

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

**In vitro Charakterisierung von primären Mausastrozyten unter entzündlichen  
Bedingungen**

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

Vorgelegt von

Theresa Marie Michaela Noll  
aus Fulda

Mainz, 2022

Tag der Promotion: 20.06.2023

**Für meine Familie.**

# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis .....	I
Abbildungsverzeichnis .....	IV
Tabellenverzeichnis .....	VII
1 Einleitung / Ziel der Dissertation .....	1
2 Literaturdiskussion .....	4
2.1 Multiple Sklerose .....	4
2.1.1 Epidemiologie und Pathogenese .....	4
2.1.2 Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis .....	9
2.2 Astrozyten .....	10
2.2.1 Astrozyten – mehr als Nervenkitt .....	10
2.2.2 Astrozyten und Neuroinflammation .....	12
2.2.3 Astrozytäre Zytokine .....	14
2.2.4 Astrozytäre Aktivierungsmarker .....	16
2.3 Interaktion zwischen T-Zellen und Astrozyten .....	18
2.3.1 T-Zellen in MS .....	18
2.3.2 Interaktion .....	18
2.3.3 Bedeutung von Zelladhäsion in MS und EAE .....	19
3 Material und Methoden .....	22
3.1 Material .....	22
3.1.1 Instrumente und Geräte .....	22
3.1.2 Laborutensilien und Verbrauchsgegenstände .....	23
3.1.3 Chemikalien und Reagenzien .....	24
3.1.4 Puffer und Kulturmedien .....	26
3.1.5 Kits .....	27
3.1.6 Mikrobeads .....	28
3.1.7 Zytokine .....	28
3.1.8 Antikörper FACS .....	28
3.1.9 Antikörper Immunhistochemie .....	29
3.1.10 Primer-Sequenzen qRT-PCR .....	29
3.1.11 Mäuse .....	30
3.1.12 Software .....	30
3.2 Methoden .....	31
3.2.1 Präparation der Mäuse .....	31
3.2.2 T-Zellkultur .....	32
3.2.3 Astrozyten-Kultur .....	35
3.2.4 Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis .....	39
3.2.5 Organotypische hippocampale Schnittkultur .....	41
3.2.6 Statistische Analyse .....	44
4 Ergebnisse .....	45

4.1	Astrozytäre Reaktionen auf inflammatorische Stimuli im mRNA-Expressionsmuster	45
4.1.1	Heterogene astrozytäre mRNA-Expression für Zytokine als Reaktion auf Neuroinflammation	45
4.1.2	Die Regulation von astrozytären Aktivierungsmarkern auf mRNA-Ebene	48
4.2	Zelltypabhängige Expression von Adhäsionsmolekülen in vitro und in vivo	50
4.2.1	Th1 spezifische Hochregulation von Adhäsionsmolekülen auf mRNA-Ebene	50
4.2.2	Expression von ICAM-1 und VCAM-1 auf Astrozyten in organotypischen hippocampalen Schnittkulturen	52
4.2.3	Th1 spezifische Effekte auf die Expression von ICAM-1 und VCAM-1 auf Astrozyten in vivo	54
5	Diskussion	57
5.1	Regulation astrozytärer Zytokine	58
5.2	Astrozytäre Aktivierungsmarker	61
5.3	Adhäsionsmoleküle auf Astrozyten unter Neuroinflammation	62
5.4	Conclusio	64
6	Zusammenfassung	65
7	Literaturverzeichnis	66

## Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
<b>2d2</b>	Transgene Mäuse, deren CD4 <sup>+</sup> Zellen MOG <sub>35–55</sub> spezifisch sind
<b>ALDH</b>	Aldehyd Dehydrogenase
<b>ALS</b>	Amyotrophe Lateralsklerose
<b>APC</b>	<i>Antigen presenting cell</i> , Antigenpräsentierende Zelle
<b>AQP</b>	Aquaporin
<b>ATP</b>	Adenosintriphosphat
<b>B6</b>	Wildtyp Mäuse (C57BL/6)
<b>BHS</b>	Blut-Hirn-Schranke
<b>bzw.</b>	Beziehungsweise
<b>Ca</b>	Calcium
<b>ca.</b>	Circa
<b>CAM</b>	<i>Cell Adhesion Molecules</i> , Zelladhäsionsmoleküle
<b>CD</b>	<i>Cluster of differentiation</i>
<b>CFA</b>	<i>Complete Freund's adjuvant</i> , Freund'sches Adjuvanz
<b>DAPI</b>	4',6-Diamidin-2-phenylindol, Zellkernfärbung
<b>DIS</b>	<i>Dissemination in space</i> , räumliche Dissemination
<b>DIT</b>	<i>Dissemination in time</i> , zeitliche Dissemination
<b>DNase</b>	Desoxyribonuklease
<b>EAE</b>	Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis
<b>eGFP</b>	<i>enhanced green fluorescent protein</i> , grünes Fluoreszenzprotein
<b>FACS</b>	<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i> , Durchflusszytometrie
<b>FC-Blocking</b>	<i>Flow Cytometry Blocking</i> , Blocking-Puffer für Durchflusszytometrie
<b>GABA</b>	<i>Gamma-Aminobutyric Acid</i> , Gamma-Amino-Buttersäure
<b>GFAP</b>	<i>Glial fibrillary acid protein</i> , saures Gliafaserprotein
<b>GLAST</b>	Glutamat-Aspartat-Transporter
<b>GLT</b>	Glutamat-Transporter
<b>GMCSF</b>	<i>granulocyte-macrophage colony stimulating factor</i> , Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender-Faktor
<b>GS</b>	Glutamat Synthetase
<b>ICAM-1</b>	Intercellular Adhesion Molecule 1, Interzelluläres Adhäsionsmolekül
<b>IFN<math>\gamma</math></b>	Interferon Gamma
<b>IL</b>	Interleukin

<b>iNOS</b>	<i>Inducible Nitric Oxide Synthase</i> , induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
<b>KIS</b>	Klinisch isoliertes Syndrom
<b>LFA1</b>	<i>Lymphocyte function-associated antigen 1</i> , Lymphozytenfunktionsassoziiertes Antigen 1
<b>LPS</b>	Lipopolysaccharid
<b>MACS</b>	<i>Magnetic Cell Separation</i> , Magnetische Zelltrennung
<b>MAG</b>	Myelin assoziiertes Glykoprotein
<b>MBP</b>	<i>Myelin basic protein</i> , basisches Myelinprotein
<b>MHC</b>	<i>Major histocompatibility complex</i> , Haupthistokompatibilitätskomplex
<b>MM</b>	Maus-Medium
<b>MOG</b>	Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein
<b>mRNA</b>	Mitochondroale RNA
<b>MS</b>	Multiple Sklerose
<b>Na</b>	Natrium
<b>NG2</b>	Neurales/Gliales Antigen 2
<b>NGS</b>	<i>Normal Goat Serum</i> , normales Ziegenserum
<b>NO</b>	Stickstoffmonoxid
<b>OHSC</b>	<i>Organotypic hippocampal slice culture</i> , Organotypische hippocampale Schnittkulturen
<b>OT2</b>	Transgene Mäuse, deren CD4 <sup>+</sup> Zellen Hühner-Ovalbumin spezifisch sind
<b>OVA</b>	Ovalbumin
<b>PBS</b>	<i>Phosphate Buffered Saline</i> , (Lösung)
<b>PFA</b>	Paraformaldehyd
<b>PLP</b>	Proteolipid Protein
<b>PPMS</b>	Primär Progressive Multiple Sklerose
<b>PTX</b>	Pertussis Toxin
<b>qRT-PCR</b>	<i>quantitative real time Polymerase chain reaction</i> , quantitative Echtzeit Polymerasen-Kettenreaktion
<b>RFP</b>	<i>Red Fluorescent Protein</i> , rotes Fluoreszenzprotein
<b>RNA</b>	<i>Ribonucleic Acid</i> , Ribonukleinsäure
<b>RNS</b>	<i>Reactive Nitrogen Species</i> , reaktive Stickstoffspezies
<b>Rps</b>	<i>Ribosomal protein small subunit</i> , (Haushaltsgen)
<b>RR-EAE</b>	<i>Relapsing Remitting EAE</i> , schubförmig remittierende MS

