vollständig verstehen zu können.

Ein wichtiger Schritt hierfür wären histologische Aufarbeitungen und Darstellungen von Tfh-Zellen in zentralnervösem Gewebe, wobei man hier zwischen Gehirn, Rückenmark, Leptomeningen und der Dura mater unterscheiden kann. Zur Beurteilung der Tfh-Zell-Dynamik sollten die histologischen Präparate alle Krankheitsstadien abbilden. Neben Tfh-Zellen wäre die Darstellung von B-Zellen, besonders im Zusammenhang mit ektopisch lymphoiden Strukturen, sinnvoll. So könnte eine eventuelle Beteiligung von Tfh-Zellen an der Bildung der ELS dargestellt und mögliche Interaktionen zwischen B-Zellen und Tfh-Zellen aufgezeigt werden.

Diese Arbeit hat erste Unterschiede in der Tfh-Zell-Dynamik zwischen den verschiedenen Mausmodellen aufgezeigt. Für weitere Analysen wäre folglich die Differenzierung zwischen Tfh-Zellen und Tfr-Zellen von großer Bedeutung. Besonders im Hinblick auf die unterschiedliche Tfh-Zell-Dynamik in C57BL/6-EAE Mäusen und SJL/J-EAE Mäusen ist die Unterscheidung dieser beiden Zellsubpopulationen, sowie die Bestimmung des Tfh/Tfr-Quotienten essenziell. Daneben ist die genaue Differenzierung von B-Zellen und Bregs von ebenso großer Bedeutung. Insgesamt betrachtet ist es ein noch unbekanntes Zusammenspiel der vier Zellpopulationen, die bei noch unbekannter Regulation in verschiedenen Interaktionskombinationen entweder proinflammatorische oder antiinflammatorische Reaktionen hervorrufen können. Im Sinne der Anwendbarkeit auf MS und spätere therapeutische Konsequenzen wäre eine Untersuchung dieser Zellsubtypen bei den verschiedenen MS-Krankheitsverläufen ein weiterer denkbarer Ansatz.

Neben den *in vivo* Experimenten müssen zur weiteren Analyse von Tfh-Zellen die *in vitro* Differenzierungsprotokolle optimiert werden, sodass sie in allen wissenschaftlichen Einrichtungen standardisiert reproduzierbar sind. Hierfür sind weitere Modifikationen und *in vivo* Funktionalitätsprüfungen vonnöten. Potenzielle Phänotypänderungen im Rahmen des MS- und EAE-Progresses, sowie die Erforschung der Interaktionen mit anderen T-Helfer-Zelllinien könnten darüber hinaus weiteren Einblick über die Pathogenität von Tfh-Zellen liefern.

## 6 Zusammenfassung

Für lange Zeit galt die Pathogenese der neuroinflammatorischen Autoimmunerkrankung Multiple Sklerose (MS) als überwiegend T-Zell-vermittelt. In den Untersuchungen im Rahmen der überschießenden Entzündungsreaktion von MS-Patienten und in ihrem Mausmodell der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE) standen vor allem die proinflammatorisch agierende T-Lymphozyten im Fokus der Forschung. Nun haben jüngste Studien deutlich gemacht, dass auch B-Lymphozyten eine bedeutende Rolle in den pathogenen entzündlichen Prozessen einnehmen.

Follikuläre T-Helfer-(Tfh-) Zellen sind eine erst kürzlich identifizierte Subpopulation von T-Lymphozyten. Follikuläre T-Helfer-(Tfh-) Zellen sind eine erst kürzlich identifizierte Subpopulation von T-Lymphozyten, die innerhalb von B-Zell-Follikeln lokalisiert sind und sich durch ihre B-Zell-unterstützende Funktion auszeichnen. Bereits in einigen anderen Autoimmunerkrankungen wird ihnen ein proinflammatorischer Einfluss zugesagt. Die Rolle der Tfh-Zellen in MS und der EAE ist jedoch nur unzureichend untersucht. In der vorliegenden Dissertation wurden erste Schritte unternommen, um hierzu ein besseres Verständnis zu erlangen. Zusammengefasst wurde die Tfh-Zell-Dynamik während der Krankheitsverläufe in relevanten Organsystemen von drei unterschiedlichen EAE-Modellen analysiert und ausgewertet.

Hierbei konnte bestätigt werden, dass sich Tfh-Zellen in dem inflammatorischen Symptommaximum von C57BL/6-Mäusen in Gehirn und Rückenmark anreichern. Bei Betrachtung des Krankheitsverlaufs konnte eine Korrelation des prozentualen Tfh-Zell-Anteils mit der Symptomschwere beobachtet werden, sodass von einer Tfh-Zell-Dynamik insbesondere in zentralnervösem Gewebe ausgegangen werden kann. Darüber hinaus wurde eine Infiltration von Tfh-Zellen in der äußersten Hirnhautschicht, der Dura mater, im Krankheitsprogress nachgewiesen. Da bisher follikuläre Strukturen und somit die mögliche Präsenz von Tfh-Zellen insbesondere in den inneren Hirnhäuten, den Leptomeningen, von MS-Patienten und EAE-Mäusen beschrieben wurden, gibt diese Arbeit erste Hinweise auf eine Tfh-Zell-Aktivität in der Dura mater und unterstreicht somit ihre Beteiligung am entzündlichen Geschehen.