<b>RRMS</b>	<i>Relapsing Remitting MS</i> , schubförmig remittierende MS
<b>RT</b>	Raumtemperatur
<b>SCM</b>	<i>Slice Culture Medium</i> , Medium für OHSC
<b>SPM</b>	<i>Slice Preparation Medium</i> , Vorbereitungsmedium für OHSC
<b>SPMS</b>	Secondary Progressive MS, sekundär progrediente MS
<b>SVZ</b>	Subventrikuläre Zone
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	<i>Transforming growth factor beta</i> , (Zytokin)
<b>Th</b>	T-Helfer (Zelle)
<b>TMEV</b>	Theilers murines Enzephalomyelitis Virus
<b>VCAM-1</b>	<i>Vascular cell adhesion molecule</i> , vaskuläres Zelladhäsionsmolekül 1
<b>VLA-4</b>	<i>Very Late Antigen 4</i> , (Integrin)
<b>WM</b>	Waschmedium
<b>Wt</b>	Wildtyp
<b>z.B.</b>	zum Beispiel
<b>ZNS</b>	Zentrales Nervensystem



## Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1:** Schematische Darstellung des experimentellen Aufbaus zur mRNA Analyse mittels RT-qPCR. Anlage einer murinen Astrozytenkultur aus den Cortices von B6 Mäusen (Tag 1-2 postpartum) sowie einer murinen T-Zellkultur aus 2d2 und OT2 Mäusen (9-12 Wochen). T-Zellkulturen der Subtypen Th1 und Th17. Nach ausreichender Differenzierung der T-Zellen erfolgte die unterschiedliche Behandlung der Astrozyten für 24 h (Th1-Zellen der Mauslinie 2d2 und OT2, Th17-Zellen der Mauslinien 2d2 und OT2, Überstände der jeweiligen Zellkulturen, IFN  $\gamma$  oder IL-17) und im Anschluss direkte Aufarbeitung der Astrozyten-RNA sowie Umwandlung in cDNA für die Analyse mittels RT-qPCR. (Abbildung erstellt mit BioRender) ..... 2
- Abbildung 2:** Schematische Darstellung des experimentellen Aufbaus zur mikroskopischen Analyse von organotypischen Hippocampalen Schnittkulturen. Aus dem Gehirn von 5 Tage alten B6 Mäusen werden die Hippocampi präpariert und anschließend mit Hilfe des Tissue-Choppers (nicht abgebildet) in Frontalebene geschnitten. Die weitere Kultivierung erfolgt auf Netzeinsätzen in Medium. Die zur Setzung inflammatorischer Reize genutzten T-Zellen werden aus 2d2 Mäusen (8-12 Wochen alt) gewonnen und für 24h werden die Schnitte mit den T-Zellen inkubiert. Im Anschluss erfolgt die Fixierung des Gewebes (nicht abgebildet) und die erneute Verschmälerung der Schnitte in Frontalebene mittels Vibratom (Re-Slicen). Die gewonnenen Re-Slices werden immunhistochemisch gefärbt und anschließend zur Fluoreszenzmikroskopie auf Objektträger aufgezogen. Abbildung erstellt mit BioRender. .... 3
- Abbildung 3:** Schematische Darstellung der MS-Verlaufsformen. Auf der y-Achse wird die Schwere der Symptomatik dargestellt im Bezug zur Zeit (x-Achse). **A)** RRMS mit vollständiger Remission zwischen den Schüben. **B)** SPMS mit initial vollständiger Remission zwischen den Schüben und im Anschluss kontinuierlicher Symptomverschlechterung, teilweise mit Plateauphasen gleichbleibender Symptomschwere. **C)** PPMS, teilweise mit Plateauphasen gleichbleibender Symptomschwere. (Abbildungen modifiziert nach Lublin et al.) ..... 6
- Abbildung 4:** Schematische Darstellung der Entstehung von Autoreaktivität von Lymphozyten. Bei der Theorie der extrinsischen Aktivierung werden durch molekulares Mimikri nach einer systemischen Infektion Myelin-Proteine als Antigen wahrgenommen. Es kommt zur Aktivierung von gegen Myelin gerichteten Lymphozyten im Lymphgewebe. Die so geprimten Lymphozyten wandern ins ZNS ein, treffen dort auf ihr Zielantigen und stoßen den Kreislauf der Neuroinflammation an. Bei der Theorie der intrinsischen Aktivierung werden im ZNS durch z.B. Gewebeschädigung oder einer Infektion des ZNS Myelins Antigene in die Blutbahn freigesetzt. Diese im Blut gelösten Antigene führen in den Lymphknoten zum Priming von gegen Myelin gerichteten Lymphozyten. Die Migration der Lymphozyten in das ZNS führt dort ebenfalls zur Neuroinflammation. Durch die Inflammation werden jeweils weitere Gewebeschäden herbeigeführt, was in einen Teufelskreis der Freisetzung weiterer Antigene und der Aktivierung weiterer Immunzellen führt. (Abbildung modifiziert nach Hemmer et. al. 2002) ..... 8
- Abbildung 5:** Schematische Darstellung der Aufgaben von Astrozyten unter physiologischen Bedingungen (A) und unter Neuroinflammation (B). **A)** Unter physiologischen Bedingungen erfüllen Astrozyten eine Vielzahl von Funktionen. Sie stehen in Kontakt mit Synapsen, den Axonen an den Ranvierschen Schnürringen, mit anderen Astrozyten oder weiteren Gliazellen über Gap Junctions und mit ihren Ausläufern mit den Endothelzellen der zerebralen Blutgefäße. **B)** Unter pathologischen Bedingungen im Rahmen von Neuroinflammation verändern Astrozyten ihre Morphologie und verlieren einige ihrer Eigenschaften zur Aufrechterhaltung der Homöostase des Gewebes (loss of function). Zusätzlich verändert sich ihr Sekretionsverhalten, was zur Aufrechterhaltung des inflammatorischen Milieus beiträgt (gain of function). T-Zellen gelangen über die Blutgefäße ins ZNS. Die Interaktion zwischen T-Zellen und Astrozyten ist Gegenstand dieser Doktorarbeit. Abbildung angelehnt an Sofroniew et al. (2009), erstellt mit BioRender. .... 12
- Abbildung 6** Astroglie im somatosensorischen Kortex einer EAE Maus (rechts) im Vergleich zur gesunden Kontrolle links). Aharoni et al. 2021 ..... 14
- Abbildung 7:** Zytokin-Expression von kortikalen Astrozytenkulturen auf mRNA Ebene unter inflammatorischen Bedingungen. Als Referenzgen zur Normalisierung der Marker wurde die

Expression des Haushaltsgens Ribosomal Protein Small 29 (RPS29) zugrunde gelegt. Als nicht-inflammatorische und Lösungsmittel-Kontrolle wurde MM verwendet. Die Inflammationsprofile wurden in Th1- (links) und Th17- (rechts) vermittelte Effekte eingeteilt. Die Bedingungen im Th1-vermittelten Inflammationsprofil waren: Th1.2d2-Zellen, Th1.2d2-Zellkulturüberstand, Th1.OT2-Zellen, Th1.OT2-Zellkulturüberstand, IFN $\gamma$ . Die Bedingungen im Th17-vermittelten Inflammationsprofil waren: Th17.2d2-Zellen, Th17.2d2-Zellkulturüberstand, Th17.OT2-Zellen, Th17.OT2-Zellkulturüberstand, IL-17. Wenn nicht anders angegeben, zeigten sich keine signifikanten Änderungen der mRNA-Expression unter pH-Variationen. Die Darstellung der Daten erfolgte immer als Mittelwert  $\pm$ SEM. **A links)** Relative IL-6 Expression im Th1-vermittelten Inflammationsprofil. \*  $p < 0,05$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ,  $n = 4-9$  in den Bedingungen,  $n = 28$  in der Kontrolle **A rechts)** Relative IL-6 Expression im Th17-vermittelten Inflammationsprofil. \*  $p < 0,05$ ;  $n = 4-10$  in den Bedingungen,  $n = 28$  in der Kontrolle **B links)** Relative IL-10 Expression im Th1-vermittelten Inflammationsprofil.  $n = 3-9$  in den Bedingungen,  $n = 21$  in der Kontrolle **B rechts)** Relative IL-10 Expression im Th17-vermittelten Inflammationsprofil.  $n = 6-10$  in den Bedingungen,  $n = 21$  in der Kontrolle **C links)** Relative IL-23 Expression im Th1-vermittelten Inflammationsprofil.  $n = 3-6$  in den Bedingungen,  $n = 7$  in der Kontrolle. \*\*  $p < 0,01$  **C rechts)** Relative IL-23 Expression im Th17-vermittelten Inflammationsprofil.  $n = 4-6$  in den Bedingungen,  $n = 7$  in der Kontrolle. \*  $p < 0,05$  **D links)** Relative GMCSF Expression im Th1-vermittelten Inflammationsprofil. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\* $p \leq 0,001$ .  $n = 3-6$  in den Bedingungen,  $n = 18$  in der Kontrolle **D rechts)** Relative GMCSF Expression im Th17-vermittelten Inflammationsprofil. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\* $p \leq 0,001$ .  $n = 3-6$  in den Bedingungen,  $n = 18$  in der Kontrolle. ....47