Bei der Analyse der Tfh-Zell Dynamik im ZNS und der Dura mater des zweiten Mausmodells, der schubförmig-remittierenden SJL/J-EAE, wurde ein Tfh-Zell-Anstieg in der nicht-entzündlichen Remission beobachtet. Gegensätzlich zu der C57BL/6-EAE zeigte sich eine signifikante negative Korrelation des Tfh-Anteils im ZNS mit dem

Symptomwert, was die Vermutung nahelegt, dass die Tfh-Zellen unterschiedliche Rollen in den beiden Mausmodellen einnehmen.

Zur Untersuchung der B-Zell-unabhängigen Eigendynamik von Tfh-Zellen wurde eine *in vitro* Kultur etabliert und die generierten Tfh-polarisierten Zellen in immundefiziente B6.Rag1<sup>-/-</sup>-Mäuse transferiert. Die hier etablierte Tfh-Kultur zeigte nach Transfer in B6.Rag1<sup>-/-</sup>-Mäuse eine Differenzierung in einen Th1- bzw. Th17-ähnlichen Phänotyp, was die Instabilität der Tfh-Kultur und die Notwendigkeit zur Analyse weiterer Kulturbedingungen hervorhebt.

Insgesamt betont diese Dissertation eine dynamische Rolle von Tfh-Zellen, die sich in den verschiedenen Mausmodellen grundlegend zu unterscheiden scheint und somit vielfältige neue Ansätze für weitere Forschungen bietet.



## 7 Literaturverzeichnis

1. Lassmann H, Bruck W, Lucchinetti CF. The immunopathology of multiple sclerosis: an overview. *Brain Pathol.* 2007;17(2):210-8.
2. Walton C, King R, Rechtman L, Kaye W, Leray E, Marrie RA, et al. Rising prevalence of multiple sclerosis worldwide: Insights from the Atlas of MS, third edition. *Mult Scler.* 2020;26(14):1816-21.
3. Multiple Sclerosis International Federation – Atlas of MS – 3rd Edition, September, 2020, [Available from: <https://www.atlasofms.org/map/global/epidemiology/number-of-people-with-ms>].
4. Filippi M, Vukusic S, Bar-Or A, Piehl F, Rocca MA. Multiple sclerosis. *Nature Reviews Disease Primers.* 2018;4(1):44.
5. Dobson R, Giovannoni G. Multiple sclerosis - a review. *Eur J Neurol.* 2019;26(1):27-40.
6. Klineova S, Lublin FD. Clinical Course of Multiple Sclerosis. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2018;8(9):a028928.
7. Dendrou CA, Fugger L, Friese MA. Immunopathology of multiple sclerosis. *Nat Rev Immunol.* 2015;15(9):545-58.
8. Grytten Torkildsen N, Lie SA, Aarseth JH, Nyland H, Myhr KM. Survival and cause of death in multiple sclerosis: results from a 50-year follow-up in Western Norway. *Mult Scler.* 2008;14(9):1191-8.
9. Kingwell E, van der Kop M, Zhao Y, Shirani A, Zhu F, Oger J, et al. Relative mortality and survival in multiple sclerosis: findings from British Columbia, Canada. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2012;83(1):61-6.
10. Rao SM, Leo GJ, Bernardin L, Unverzagt F. Cognitive dysfunction in multiple sclerosis. I. Frequency, patterns, and prediction. *Neurology.* 1991;41(5):685-91.
11. Pflieger CC, Flachs EM, Koch-Henriksen N. Social consequences of multiple sclerosis (1): early pension and temporary unemployment--a historical prospective cohort study. *Mult Scler.* 2010;16(1):121-6.
12. Sadovnick AD, Ebers GC, Wilson RW, Paty DW. Life expectancy in patients attending multiple sclerosis clinics. *Neurology.* 1992;42(5):991-4.
13. Scalfari A, Knappertz V, Cutter G, Goodin DS, Ashton R, Ebers GC. Mortality in patients with multiple sclerosis. *Neurology.* 2013;81(2):184-92.
14. Miller DH, Chard DT, Ciccarelli O. Clinically isolated syndromes. *The Lancet Neurology.* 2012;11(2):157-69.
15. Lublin FD, Reingold SC, Cohen JA, Cutter GR, Sorensen PS, Thompson AJ, et al. Defining the clinical course of multiple sclerosis: the 2013 revisions. *Neurology.* 2014;83(3):278-86.
16. Compston A, Coles A. Multiple sclerosis. *Lancet.* 2008;372(9648):1502-17.
17. Lublin FD, Reingold SC. Defining the clinical course of multiple sclerosis: results of an international survey. National Multiple Sclerosis Society (USA) Advisory Committee on Clinical Trials of New Agents in Multiple Sclerosis. *Neurology.* 1996;46(4):907-11.
18. Sevim S. Relapses in Multiple Sclerosis: Definition, Pathophysiology, Features, Imitators, and Treatment. *Turkish Journal of Neurology.* 2016;22(3):99-108.
19. Hollenbach JA, Oksenberg JR. The immunogenetics of multiple sclerosis: A comprehensive review. *J Autoimmun.* 2015;64:13-25.
20. Orton SM, Herrera BM, Yee IM, Valdar W, Ramagopalan SV, Sadovnick AD, et al. Sex ratio of multiple sclerosis in Canada: a longitudinal study. *Lancet Neurol.* 2006;5(11):932-6.
21. Sintzel MB, Rametta M, Reder AT. Vitamin D and Multiple Sclerosis: A Comprehensive Review. *Neurol Ther.* 2018;7(1):59-85.

22. Virtanen JO, Jacobson S. Viruses and multiple sclerosis. *CNS Neurol Disord Drug Targets*. 2012;11(5):528-44.
23. Bjornevik K, Cortese M, Healy BC, Kuhle J, Mina MJ, Leng Y, et al. Longitudinal analysis reveals high prevalence of Epstein-Barr virus associated with multiple sclerosis. *Science*. 2022;375(6578):296-301.
24. Thompson AJ, Banwell BL, Barkhof F, Carroll WM, Coetzee T, Comi G, et al. Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. *Lancet Neurol*. 2018;17(2):162-73.
25. Croxford AL, Kurschus FC, Waisman A. Mouse models for multiple sclerosis: historical facts and future implications. *Biochim Biophys Acta*. 2011;1812(2):177-83.
26. Amor S, Groome N, Linington C, Morris MM, Dornmair K, Gardinier MV, et al. Identification of epitopes of myelin oligodendrocyte glycoprotein for the induction of experimental allergic encephalomyelitis in SJL and Biozzi AB/H mice. *J Immunol*. 1994;153(10):4349-56.
27. Waldner H, Whitters MJ, Sobel RA, Collins M, Kuchroo VK. Fulminant spontaneous autoimmunity of the central nervous system in mice transgenic for the myelin proteolipid protein-specific T cell receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(7):3412-7.
28. Stromnes IM, Goverman JM. Active induction of experimental allergic encephalomyelitis. *Nature Protocols*. 2006;1(4):1810-9.
29. Constantinescu CS, Farooqi N, O'Brien K, Gran B. Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) as a model for multiple sclerosis (MS). *Br J Pharmacol*. 2011;164(4):1079-106.
30. Robinson AP, Harp CT, Noronha A, Miller SD. The experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) model of MS: utility for understanding disease pathophysiology and treatment. *Handb Clin Neurol*. 2014;122:173-89.
31. Kearney H, Altmann DR, Samson RS, Yiannakas MC, Wheeler-Kingshott CA, Ciccarelli O, et al. Cervical cord lesion load is associated with disability independently from atrophy in MS. *Neurology*. 2015;84(4):367-73.
32. Frischer JM, Bramow S, Dal-Bianco A, Lucchinetti CF, Rauschka H, Schmidbauer M, et al. The relation between inflammation and neurodegeneration in multiple sclerosis brains. *Brain : a journal of neurology*. 2009;132(Pt 5):1175-89.
33. Harkiolaki M, Holmes SL, Svendsen P, Gregersen JW, Jensen LT, McMahon R, et al. T cell-mediated autoimmune disease due to low-affinity crossreactivity to common microbial peptides. *Immunity*. 2009;30(3):348-57.
34. Münz C, Lünemann JD, Getts MT, Miller SD. Antiviral immune responses: triggers of or triggered by autoimmunity? *Nature Reviews Immunology*. 2009;9(4):246-58.
35. Olson JK, Croxford JL, Calenoff MA, Dal Canto MC, Miller SD. A virus-induced molecular mimicry model of multiple sclerosis. *J Clin Invest*. 2001;108(2):311-8.
36. Criste G, Trapp B, Dutta R. Chapter 5 - Axonal loss in multiple sclerosis: causes and mechanisms. In: Goodin DS, editor. *Handbook of Clinical Neurology*. 122: Elsevier; 2014. p. 101-13.
37. Brosnan CF, Raine CS. The astrocyte in multiple sclerosis revisited. *Glia*. 2013;61(4):453-65.
38. Franklin RJM, Ffrench-Constant C. Regenerating CNS myelin - from mechanisms to experimental medicines. *Nat Rev Neurosci*. 2017;18(12):753-69.
39. Lucchinetti C, Brück W, Parisi J, Scheithauer B, Rodriguez M, Lassmann H. Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination. *Ann Neurol*. 2000;47(6):707-17.
40. Popescu BFG, Lucchinetti CF. Pathology of demyelinating diseases. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*. 2012;7:185-217.
41. Grigoriadis N, van Pesch V. A basic overview of multiple sclerosis immunopathology. *Eur J Neurol*. 2015;22 Suppl 2:3-13.