**Abbildung 8:** Expression weiterer Aktivierungsmarker von kortikalen Astrozytenkulturen auf mRNA Ebene unter inflammatorischen Bedingungen. Als Referenzgen zur Normalisierung der Marker wurde die Expression des Haushaltsgens Ribosomal Protein Small 29 (RPS29) zugrunde gelegt. Als nicht-inflammatorische und Lösungsmittel-Kontrolle wurde MM verwendet. Die Inflammationsprofile wurden in Th1- (links) und Th17- (rechts) vermittelte Effekte eingeteilt. Die Bedingungen im Th1-vermittelten Inflammationsprofil waren: Th1.2d2-Zellen, Th1.2d2-Zellkulturüberstand, Th1.OT2-Zellen, Th1.OT2-Zellkulturüberstand, IFN $\gamma$ . Die Bedingungen im Th17-vermittelten Inflammationsprofil waren: Th17.2d2-Zellen, Th17.2d2-Zellkulturüberstand, Th17.OT2-Zellen, Th17.OT2-Zellkulturüberstand, IL-17. Wenn nicht anders angegeben, zeigten sich keine signifikanten Änderungen der mRNA-Expression unter pH-Variationen. Die Darstellung der Daten erfolgte immer als Mittelwert  $\pm$ SEM. **A links)** Relative iNOS Expression im Th1-vermittelten Inflammationsprofil. \*\*\* $p < 0,001$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$ . In den Bedingungen  $n = 5-7$ , in der Kontrolle  $n = 18$  **A rechts)** Relative iNOS Expression im Th17-vermittelten Inflammationsprofil. \* $p < 0,05$ . In den Bedingungen  $n = 5-7$ , in der Kontrolle  $n = 18$  **B links)** Relative H2D1 Expression im Th1-vermittelten Inflammationsprofil. In den Bedingungen  $n = 5-11$ , in der Kontrolle  $n = 24$  **B rechts)** Relative H2D1 Expression im Th17-vermittelten Inflammationsprofil. In den Bedingungen  $n = 6-9$ , in der Kontrolle  $n = 24$  **C links)** Relative GFAP Expression im Th1-vermittelten Inflammationsprofil. In den Bedingungen  $n = 3-8$ , in der Kontrolle  $n = 17$  **C rechts)** Relative GFAP Expression im Th17-vermittelten Inflammationsprofil. In den Bedingungen  $n = 6-8$ , in der Kontrolle  $n = 17$  .....49

**Abbildung 9:** Expression von Adhäsionsmolekülen von kortikalen Astrozytenkulturen auf mRNA Ebene unter inflammatorischen Bedingungen. Als Referenzgen zur Normalisierung der Marker wurde die Expression des Haushaltsgens Ribosomal Protein Small 29 (RPS29) zugrunde gelegt. Als nicht-inflammatorische und Lösungsmittel-Kontrolle wurde MM verwendet. Die Inflammationsprofile wurden in Th1- (links) und Th17- (rechts) vermittelte Effekte eingeteilt. Die Bedingungen im Th1-vermittelten Inflammationsprofil waren: Th1.2d2-Zellen, Th1.2d2-Zellkulturüberstand, Th1.OT2-Zellen, Th1.OT2-Zellkulturüberstand, IFN $\gamma$ . Die Bedingungen im Th17-vermittelten Inflammationsprofil waren: Th17.2d2-Zellen, Th17.2d2-Zellkulturüberstand, Th17.OT2-Zellen, Th17.OT2-Zellkulturüberstand, IL-17. Wenn nicht anders angegeben, zeigten sich keine signifikanten Änderungen der mRNA-Expression unter pH-Variationen. Die Darstellung der Daten erfolgte immer als Mittelwert  $\pm$ SEM. **A links)** Relative ICAM-1 Expression im Th1-vermittelten Inflammationsprofil. \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$ . In den Bedingungen  $n = 5-11$ , in der Kontrolle  $n = 27$  **A rechts)** Relative ICAM-1 Expression im Th17-vermittelten Inflammationsprofil. In den Bedingungen  $n = 6-10$ , in der

Kontrolle n=27 **B links**) Relative VCAM-1 Expression im Th1-vermittelten Inflammationsprofil. \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ . In den Bedingungen n=5-11, in der Kontrolle n=28 **B rechts**) Relative VCAM-1 Expression im Th17-vermittelten Inflammationsprofil. In den Bedingungen n=7-10, in der Kontrolle n=28 **C links**) Relative MCAM-1 Expression im Th1-vermittelten Inflammationsprofil. In den Bedingungen n=4-9, in der Kontrolle n=15 **C rechts**) Relative MCAM-1 Expression im Th17-vermittelten Inflammationsprofil. In den Bedingungen n=5-7, in der Kontrolle n=15 .....51

**Abbildung 10:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von OHSC aus B6 Mäusen (p5) nach 24 h Inkubation mit MM (Kontrolle), Th1-Zellen oder Th17-Zellen. 40 fache Vergrößerung. **A**) DAPI in blau, GFAP in grün, ICAM-1 in rot. In der Kontrollbedingung wurde exemplarisch die ICAM-1-Expression auf einem Blutgefäß mit dargestellt (weißer Pfeil). **B**) DAPI in blau, GFAP in grün, VCAM-1 in rot. ....53

**Abbildung 11:** In vivo Expression der Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1 auf Astrozyten während einer T-Zellsubtyp-spezifischen Transfer-EAE. Eine EAE Induktion durch nicht ZNS spezifische T Zellen (OT2) ergab sich als nicht erfolgreich, da die Tiere nicht erkrankten (Daten nicht gezeigt). **A**) Exemplarischer Verlauf einer Transfer-EAE mittels Th1-Zellen. Akute Phase 3 Tage nach Symptombeginn, chronische Phase mind. 10 Tage später. n=8 **B**) Exemplarischer Verlauf einer Transfer-EAE mittels Th17-Zellen. Akute Phase 3 Tage nach Symptombeginn, chronische Phase mind. 5 Tage später. n=6 **C**) ICAM-1 Expression auf Astrozyten nach Transfer-EAE. Aufarbeitung und angeschlossene Markeranalyse mittels Durchflusszytometrie. **C links**) Signifikante Steigerung der Expression von ICAM-1 in der akuten Phase der Th1-vermittelten Transfer-EAE. Trend zur Zunahme der ICAM-1 Expression in der chronischen Phase der Th17-vermittelten Transfer-EAE. \* $p < 0,05$ . n=3-4 **C rechts**) Signifikante Steigerung der Expression von ICAM-1 auf Astrozyten bei Tieren mit einem Krankheitsscore von  $> 2$  in der Th1-vermittelten Transfer-EAE im Vergleich zur gesunden Gruppe und im Vergleich zu Tieren der Th17-vermittelten Transfer-EAE mit einem Krankheitsscore  $> 2$ . \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ . In der gesunden Kontrollgruppe n=4, Th1 n=8, Th17 n=6. (Abbildung modifiziert nach Loos et. al. 2020) **D**) VCAM-1 Expression auf Astrozyten nach Transfer-EAE. Aufarbeitung mittels Durchflusszytometrie. **D links**) Signifikante Steigerung der Expression von VCAM-1 in der akuten Phase der Th1-vermittelten Transfer-EAE. Trend zur Zunahme der VCAM-1 Expression in der chronischen Phase der Th17-vermittelten Transfer-EAE \* $p < 0,05$ . n=3-4 **D rechts**) Signifikante Steigerung der Expression von VCAM-1 auf Astrozyten bei Tieren mit einem Krankheitsscore von  $> 2$  in der Th1-vermittelten Transfer-EAE im Vergleich zur gesunden Gruppe und im Vergleich zu Tieren der Th17-vermittelten Transfer-EAE mit einem Krankheitsscore  $> 2$ . Ebenso signifikante Steigerung der Expression von VCAM-1 auf Astrozyten bei Tieren mit einem Krankheitsscore von  $> 2$  in der Th17-vermittelten Transfer-EAE im Vergleich zur gesunden Gruppe. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$ . In der gesunden Kontrollgruppe n=4, Th1 n=8, Th17 n=6 (Abbildung modifiziert nach Loos et. al. 2020) .....55

## Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1:</b> Instrumente und Geräte .....	22
<b>Tabelle 2:</b> Laborutensilien und Verbrauchsgegenstände .....	23
<b>Tabelle 3:</b> Chemikalien und Reagenzien.....	24
<b>Tabelle 4:</b> Puffer und Kulturmedien.....	26
<b>Tabelle 5:</b> Kits.....	27
<b>Tabelle 6:</b> Microbeads .....	28
<b>Tabelle 7:</b> Zytokine .....	28
<b>Tabelle 8:</b> Antikörper FACS .....	28
<b>Tabelle 9:</b> Antikörper Immunhistochemie .....	29
<b>Tabelle 10:</b> Primer Sequenzen qRT-PCR .....	29
<b>Tabelle 11:</b> Mäuse .....	30
<b>Tabelle 12:</b> Software.....	30
<b>Tabelle 13:</b> Behandlung Astrozytenkulturen.....	35
<b>Tabelle 14:</b> Master Mix cDNA-Synthese .....	37
<b>Tabelle 15:</b> Thermo-Cycler Zyklen .....	37
<b>Tabelle 16:</b> qRT-PCR Zyklen .....	38
<b>Tabelle 17:</b> Typischer EAE-Verlauf .....	39
<b>Tabelle 18:</b> Atypischer EAE-Verlauf.....	40
<b>Tabelle 19:</b> Vibratom Einstellungen .....	42

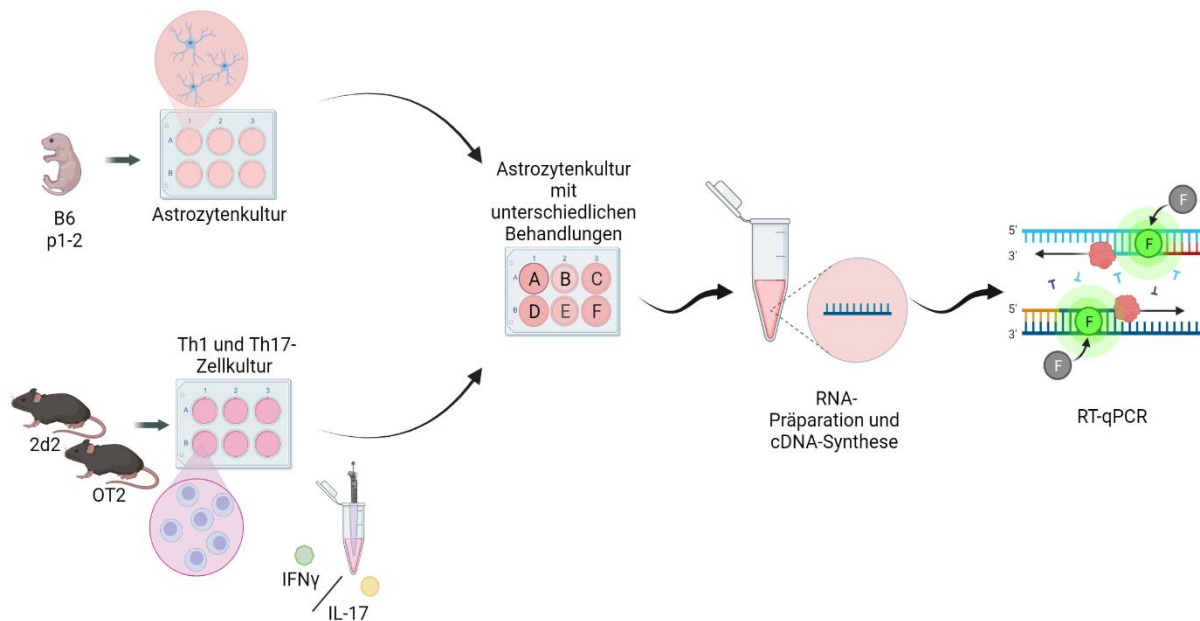
## 1 Einleitung / Ziel der Dissertation

Es ist mittlerweile wissenschaftlicher Konsens, dass Astrozyten eine entscheidende Rolle im Rahmen neuroinflammatorischer Prozesse einnehmen [1, 2]. Im Rahmen von MS sind sie nicht nur durch ihre Einflüsse auf die Blut-Hirn-Schranke (BHS) maßgeblich beteiligt, sondern sind auch Teil inflammatorischer Prozesse innerhalb der Läsionen [3]. Trotzdem sind bis heute die genauen Mechanismen, welche astrozytäre Reaktionen im inflammatorischen Milieu auslösen, nicht genau bekannt. Der Erkenntnisgewinn zu möglichen Interaktionen von Astrozyten mit infiltrierenden und residenten Immunzellen im inflammatorischen Milieu des zentralen Nervensystems (ZNS) und der mit dem Erkenntnisgewinn einhergehenden Möglichkeit für neue therapeutische Ansätze ist von großer Relevanz [4].

Ziel dieser Dissertation war es, ein tieferes Verständnis für die Reaktionsmechanismen von Astrozyten zu erlangen. Als inflammatorische Stimuli wurden in Bezug auf die in MS und EAE beteiligten Lymphozyten T-Helfer (Th)1- und Th17-Zellen, deren Hauptzytokine IFN $\gamma$  und Interleukin (IL-)17 sowie das Überstandsmedium, in dem die Zellen gewachsen waren, gewählt [5]. Die verwendeten T-Zellen waren einerseits in ihrer Antigenbindung ZNS-spezifisch (2d2) für das Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein (MOG) oder nicht ZNS-spezifisch (OT2) für Ovalbumin (OVA). OVA kommt in der Spezies Maus nicht vor, weshalb es zu keinen peripheren Effekten der Sensibilisierung der T-Zellen auf OVA kommen kann. Zur weiteren Differenzierung des Effektes wurden als Stimuli Medien mit niedrigerem pH-Wert (6,2 und 6,6) verwendet, um so einen entscheidenden Faktor des inflammatorischen Milieus, wie es in der EAE in den Läsionsgebieten oder aber auch bei ischämischen Infarkten vorkommt, zu mimen [6]. So sollte eine Differenzierung der gemessenen Veränderungen der mRNA-Expression auf zelluläre, zelltypspezifische, antigenspezifische, sekretorische oder durch pH-Schwankungen verursachte Effekte vorgenommen werden.

Die Analyse der Veränderungen auf mRNA-Ebene als Teil der astrozytären Reaktion auf ausgewählte Inflammationsreize stellte die erste Ebene der Untersuchungen dieser Doktorarbeit dar. Als Modell zur Imitation der Neuroinflammation *in vitro* und deren Auswirkung im Speziellen auf Astrozyten wurde eine Astrozytenkultur angelegt und für 24 h mit unterschiedlichen MS-spezifischen neuroinflammatorischen Stimuli inkubiert. Nach der Inkubation erfolgte die Ernte der Astrozyten und die Extraktion der mRNA mit anschließender Umwandlung in cDNA und abschließender Analyse mittels RT-qPCR. Analysiert wurde die Veränderung der mRNA-Expression der Astrozyten von verschiedenen Zytokinen, Adhäsionsmolekülen und weiteren Aktivierungsmarkern (**Abbildung 1**). Dass Astrozyten in der Lage sind, die getesteten Moleküle zu exprimieren, war durch vorausgegangene Literaturrecherche bereits bekannt. Doch die genauen Modalitäten, unter denen Astrozyten die untersuchten Moleküle exprimieren, besonders im Hinblick auf die bei MS vorkommende

Inflammation durch Th1- und Th17- Zellen, ist noch nicht bekannt. Zur Gewinnung astrozytenspezifischer Daten wurde nach dem modifizierten Protokoll von Weinstein [7] eine Astrozytenkultur angelegt. Die Reinheit der Kultur wurde optisch überprüft. Die verwendeten T-Zellkulturen wurden mittels Durchflusszytometrie auf ihre Differenzierung und die damit einhergehende Expression der Hauptzytokine IFN $\gamma$  und IL-17 untersucht und lediglich Kulturen mit einer Expressionsrate von über 90 % CD4<sup>+</sup> und über 20 % IFN $\gamma$  bzw IL-17 wurden weiterverwendet.