42. Lovett-Racke AE, Yang Y, Racke MK. Th1 versus Th17: are T cell cytokines relevant in multiple sclerosis? *Biochim Biophys Acta*. 2011;1812(2):246-51.
43. Komiyama Y, Nakae S, Matsuki T, Nambu A, Ishigame H, Kakuta S, et al. IL-17 plays an important role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol*. 2006;177(1):566-73.
44. Langrish CL, Chen Y, Blumenschein WM, Mattson J, Basham B, Sedgwick JD, et al. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J Exp Med*. 2005;201(2):233-40.
45. Van Kaer L, Postoak JL, Wang C, Yang G, Wu L. Innate, innate-like and adaptive lymphocytes in the pathogenesis of MS and EAE. *Cell Mol Immunol*. 2019;16(6):531-9.
46. Murphy AC, Lalor SJ, Lynch MA, Mills KH. Infiltration of Th1 and Th17 cells and activation of microglia in the CNS during the course of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain Behav Immun*. 2010;24(4):641-51.
47. Das Sarma J, Ciric B, Marek R, Sadhukhan S, Caruso ML, Shafagh J, et al. Functional interleukin-17 receptor A is expressed in central nervous system glia and upregulated in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroinflammation*. 2009;6:14.
48. Kawanokuchi J, Shimizu K, Nitta A, Yamada K, Mizuno T, Takeuchi H, et al. Production and functions of IL-17 in microglia. *J Neuroimmunol*. 2008;194(1-2):54-61.
49. Gross CC, Schulte-Mecklenbeck A, Klinsing S, Posevitz-Fejfar A, Wiendl H, Klotz L. Dimethyl fumarate treatment alters circulating T helper cell subsets in multiple sclerosis. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*. 2016;3(1):e183.
50. Kozovska ME, Hong J, Zang YC, Li S, Rivera VM, Killian JM, et al. Interferon beta induces T-helper 2 immune deviation in MS. *Neurology*. 1999;53(8):1692-7.
51. Miller A, Shapiro S, Gershtein R, Kinarty A, Rawashdeh H, Honigman S, et al. Treatment of multiple sclerosis with copolymer-1 (Copaxone): implicating mechanisms of Th1 to Th2/Th3 immune-deviation. *J Neuroimmunol*. 1998;92(1-2):113-21.
52. Mulero P, Midaglia L, Montalban X. Ocrelizumab: a new milestone in multiple sclerosis therapy. *Ther Adv Neurol Disord*. 2018;11:1756286418773025.
53. Hauser SL, Waubant E, Arnold DL, Vollmer T, Antel J, Fox RJ, et al. B-cell depletion with rituximab in relapsing-remitting multiple sclerosis. *N Engl J Med*. 2008;358(7):676-88.
54. Kerr JR. Epstein-Barr virus (EBV) reactivation and therapeutic inhibitors. *J Clin Pathol*. 2019;72(10):651-8.
55. Popescu BF, Lucchinetti CF. Pathology of demyelinating diseases. *Annu Rev Pathol*. 2012;7:185-217.
56. Magliozzi R, Howell O, Vora A, Serafini B, Nicholas R, Puopolo M, et al. Meningeal B-cell follicles in secondary progressive multiple sclerosis associate with early onset of disease and severe cortical pathology. *Brain*. 2007;130(Pt 4):1089-104.
57. Serafini B, Rosicarelli B, Magliozzi R, Stigliano E, Aloisi F. Detection of ectopic B-cell follicles with germinal centers in the meninges of patients with secondary progressive multiple sclerosis. *Brain Pathol*. 2004;14(2):164-74.
58. Howell OW, Reeves CA, Nicholas R, Carassiti D, Radotra B, Gentleman SM, et al. Meningeal inflammation is widespread and linked to cortical pathology in multiple sclerosis. *Brain*. 2011;134(Pt 9):2755-71.
59. Link H, Huang YM. Oligoclonal bands in multiple sclerosis cerebrospinal fluid: an update on methodology and clinical usefulness. *J Neuroimmunol*. 2006;180(1-2):17-28.
60. Keegan M, König F, McClelland R, Brück W, Morales Y, Bitsch A, et al. Relation between humoral pathological changes in multiple sclerosis and response to therapeutic plasma exchange. *The Lancet*. 2005;366(9485):579-82.

61. Kappos L, Li D, Calabresi PA, O'Connor P, Bar-Or A, Barkhof F, et al. Ocrelizumab in relapsing-remitting multiple sclerosis: a phase 2, randomised, placebo-controlled, multicentre trial. *Lancet*. 2011;378(9805):1779-87.
62. Barr TA, Shen P, Brown S, Lampropoulou V, Roch T, Lawrie S, et al. B cell depletion therapy ameliorates autoimmune disease through ablation of IL-6-producing B cells. *J Exp Med*. 2012;209(5):1001-10.
63. Li R, Rezk A, Miyazaki Y, Hilgenberg E, Touil H, Shen P, et al. Proinflammatory GM-CSF-producing B cells in multiple sclerosis and B cell depletion therapy. *Sci Transl Med*. 2015;7(310):310ra166.
64. Ireland SJ, Blazek M, Harp CT, Greenberg B, Frohman EM, Davis LS, et al. Antibody-independent B cell effector functions in relapsing remitting multiple sclerosis: clues to increased inflammatory and reduced regulatory B cell capacity. *Autoimmunity*. 2012;45(5):400-14.
65. Molnarfi N, Schulze-Topphoff U, Weber MS, Patarroyo JC, Prod'homme T, Varrin-Doyer M, et al. MHC class II-dependent B cell APC function is required for induction of CNS autoimmunity independent of myelin-specific antibodies. *J Exp Med*. 2013;210(13):2921-37.
66. Adler LN, Jiang W, Bhamidipati K, Millican M, Macaubas C, Hung S-c, et al. The Other Function: Class II-Restricted Antigen Presentation by B Cells. *Frontiers in Immunology*. 2017;8(319).
67. Ireland SJ, Guzman AA, Frohman EM, Monson NL. B cells from relapsing remitting multiple sclerosis patients support neuro-antigen-specific Th17 responses. *J Neuroimmunol*. 2016;291:46-53.
68. Sorensen PS, Sellebjerg F, Hartung H-P, Montalban X, Comi G, Tintoré M. The apparently milder course of multiple sclerosis: changes in the diagnostic criteria, therapy and natural history. *Brain*. 2020;143(9):2637-52.
69. Wallin MT, Culpepper WJ, Nichols E, Bhutta ZA, Gebrehiwot TT, Hay SI, et al. Global, regional, and national burden of multiple sclerosis 1990-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *The Lancet Neurology*. 2019;18(3):269-85.
70. Hemmer B, Neurologie DGf. Diagnose und Therapie der Multiplen Sklerose, Neuromyelitis-optica-Spektrum-Erkrankungen und MOG-IgG-assoziierten Erkrankungen, S2k-Leitlinie Deutsche Gesellschaft für Neurologie, Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie 2021 [20.11.2021]. Available from: [www.dgn.org/leitlinien](http://www.dgn.org/leitlinien).
71. Faissner S, Nikolayczik J, Chan A, Hellwig K, Gold R, Yoon MS, et al. Plasmapheresis and immunoabsorption in patients with steroid refractory multiple sclerosis relapses. *J Neurol*. 2016;263(6):1092-8.
72. Berkovich R. Treatment of acute relapses in multiple sclerosis. *Neurotherapeutics*. 2013;10(1):97-105.
73. Pandit L. No Evidence of Disease Activity (NEDA) in Multiple Sclerosis - Shifting the Goal Posts. *Ann Indian Acad Neurol*. 2019;22(3):261-3.
74. Montalban X, Gold R, Thompson AJ, Otero-Romero S, Amato MP, Chandraratna D, et al.ECTRIMS/EAN Guideline on the pharmacological treatment of people with multiple sclerosis. *Mult Scler*. 2018;24(2):96-120.
75. Henze T, Rieckmann P, Toyka KV. Symptomatic treatment of multiple sclerosis. Multiple Sclerosis Therapy Consensus Group (MSTCG) of the German Multiple Sclerosis Society. *Eur Neurol*. 2006;56(2):78-105.
76. de Sa JCC, Airas L, Bartholome E, Grigoriadis N, Mattle H, Oreja-Guevara C, et al. Symptomatic therapy in multiple sclerosis: a review for a multimodal approach in clinical practice. *Therapeutic advances in neurological disorders*. 2011;4(3):139-68.
77. Berger JR. Functional improvement and symptom management in multiple sclerosis: clinical efficacy of current therapies. *Am J Manag Care*. 2011;17 Suppl 5 Improving:S146-53.