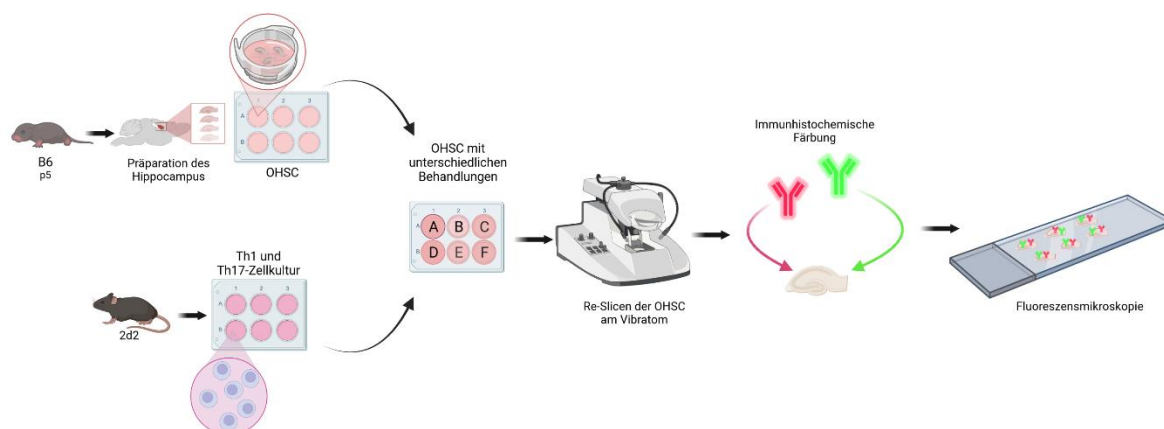


**Abbildung 1:** Schematische Darstellung des experimentellen Aufbaus zur mRNA Analyse mittels RT-qPCR. Anlage einer murinen Astrozytenkultur aus den Cortices von B6 Mäusen (Tag 1-2 postpartum) sowie einer murinen T-Zellkultur aus 2d2 und OT2 Mäusen (9-12 Wochen). T-Zellkulturen der Subtypen Th1 und Th17. Nach ausreichender Differenzierung der T-Zellen erfolgte die unterschiedliche Behandlung der Astrozyten für 24 h (Th1-Zellen der Mauslinie 2d2 und OT2, Th17-Zellen der Mauslinien 2d2 und OT2, Überstände der jeweiligen Zellkulturen, IFN  $\gamma$  oder IL-17) und im Anschluss direkte Aufarbeitung der Astrozyten-RNA sowie Umwandlung in cDNA für die Analyse mittels RT-qPCR. (Abbildung erstellt mit BioRender)

Zur Überprüfung der Übersetzung der Effekte von mRNA- auf Proteinebene wurde eine organotypische hippocampale Schnittkultur (OHSC) angelegt und an Tag 2 für 24 h mit Th1.2d2- und Th17.2d2-Zellen inkubiert sowie eine Kontrolle, welche lediglich mit Mausmedium (MM) behandelt wurde. Um noch dünnere Gewebeschnitte zu generieren und somit ein besseres Eindringen der Antikörper für die immunhistochemische Färbung zu gewährleisten, wurden die Hippocampuschnitte nach der Inkubation am Vibratom in noch feinere Einheiten geschnitten (Re-Slicen). Vorteil der OHSC ist die Darstellung und Beobachtung nicht nur einer einzelnen Astrozyten-Zellkultur, sondern deren Integrität in die neuronale und Gliazell-Architektur mit deren gesamter Komplexität [8]. Die im Anschluss an die Inkubation der OHSCs mit den T-Lymphozyten erfolgte immunhistochemische Färbung sollte exemplarisch die Übersetzung der auf mRNA-Ebene gesehenen Effekte auf

Proteinebene darstellen. Eine Quantifikation der immunhistochemischen Ergebnisse erfolgte nicht, da die Komplexität der Schnittkulturen eine Einzelzellauswertung nicht sinnvoll erlaubt [9] und weitere Quantifizierungsprozesse in den in vivo Experimenten durchgeführt wurden. Den exemplarischen Aufbau der Kultur der OHSC und die weitere Behandlung sind in **Abbildung 2** dargestellt.

Als Astrozytenmarker wurde das Intermediärfilament saures Gliafaserprotein (*Glial Fibrillary Acid Protein* (GFAP)) gewählt [10], die Zellkernfärbung erfolgte mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI). Als Zielstruktur der Zelladhäsionsmoleküle (*Cell Adhesion molecules* (CAMs)) wurden nach Auswertung der mRNA-Daten ICAM-1 und VCAM-1 gewählt. Die Schnitte wurden optisch auf das Vorhandensein einer übermäßigen Glianarbe kontrolliert und bei Schnitten ohne übermäßige Glianarbe exemplarische Aufnahmen in der CA1-Region der Hippocampi gemacht [11]. Alle Aufnahmen innerhalb einer Gruppe erfolgten unter denselben Bedingungen, um die Vergleichbarkeit innerhalb einer Gruppe zu gewährleisten.



**Abbildung 2:** Schematische Darstellung des experimentellen Aufbaus zur mikroskopischen Analyse von organotypischen Hippocampalen Schnittkulturen. Aus dem Gehirn von 5 Tage alten B6 Mäusen werden die Hippocampi präpariert und anschließend mit Hilfe des Tissue-Choppers (nicht abgebildet) in Frontalebene geschnitten. Die weitere Kultivierung erfolgt auf Netzeinsätzen in Medium. Die zur Setzung inflammatorischer Reize genutzten T-Zellen werden aus 2d2 Mäusen (8-12 Wochen alt) gewonnen und für 24h werden die Schnitte mit den T-Zellen inkubiert. Im Anschluss erfolgt die Fixierung des Gewebes (nicht abgebildet) und die erneute Verschmälnerung der Schnitte in Frontalebene mittels Vibratom (Re-Slicen). Die gewonnenen Re-Slices werden immunhistochemisch gefärbt und anschließend zur Fluoreszenzmikroskopie auf Objektträger aufgezogen. Abbildung erstellt mit BioRender.

Als letzte Untersuchungsebene wurde die Umsetzung der in vitro gewonnenen Erkenntnisse zu den Adhäsionsmolekülen in vivo untersucht. Als Modell zur Untersuchung wurde eine Transfer-EAE gewählt. Mit der Durchführung einer Transfer-EAE lassen sich Th1- und Th17-spezifische Effekte voneinander differenzieren. Durch den Transfer von ZNS-spezifischen Th1.2d2-Zellen induzierte EAE-Verläufe präsentieren sich eher klassisch (aufsteigender Parese), während durch den Transfer von ZNS-spezifischen Th17-Zellen (2d2) induzierte EAE-Verläufe sich eher atypisch (hirnstammbetonte und zerebelläre Effekte wie Ataxie) präsentieren [12]. Ebenso zeigt sich in der Regel ein früherer Beginn der Symptomatik bei

Th1-vermittelten EAEs im Vergleich zu Th17-vermittelten EAEs [12, 13]. Wie von Loos et. al gezeigt, können Th17-Zellen im EAE-Verlauf in vivo Eigenschaften von Th1-Zellen mimen und als sogenannte exTh17-Zellen unter anderem IFN $\gamma$  produzieren [13]. In Hinblick auf die Übertragbarkeit der in vitro erworbenen mRNA-Daten auf die in vivo erhobenen Daten auf Proteinebene liegt somit die höchste Vergleichbarkeit zwischen den mRNA Daten und den Analysen der akuten Krankheitsphase der EAE.

Die weitere Analyse der Astrozyten erfolgte mittels Durchflusszytometrie. Als Astrozytenmarker wurden GFAP als intrazellulärer Bestandteil des Zytoskeletts [14] und der Glutamat-Aspartat-Transporter (GLAST, EAAT1) als Oberflächenprotein gewählt [15]. Im Rahmen der Untersuchung zeigte sich jedoch eine Unregelmäßigkeit im Bindeverhalten von GFAP, sodass für die Auswertung der Daten lediglich GLAST als Astrozytenmarker verwendet wurde. Als Analysepunkte wurden einerseits die ICAM-1 und VCAM-1 Expression in der jeweils akuten und chronischen Phase der Transfer-EAEs, aber auch zusätzlich besonders stark erkrankte Tiere mit einem Krankheitsscore von > 2 im Vergleich zu gesunden B6-Mäusen betrachtet.

Die gewonnen Erkenntnisse sollen dazu beitragen, die Rolle von Astrozyten im inflammatorischen Geschehen einer MS-Erkrankung besser zu verstehen. Insbesondere astrozytäre Reaktionen auf durch Th1- und Th17-Zellen vermittelte Reize wurden im Rahmen dieser Doktorarbeit untersucht. Der komplexen Pathogenese von MS, die ein Wechselspiel zwischen den verschiedensten residenten und eingewanderten Zellarten darstellt, soll so weiter auf den Grund gegangen werden. So besteht die Hoffnung, eines Tages durch ein besseres Verstehen der Krankheit Medikamente zur Behandlung und vielleicht sogar Heilung entwickeln zu können. Einen kleinen Anteil soll diese Doktorarbeit dazu beisteuern.

## **2 Literaturdiskussion**

### **2.1 Multiple Sklerose**

#### **2.1.1 Epidemiologie und Pathogenese**

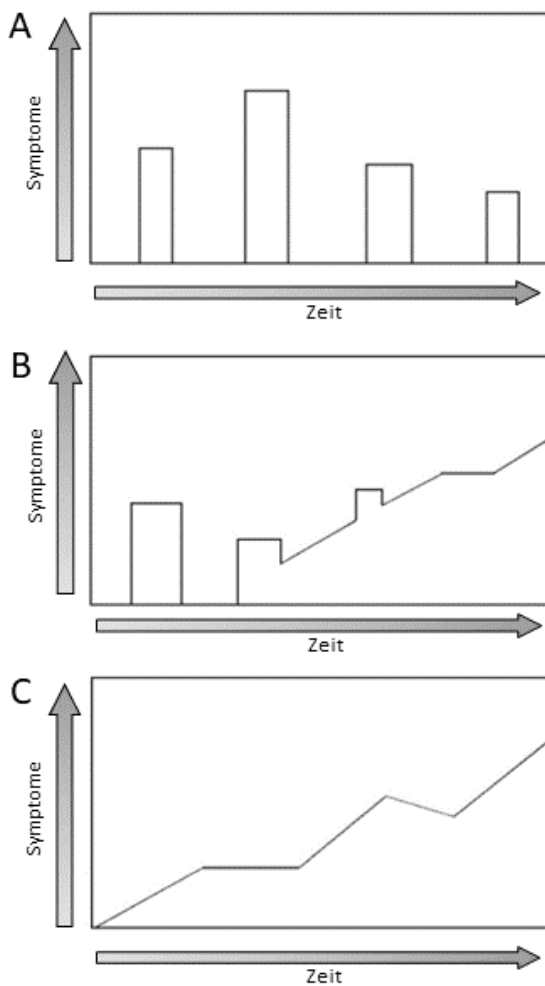
Multiple Sklerose (MS) ist eine chronisch entzündliche Erkrankung des zentralen Nervensystems (ZNS), wovon weltweit über 2 Millionen Menschen betroffen sind [16–18]. Im Rahmen der Erkrankung kommt es zu Demyelinisierung und dem Verlust axonaler Strukturen im ZNS, was durch unterschiedliche Lokalisationen der Veränderungen zu einer großen Bandbreite an Symptomen führen kann – von Visusveränderungen, über Gleichgewichts- oder Sensibilitätsstörungen, Muskelschwäche und Blasenfunktionsstörungen bis hin zu psychiatrischer Symptomatik [19]. Trotz intensiver Forschung zum Krankheitsursprung und -verlauf ist MS bis heute eine nicht heilbare Erkrankung und in vielen Ländern der Welt stellt sie die Hauptursache für nichttraumatische Behinderungen von jungen Erwachsenen dar [18].



Das mittlere Alter bei Diagnosestellung liegt weltweit bei etwa 32 Jahren – ein Alter, in dem viele Menschen sowohl beruflich als auch privat mitten im Leben stehen und in dem eine solche Diagnose starke Veränderungen für die weitere Lebensplanung mit sich bringen kann, aber auch volkswirtschaftlich erhebliche Einbußen darstellt [20]. Noch vor etwa 40 Jahren bedeutete die Diagnose MS für viele Betroffene eine starke Verschlechterung der neurologischen Fähigkeiten innerhalb weniger Jahre [21]. Und auch heute noch sind viele bereits ab dem 5. bis 6. Lebensjahrzehnt nur noch eingeschränkt gehfähig [22]. Am häufigsten betroffen von MS sind Frauen, mit einem weltweiten Verhältnis von 2:1 [23]. Aber auch andere Faktoren, wie die geographische Lage oder der ethnische Hintergrund haben Einfluss auf die Prävalenz von MS [20]. Ebenso spielen genetische Faktoren eine Rolle beim individuellen Risiko, an MS zu erkranken, deren genauen Hintergründe bis heute aber weiterhin nicht vollends geklärt werden konnten [17, 24].

Multiple Sklerose stellt eine Ausschlussdiagnose dar – das heißt, nur wenn es keine andere Erklärung (Trauma, akute Infektion o.Ä.) für das Auftreten der Symptomatik gibt, kann die Diagnose gestellt werden. Als Kriterien müssen klinische Symptome vorliegen ebenso wie eine mittels MRT messbare zeitliche und räumliche Dissemination (DIT (*dissemination in time*) und DIS (*dissemination in space*)) der Läsionen im ZNS [25].

Die Einteilung der Erkrankung wird anhand der Verlaufsform vorgenommen. Entscheidende Merkmale stellen das Auftreten von akuten Verschlechterungen (Schüben), die graduell zunehmende Verschlechterung oder eine Kombination aus beidem dar [26]. Sogenannte Schübe können über einen Zeitraum von wenigen Tagen bis Wochen auftreten und sind teilweise vollständig, aber vor allem im Krankheitsverlauf nur partiell reversibel. In der aktuellen S2k Leitlinie der Kommission Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Neurologie [16] erfolgt die Unterteilung in die schubförmig remittierende MS (RRMS (*relapsing-remitting* MS)), die sekundär progrediente MS (SPMS (*secondary progressive* MS)), die primär progrediente MS (PPMS (*primary progressive* MS)) und das klinisch isolierte Syndrom (KIS). Die RRMS ist die häufigste initiale Diagnose (ca. 85% der Erkrankten) und ist geprägt durch die charakteristischen Krankheitsschübe, welche teilweise wieder vollständig in Remission treten können [27]. Bei vielen Betroffenen wandelt sich diese Verlaufsform jedoch innerhalb von etwa 20 Jahren in eine SPMS um. Dies bedeutet, dass es nach einem Schub nicht mehr zum vollständigen Rückgang der Symptomatik kommt, sondern zu einer zunehmenden Progression der neuronalen Ausfälle. Bei der PPMS tritt die Behinderungsprogression bereits am Anfang der Erkrankung ein (ca. 15% der Erkrankten). Auch bei der PPMS kann es zu intermittierenden Schüben kommen (**Abbildung 3**). Das KIS stellt mutmaßlich die Erstmanifestation der Erkrankung dar, denn im Gegensatz zu den anderen Verlaufsformen lässt sich trotz vorhandener Symptomatik noch keine zeitliche Dissemination bildlich festhalten [16].



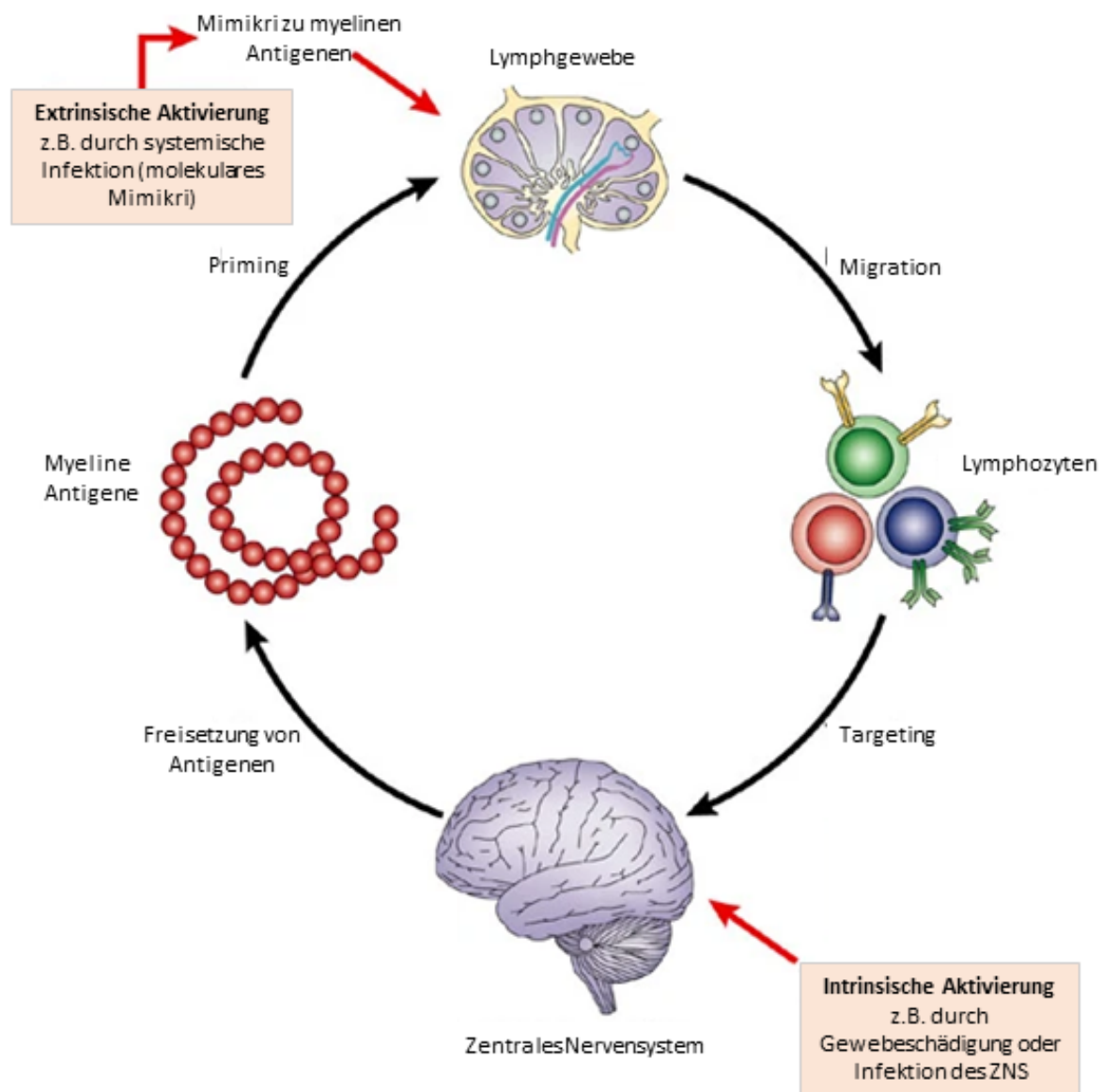
**Abbildung 3:** Schematische Darstellung der MS-Verlaufsformen. Auf der y-Achse wird die Schwere der Symptomatik dargestellt im Bezug zur Zeit (x-Achse). **A)** RRMS mit vollständiger Remission zwischen den Schüben. **B)** SPMS mit initial vollständiger Remission zwischen den Schüben und im Anschluss kontinuierlicher Symptomverschlechterung, teilweise mit Plateauphasen gleichbleibender Symptomschwere. **C)** PPMS, teilweise mit Plateauphasen gleichbleibender Symptomschwere. (Abbildungen modifiziert nach Lublin et al.)