78. Kamm CP, Uitdehaag BM, Polman CH. Multiple sclerosis: current knowledge and future outlook. *Eur Neurol.* 2014;72(3-4):132-41.
79. Baldassari LE, Fox RJ. Therapeutic Advances and Challenges in the Treatment of Progressive Multiple Sclerosis. *Drugs.* 2018;78(15):1549-66.
80. Hauser SL, Cree BAC. Treatment of Multiple Sclerosis: A Review. *Am J Med.* 2020;133(12):1380-90.e2.
81. Breitfeld D, Ohl L, Kremmer E, Ellwart J, Sallusto F, Lipp M, et al. Follicular B helper T cells express CXCR5 chemokine receptor 5, localize to B cell follicles, and support immunoglobulin production. *J Exp Med.* 2000;192(11):1545-52.
82. Schaerli P, Willimann K, Lang AB, Lipp M, Loetscher P, Moser B. CXCR5 chemokine receptor 5 expression defines follicular homing T cells with B cell helper function. *J Exp Med.* 2000;192(11):1553-62.
83. Kim CH, Rott LS, Clark-Lewis I, Campbell DJ, Wu L, Butcher EC. Subspecialization of CXCR5+ T cells: B helper activity is focused in a germinal center-localized subset of CXCR5+ T cells. *J Exp Med.* 2001;193(12):1373-81.
84. Johnston RJ, Poholek AC, DiToro D, Yusuf I, Eto D, Barnett B, et al. Bcl6 and Blimp-1 are reciprocal and antagonistic regulators of T follicular helper cell differentiation. *Science.* 2009;325(5943):1006-10.
85. Nurieva RI, Chung Y, Martinez GJ, Yang XO, Tanaka S, Matskevitch TD, et al. Bcl6 mediates the development of T follicular helper cells. *Science.* 2009;325(5943):1001-5.
86. Yu D, Rao S, Tsai LM, Lee SK, He Y, Sutcliffe EL, et al. The transcriptional repressor Bcl-6 directs T follicular helper cell lineage commitment. *Immunity.* 2009;31(3):457-68.
87. Poholek AC, Hansen K, Hernandez SG, Eto D, Chandele A, Weinstein JS, et al. In vivo regulation of Bcl6 and T follicular helper cell development. *J Immunol.* 2010;185(1):313-26.
88. Crotty S. Follicular helper CD4 T cells (TFH). *Annu Rev Immunol.* 2011;29:621-63.
89. Jogdand GM, Mohanty S, Devadas S. Regulators of Tfh Cell Differentiation. *Front Immunol.* 2016;7:520.
90. Crotty S. T follicular helper cell differentiation, function, and roles in disease. *Immunity.* 2014;41(4):529-42.
91. Lee SK, Rigby RJ, Zotos D, Tsai LM, Kawamoto S, Marshall JL, et al. B cell priming for extrafollicular antibody responses requires Bcl-6 expression by T cells. *J Exp Med.* 2011;208(7):1377-88.
92. W E Paul a, Ohara J. B-Cell Stimulatory Factor-1/Interleukin 4. *Annual Review of Immunology.* 1987;5(1):429-59.
93. Meli AP, Fontés G, Leung Soo C, King IL. T Follicular Helper Cell-Derived IL-4 Is Required for IgE Production during Intestinal Helminth Infection. *The Journal of Immunology.* 2017;199(1):244-52.
94. Yusuf I, Kageyama R, Monticelli L, Johnston RJ, DiToro D, Hansen K, et al. Germinal center T follicular helper cell IL-4 production is dependent on signaling lymphocytic activation molecule receptor (CD150). *J Immunol.* 2010;185(1):190-202.
95. Blanco P, Ueno H, Schmitt N. T follicular helper (Tfh) cells in lupus: Activation and involvement in SLE pathogenesis. *Eur J Immunol.* 2016;46(2):281-90.
96. Choi SS, Jang E, Oh YK, Jang K, Cho ML, Park SH, et al. Aged Sanroque Mice Spontaneously Develop Sjogren's Syndrome-like Disease. *Immune Netw.* 2019;19(1):e7.
97. Ma J, Zhu C, Ma B, Tian J, Baidoo SE, Mao C, et al. Increased frequency of circulating follicular helper T cells in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Dev Immunol.* 2012;2012:827480.
98. Romme Christensen J, Bornsen L, Ratzer R, Piehl F, Khademi M, Olsson T, et al. Correction: Systemic Inflammation in Progressive Multiple Sclerosis Involves