Beim genaueren Blick auf die Pathogenese der Erkrankung stößt man bei jeder Antwort auf mindestens zwei weitere Fragen. Denn die genauen Mechanismen, die zu einer MS führen, sind bis heute noch nicht vollends identifiziert. Festzuhalten ist jedoch, dass das Immunsystem und das ZNS eine toxische Beziehung eingehen – mit verheerenden Folgen für die Integrität des ZNS in Form eines Teufelskreises aus Gewebeschädigung, Freisetzung von immunaktivierenden Botenstoffen und dem Beginn einer dadurch ausgelösten Inflammationskaskade, die zu weiterer Gewebeschädigung führt [25]. Die Läsionen stellen sich in Form sogenannter Plaques vor allem als Demyelinisierungen (Zerstörung von Oligodendrozyten) der weißen Substanz des Gehirns, des Rückenmarks und des N. opticus dar. Aber auch axonale Schäden (an Neuronen), die im Verlauf die MS auch zu einer neurodegenerativen Erkrankung werden lassen, sind zu beobachten [28]. Ebenso kann auch die graue Substanz, wie zum Beispiel der Kortex von inflammatorischen und neurodegenerativen Prozessen betroffen sein [29, 30]. Außerdem reagiert das ZNS auf die Angriffe auf Oligodendrozyten und Neurone mit Remyelinisierungsversuchen und Astrogliose [31]. Je nach Zusammensetzung aus Demyelinisierung, Remyelinisierung, Astrogliose

und/oder dem Vorhandensein verschiedenster Immunzellen können Plaques nach unterschiedlichen Mustern eingeteilt werden, wobei sowohl eine große Heterogenität innerhalb verschiedener MS-Formen als auch je nach Krankheitsstadium eine intraindividuelle Heterogenität festgehalten werden kann [32, 33].

Von Seiten des Immunsystems gelten T-Zellen als Hauptverantwortliche, die entgegengesetzt ihrer eigentlichen Aufgabe körpereigene Strukturen des ZNS als fremd erkennen und angreifen [34]. Aber auch B-Zellen rücken immer mehr in den Fokus wissenschaftlicher Untersuchungen zur Pathogenese [35]. Als Hauptantigene der autoreaktiven Zellen werden mit der Myelinschicht assoziierte Proteine wie das Myelin assoziierte Glykoprotein (MAG), das basische Myelinprotein (*myelin basic protein* (MBP)), das Myelin Oligodendrozyten Glykoprotein (MOG) und das Proteolipid Protein (PLP) angenommen [34]. Zur Entstehung der Autoreaktivität der Immunzellen gibt es zwei Haupttheorien. Die erste Theorie geht von einer intrinsischen Aktivierung des Immunsystems aus, wobei die Induktion der Inflammationskaskade durch ein Ereignis im ZNS ausgelöst wird, bei dem ZNS-spezifische Antigene in die Peripherie gelangen und so die Autoreaktivität der Immunzellen begünstigt. Die zweite Theorie geht von einer außerhalb des ZNS stattfindenden fehlgeleiteten Aktivierung des Immunsystems (z.B. durch systemische Infektionen wie mit dem Epstein-Barr-Virus) aus, die durch molekulares Mimikri dann zur Autoreaktivität gegen ZNS-Strukturen führt [25, 36]. In **Abbildung 4** ist die Entstehung der Autoreaktivität schematisch dargestellt.

Einmal aktiviert, können die T-Zellen die BHS überschreiten [37] und so das sonst immunprivilegierte ZNS infiltrieren. An der Überschreitung der Barriere sind Adhäsionsmoleküle wie das vaskuläre Zelladhäsionsmolekül 1 (*vascular cell adhesion molecule* (VCAM-1)) und das interzelluläre Adhäsionsmolekül 1 (*intercellular adhesion molecule* (ICAM-1)) beteiligt [38]. Im ZNS angekommen, werden die T-Zellen durch antigenpräsentierende Zellen (*antigen presenting cells* (APC)) über Moleküle des Haupthistokompatibilitätskomplexes (*major histocompatibility complex* (MHC)) reaktiviert und differenzieren sich weiter in proinflammatorische Subtypen aus [39]. Als APC im ZNS können unter anderem Astrozyten dienen. Der so in Gang gesetzte Kreislauf der Neuroinflammation führt zu den bereits erwähnten Gewebeveränderungen mit Demyelinisierung, Neurodegeneration und Astroglie. [3, 31–33, 39, 40].



**Abbildung 4:** Schematische Darstellung der Entstehung von Autoreaktivität von Lymphozyten. Bei der Theorie der extrinsischen Aktivierung werden durch molekulares Mimikri nach einer systemischen Infektion Myelin-Proteine als Antigen wahrgenommen. Es kommt zur Aktivierung von gegen Myelin gerichteten Lymphozyten im Lymphgewebe. Die so geprimten Lymphozyten wandern ins ZNS ein, treffen dort auf ihr Zielantigen und stoßen den Kreislauf der Neuroinflammation an. Bei der Theorie der intrinsischen Aktivierung werden im ZNS durch z.B. Gewebeschädigung oder einer Infektion des ZNS Myelins Antigene in die Blutbahn freigesetzt. Diese im Blut gelösten Antigene führen in den Lymphknoten zum Priming von gegen Myelin gerichteten Lymphozyten. Die Migration der Lymphozyten in das ZNS führt dort ebenfalls zur Neuroinflammation. Durch die Inflammation werden jeweils weitere Gewebeschäden herbeigeführt, was in einen Teufelskreis der Freisetzung weiterer Antigene und der Aktivierung weiterer Immunzellen führt. (Abbildung modifiziert nach Hemmer et. al. 2002)

Durch intensive Forschung zu MS in den letzten Jahrzehnten konnten erhebliche Fortschritte in der Behandlung von MS-Erkrankten gemacht werden [16, 41]. Doch noch immer stellt sie eine nicht heilbare Erkrankung dar, deren genauer Pathomechanismus bis heute noch nicht genau geklärt werden konnte [19, 20, 25, 42, 43]. Zum genaueren Verständnis der Pathogenese und des Krankheitsverlaufs wurden verschiedene murine Krankheitsmodelle entwickelt, die die Untersuchung von vitalem Gewebe ermöglichen. Ohne den Zuwachs an

durch diese Tierexperimente gewonnenen Erkenntnisse stünde die Medizin nicht an dem Punkt der Behandelbarkeit der MS, an dem sie heute steht.