- Follicular T-Helper, Th17- and Activated B-Cells and Correlates with Progression. *PLoS One*. 2013;8(3).
99. Schafflick D, Xu CA, Hartlehnert M, Cole M, Schulte-Mecklenbeck A, Lautwein T, et al. Integrated single cell analysis of blood and cerebrospinal fluid leukocytes in multiple sclerosis. *Nat Commun*. 2020;11(1):247.
100. Tzartos JS, Craner MJ, Friese MA, Jakobsen KB, Newcombe J, Esiri MM, et al. IL-21 and IL-21 receptor expression in lymphocytes and neurons in multiple sclerosis brain. *Am J Pathol*. 2011;178(2):794-802.
101. Peters A, Pitcher LA, Sullivan JM, Mitsdoerffer M, Acton SE, Franz B, et al. Th17 cells induce ectopic lymphoid follicles in central nervous system tissue inflammation. *Immunity*. 2011;35(6):986-96.
102. Quinn JL, Kumar G, Agasing A, Ko RM, Axtell RC. Role of TFH Cells in Promoting T Helper 17-Induced Neuroinflammation. *Front Immunol*. 2018;9:382.
103. Guo J, Zhao C, Wu F, Tao L, Zhang C, Zhao D, et al. T Follicular Helper-Like Cells Are Involved in the Pathogenesis of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *Front Immunol*. 2018;9:944.
104. Quinn JL, Axtell RC. Emerging Role of Follicular T Helper Cells in Multiple Sclerosis and Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *Int J Mol Sci*. 2018;19(10).
105. Chu F, Shi M, Lang Y, Shen D, Jin T, Zhu J, et al. Gut Microbiota in Multiple Sclerosis and Experimental Autoimmune Encephalomyelitis: Current Applications and Future Perspectives. *Mediators Inflamm*. 2018;2018:8168717.
106. Mombaerts P, Iacomini J, Johnson RS, Herrup K, Tonegawa S, Papaioannou VE. RAG-1-deficient mice have no mature B and T lymphocytes. *Cell*. 1992;68(5):869-77.
107. Bettelli E, Pagany M, Weiner HL, Lington C, Sobel RA, Kuchroo VK. Myelin oligodendrocyte glycoprotein-specific T cell receptor transgenic mice develop spontaneous autoimmune optic neuritis. *J Exp Med*. 2003;197(9):1073-81.
108. Kolenbrander A, Grewe B, Nemazee D, Uberla K, Temchura V. Generation of T follicular helper cells in vitro: requirement for B-cell receptor cross-linking and cognate B- and T-cell interaction. *Immunology*. 2018;153(2):214-24.
109. Birkner K, Wasser B, Loos J, Plotnikov A, Seger R, Zipp F, et al. The Role of ERK Signaling in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *Int J Mol Sci*. 2017;18(9).
110. Moser B. CXCR5, the Defining Marker for Follicular B Helper T (TFH) Cells. *Front Immunol*. 2015;6:296.
111. Yu D, Vinuesa CG. The elusive identity of T follicular helper cells. *Trends Immunol*. 2010;31(10):377-83.
112. Baniahmad A, Birkner K, Gorg J, Loos J, Zipp F, Wasser B, et al. The frequency of follicular T helper cells differs in acute and chronic neuroinflammation. *Sci Rep*. 2020;10(1):20485.
113. Wu H-J, Wu E. The role of gut microbiota in immune homeostasis and autoimmunity. *Gut Microbes*. 2012;3(1):4-14.
114. Jones L, Ho WQ, Ying S, Ramakrishna L, Srinivasan KG, Yurieva M, et al. A subpopulation of high IL-21-producing CD4(+) T cells in Peyer's Patches is induced by the microbiota and regulates germinal centers. *Sci Rep*. 2016;6:30784.
115. Teng F, Klinger CN, Felix KM, Bradley CP, Wu E, Tran NL, et al. Gut Microbiota Drive Autoimmune Arthritis by Promoting Differentiation and Migration of Peyer's Patch T Follicular Helper Cells. *Immunity*. 2016;44(4):875-88.
116. Nurieva RI, Chung Y, Hwang D, Yang XO, Kang HS, Ma L, et al. Generation of T follicular helper cells is mediated by interleukin-21 but independent of T helper 1, 2, or 17 cell lineages. *Immunity*. 2008;29(1):138-49.
117. Loos J, Schmaul S, Noll TM, Paterka M, Schillner M, Löffel JT, et al. Functional characteristics of Th1, Th17, and ex-Th17 cells in EAE revealed by intravital two-photon microscopy. *Journal of Neuroinflammation*. 2020;17(1):357.

118. Birkner K, Wasser B, Ruck T, Thalman C, Luchtman D, Pape K, et al.  $\beta$ 1-Integrin– and KV1.3 channel–dependent signaling stimulates glutamate release from Th17 cells. *The Journal of Clinical Investigation*. 2020;130(2):715-32.
119. Mehta AK, Gracias DT, Croft M. TNF activity and T cells. *Cytokine*. 2018;101:14-8.
120. Hausser-Kinzel S, Weber MS. The Role of B Cells and Antibodies in Multiple Sclerosis, Neuromyelitis Optica, and Related Disorders. *Front Immunol*. 2019;10:201.
121. von Budingen HC, Bar-Or A, Zamvil SS. B cells in multiple sclerosis: connecting the dots. *Curr Opin Immunol*. 2011;23(6):713-20.
122. Weber MS, Hemmer B, Cepok S. The role of antibodies in multiple sclerosis. *Biochim Biophys Acta*. 2011;1812(2):239-45.
123. Eto D, Lao C, DiToro D, Barnett B, Escobar TC, Kageyama R, et al. IL-21 and IL-6 are critical for different aspects of B cell immunity and redundantly induce optimal follicular helper CD4 T cell (T<sub>fh</sub>) differentiation. *PLoS One*. 2011;6(3):e17739.
124. Collison J. Defective TFH cell checkpoint in SLE. *Nat Rev Rheumatol*. 2019;15(3):125.
125. Kwun J, Manook M, Page E, Burghuber C, Hong J, Knechtle SJ. Crosstalk Between T and B Cells in the Germinal Center After Transplantation. *Transplantation*. 2017;101(4):704-12.
126. Vinuesa CG, Linterman MA, Yu D, MacLennan IC. Follicular Helper T Cells. *Annu Rev Immunol*. 2016;34:335-68.
127. Fan X, Lin C, Han J, Jiang X, Zhu J, Jin T. Follicular Helper CD4+ T Cells in Human Neuroautoimmune Diseases and Their Animal Models. *Mediators Inflamm*. 2015;2015:638968.
128. Haynes NM, Allen CD, Lesley R, Ansel KM, Killeen N, Cyster JG. Role of CXCR5 and CCR7 in follicular Th cell positioning and appearance of a programmed cell death gene-1<sup>high</sup> germinal center-associated subpopulation. *J Immunol*. 2007;179(8):5099-108.
129. Freeman GJ, Long AJ, Iwai Y, Bourque K, Chernova T, Nishimura H, et al. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J Exp Med*. 2000;192(7):1027-34.
130. Blackburn SD, Shin H, Haining WN, Zou T, Workman CJ, Polley A, et al. Coregulation of CD8+ T cell exhaustion by multiple inhibitory receptors during chronic viral infection. *Nat Immunol*. 2009;10(1):29-37.
131. Klein U, Dalla-Favera R. Germinal centres: role in B-cell physiology and malignancy. *Nat Rev Immunol*. 2008;8(1):22-33.
132. Linterman MA, Beaton L, Yu D, Ramiscal RR, Srivastava M, Hogan JJ, et al. IL-21 acts directly on B cells to regulate Bcl-6 expression and germinal center responses. *J Exp Med*. 2010;207(2):353-63.
133. Hildesheim FE, Ramasamy DP, Bergsland N, Jakimovski D, Dwyer MG, Hojnacki D, et al. Leptomeningeal, dura mater and meningeal vessel wall enhancements in multiple sclerosis. *Mult Scler Relat Disord*. 2021;47:102653.
134. Song F, Wardrop RM, Gienapp IE, Stuckman SS, Meyer AL, Shawler T, et al. The Peyer's patch is a critical immunoregulatory site for mucosal tolerance in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *J Autoimmun*. 2008;30(4):230-7.
135. Nouri M, Bredberg A, Weström B, Lavasani S. Intestinal barrier dysfunction develops at the onset of experimental autoimmune encephalomyelitis, and can be induced by adoptive transfer of auto-reactive T cells. *PLoS One*. 2014;9(9):e106335.
136. Lyons JA, San M, Happ MP, Cross AH. B cells are critical to induction of experimental allergic encephalomyelitis by protein but not by a short encephalitogenic peptide. *Eur J Immunol*. 1999;29(11):3432-9.

137. Matsushita T, Yanaba K, Bouaziz JD, Fujimoto M, Tedder TF. Regulatory B cells inhibit EAE initiation in mice while other B cells promote disease progression. *J Clin Invest.* 2008;118(10):3420-30.
138. Sellers RS, Clifford CB, Treuting PM, Brayton C. Immunological variation between inbred laboratory mouse strains: points to consider in phenotyping genetically immunomodified mice. *Vet Pathol.* 2012;49(1):32-43.
139. Sellers RS. Translating Mouse Models. *Toxicol Pathol.* 2017;45(1):134-45.
140. Zwiers A, Fuss IJ, Seegers D, Konijn T, Garcia-Vallejo JJ, Samsom JN, et al. A polymorphism in the coding region of *Il12b* promotes IL-12p70 and IL-23 heterodimer formation. *J Immunol.* 2011;186(6):3572-80.
141. Yoshimoto T, Bendelac A, Hu-Li J, Paul WE. Defective IgE production by SJL mice is linked to the absence of CD4+, NK1.1+ T cells that promptly produce interleukin 4. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92(25):11931-4.
142. Elsner RA, Shlomchik MJ. IL-12 Blocks Tfh Cell Differentiation during Salmonella Infection, thereby Contributing to Germinal Center Suppression. *Cell Rep.* 2019;29(9):2796-809.e5.
143. Chen J, Harrison DE. Quantitative trait loci regulating relative lymphocyte proportions in mouse peripheral blood. *Blood.* 2002;99(2):561-6.
144. Mauri C, Bosma A. Immune regulatory function of B cells. *Annu Rev Immunol.* 2012;30:221-41.
145. Staun-Ram E, Miller A. Effector and regulatory B cells in Multiple Sclerosis. *Clin Immunol.* 2017;184:11-25.
146. Kappos L, Hartung HP, Freedman MS, Boyko A, Radu EW, Mikol DD, et al. Atacept in multiple sclerosis (ATAMS): a randomised, placebo-controlled, double-blind, phase 2 trial. *Lancet Neurol.* 2014;13(4):353-63.
147. Fillatreau S, Sweenie CH, McGeachy MJ, Gray D, Anderton SM. B cells regulate autoimmunity by provision of IL-10. *Nat Immunol.* 2002;3(10):944-50.
148. Ray A, Dittel BN. Mechanisms of Regulatory B cell Function in Autoimmune and Inflammatory Diseases beyond IL-10. *J Clin Med.* 2017;6(1).
149. Mann MK, Maresz K, Shriver LP, Tan Y, Dittel BN. B cell regulation of CD4+CD25+ T regulatory cells and IL-10 via B7 is essential for recovery from experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol.* 2007;178(6):3447-56.
150. Linterman MA, Pierson W, Lee SK, Kallies A, Kawamoto S, Rayner TF, et al. Foxp3+ follicular regulatory T cells control the germinal center response. *Nat Med.* 2011;17(8):975-82.
151. Sage PT, Sharpe AH. T follicular regulatory cells. *Immunol Rev.* 2016;271(1):246-59.
152. Haque R, Kim Y, Park K, Jang H, Kim SY, Lee H, et al. Altered distributions in circulating follicular helper and follicular regulatory T cells accountable for imbalanced cytokine production in multiple sclerosis. *Clin Exp Immunol.* 2021;205(1):75-88.
153. Puthenparampil M, Zito A, Pantano G, Federle L, Stropparo E, Miantes S, et al. Peripheral imbalanced TFH/TFR ratio correlates with intrathecal IgG synthesis in multiple sclerosis at clinical onset. *Mult Scler.* 2019;25(7):918-26.
154. Cannons JL, Lu KT, Schwartzberg PL. T follicular helper cell diversity and plasticity. *Trends Immunol.* 2013;34(5):200-7.
155. Bentebibel SE, Khurana S, Schmitt N, Kurup P, Mueller C, Obermoser G, et al. ICOS(+)/PD-1(+)/CXCR3(+) T follicular helper cells contribute to the generation of high-avidity antibodies following influenza vaccination. *Sci Rep.* 2016;6:26494.
156. Reinhardt RL, Liang HE, Locksley RM. Cytokine-secreting follicular T cells shape the antibody repertoire. *Nat Immunol.* 2009;10(4):385-93.
157. Glatman Zaretsky A, Taylor JJ, King IL, Marshall FA, Mohrs M, Pearce EJ. T follicular helper cells differentiate from Th2 cells in response to helminth antigens. *J Exp Med.* 2009;206(5):991-9.
158. Wichner K, Stauss D, Kampfrath B, Krüger K, Müller G, Rehm A, et al. Dysregulated development of IL-17- and IL-21-expressing follicular helper T cells and



increased germinal center formation in the absence of ROR $\gamma$ t. *Faseb j.* 2016;30(2):761-74.

## 8 Anhang

### 8.1 Erklärung

Ich, Adalie Dana Baniahmad, erkläre hiermit, dass die vorgelegte Dissertation von mir selbstständig, ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel, angefertigt wurde. Alle von mir benutzten Veröffentlichungen, ungedruckten Materialien, sonstige Hilfsmittel sowie Textstellen, die ich wörtlich oder inhaltlich aus gedruckten oder ungedruckten Arbeiten übernommen habe, habe ich als solche gekennzeichnet und mit den erforderlichen bibliographischen Angaben nachgewiesen. Unterstützungsleistungen, die ich von anderen Personen erhalten habe, wurden in der Dissertationsschrift als solche benannt.

Die Dissertation wurde bei keiner anderen Fakultät oder einem anderen Fachbereich vorgelegt, weder im In- noch im Ausland.

Überdies bin ich nicht im Besitz eines anderen Doktorgrades.

Ich habe bisher kein Promotionsverfahren erfolglos beendet.

Mir ist bekannt, dass die Zulassung zur Promotion zu versagen ist, wenn die Unterlagen unvollständig oder die Angaben unrichtig sind. Ich bin darüber informiert, dass ich zur Führung des Dokortitels erst mit Aushändigung der Promotionsurkunde berechtigt bin.

---

Ort, Datum

---

Unterschrift

## **9 Danksagung**

Vielen Leuten möchte ich für die Hilfe und Unterstützung während der Zeit im Labor und darüber hinaus danken.

Als erstes ich mich für die Ermöglichung dieser interessanten Doktorarbeit mit Veröffentlichung meiner ersten wissenschaftlichen Arbeit bedanken. Ein großes Dankeschön an allen Betreuern, Helfern, Begleitern und Gesprächspartner, die mich in dieser Zeit begleitet haben.

Ein riesiges Dankeschön an meinen Labor-Buddy. Wir haben zusammen gelacht und geweint, geschwitzt und geschwätzt, und ohne dich hätte ich vermutlich nicht das Durchhaltungsvermögen zeigen können, um diese Arbeit zu beenden.

Vielen Dank an meine Familie, die mich in allem unterstützt und die Arbeit viele Male durchgelesen haben.