### 2.1.2 Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis

Da es derweil noch nicht möglich ist, vitales humanes Hirngewebe zu entnehmen, ohne dabei beträchtliche Schäden bei der betroffenen Person zu hinterlassen, bedarf es Modellen zur weiteren Erforschung der MS. Und wie vieles in der Medizin entstand auch eines der meistgenutzten Modelle der MS, die experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis (EAE), eher zufällig, als Rivers et al. 1933 eigentlich zu Impfstoffen gegen Pocken, Masern und Tollwut forschten und sich bei einigen Tieren als Nebenwirkung eine disseminierte Enzephalomyelitis mit Demyelinisierung entwickelte [44]. Mittlerweile haben sich die experimentellen Bedingungen zur Induktion einer EAE signifikant verändert und für verschiedene Erkrankungsformen und -stadien der MS gibt es entsprechende EAE-Modelle [45]. Wie jedes Modell kann auch die EAE nicht im gesamten Umfang und in jedem Detail die MS nachahmen, was teilweise zu erheblichen Differenzen zwischen dem wissenschaftlichen Fortschritt bei der EAE und der klinischen Relevanz in der MS führte [5]. Dennoch ist sie weiterhin das meistgenutzte Modell und viele heute weitverbreitete MS-Medikamente beruhen auf Forschung am EAE-Modell [46]. EAE ist in verschiedenen Spezies auslösbar, doch die EAE in Mäusen stellt das am häufigsten verwendete Modell dar [47]. Die EAE ist ebenso wie die MS eine demyelinisierende Erkrankung des ZNS, angetrieben durch in der Peripherie auf unterschiedliche Bestandteile von Myelin spezifisch differenzierte T-Zellen [48]. Im Unterschied zur MS, bei der es sich um eine autoimmune Erkrankung handelt, erfolgt das Priming der T-Zellen bei der EAE experimentell durch gentechnische Veränderungen oder die Injektion von Myelinbestandteilen mit Adjuvantien [46]. Neben der EAE gibt es auch weitere Tiermodelle, die verschiedene Aspekte von MS mimen können, wie virale Modelle mit Theilers murinum Enzephalomyelitis Virus (TMEV) oder Cuprizone-Modelle, bei denen den Tieren ein toxisches Agens gefüttert wird, welches zu Demyelinisierung führt [49].

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde sich für die Anwendung einer Transfer-EAE entschieden. Hierbei wurden gentechnisch veränderten Mäusen ( $Rag2^{-/-}$ ) ohne unter anderem funktionsfähige  $CD4^+$  T-Helferzellen (Th-Zellen) intravenös auf MOG<sub>35-55</sub> spezialisierte Th-Zellen aus ebenfalls gentechnisch veränderten Mäusen (2d2) injiziert [12, 50, 51]. Die sogenannte Transfer-EAE erlaubt die Untersuchung T-zellspezifischer Effekte der Neuroinflammation, da im Gegensatz zur klassischen EAE keine Adjuvantien eingesetzt werden müssen, deren Effekte als beeinflussender Faktor sonst immer mit einzubeziehen wären [52, 53]. Der Einsatz von  $CD4^+$  T-Zell induzierten Transfer-EAEs belegt die bereits Anfang der 1980er Jahre angenommene These, dass  $CD4^+$  T-Zellen Treiber der Erkrankung darstellen [54]. Wird der Transfer von Th1-Zellen durchgeführt, entwickeln die meisten Tiere

sogenannte klassische EAE-Symptome, beginnend mit einer Parese des Schwanzes bis hin zur kompletten Lähmung der Extremitäten [12, 55]. Bei der Induktion durch Th17-Zellen entwickeln ca. 50 % der Tiere sogenannte „atypische“ Symptome wie Ataxie [12]. Jedoch besteht eine hohe Varianz zwischen den Verläufen, je nach genutzten Protokollen in verschiedenen Laboratorien, was einen genauen Vergleich zwischen Daten aus verschiedenen Arbeitsgruppen erschwert [13].

## 2.2 Astrozyten

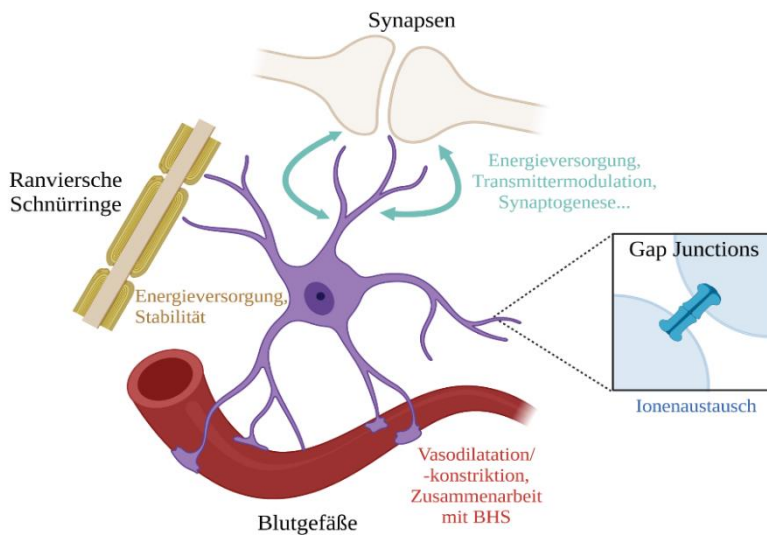
### 2.2.1 Astrozyten – mehr als Nervenkit

Betreibt man Literaturrecherche zu Astrozyten, stößt man immer wieder auf den Hinweis, dass Astrozyten zu wissenschaftlich lang vernachlässigten Zellen des ZNS gehörten und sich daraus ein weites Feld an zu klärenden Fragen zu dieser Population ergibt [15, 56–59]. 1856 erstmals von Virchow als „Nervenkit“ beschrieben [60], lässt sich mit ein bisschen Fantasie bereits die tragende Rolle für den Zusammenhalt, die Homöostase des ZNS hineininterpretieren. In **Abbildung 5A** sind schematisch die Aufgaben von Astrozyten unter physiologischen Bedingungen dargestellt. Astrozyten machen ca. 30% aller Zellen des ZNS aus [1, 61] und ihre Aufgaben umfassen weit mehr als lediglich den physischen Zusammenhalt. Dabei sind sie bei Weitem keine homogene Zellpopulation und unterscheiden sich je nach Lokalisation, Morphologie, äußeren Einflüssen, aber auch in ihrem Ursprung und in ihren Eigenschaften [15, 59, 62, 63], was die Bandbreite ihrer Fähigkeiten erklärt. Eine der Hauptquellen von Astrozyten in der späten Embryogenese stellen Radiale Glia, die dem Neuroepithelium entspringen, dar. Aber auch Progenitorzellen in der subventrikulären Zone (SVZ), welche bis ins Erwachsenenalter im ZNS erhalten bleiben, können sich zu Astrozyten differenzieren. Ebenso können Oligodendrozytenvorläuferzellen, welche das Proteoglykan *neural/glia-antigen 2* (NG2) exprimieren, ebenfalls eine Subpopulation von Astrozyten generieren [62, 63]. Da sich all diese Vorläuferzellen in verschiedenen Regionen des ZNS verteilen, ist die unterschiedliche Herkunft der Zellen ein Ansatz zur Erklärung der regionalen Unterschiede zwischen Astrozyten. Auch bei der Expression von typischen astrozytären Markern gibt es eine Vielzahl von Molekülen, die von Astrozyten je nach Lokalisation, aber auch in Ruhe und unter Stress unterschiedlich exprimiert werden. GFAP hat sich als Zytoskelettbestandteil von Astrozyten vor allem als immunhistochemischer Marker durchsetzen können [64]. Doch die Expression von GFAP schwankt stark je nach Region, aber vor allem auch je nach Reaktivität der Astrozyten. Eine Reihe weiterer Marker, wie etwa Vimentin, Protein S100 $\beta$ , Glutamat-Transporter (in Mäusen der Glutamat-Aspartat-Transporter (GLAST, EAAT2) und der Glutamat-Transporter 1 (GLT-1, EAAT1)), die Glutamat Synthetase (GS), einwärtsgerichtete Kaliumkanäle (Kir4.1), Aquaporin 4 (AQP4), Connexine Cx30 und Cx43, Aldehyd Dehydrogenase 1 family member L1 (ALDH1L1) oder der

Transkriptionsfaktor Sox9 werden ebenfalls zur Detektion von Astrozyten genutzt, wobei keiner von allen Subpopulationen exprimiert wird [61].

Im gesunden Gehirn sind ausgereifte Astrozyten an der Aufrechterhaltung der Homöostase des Gewebes beteiligt. Dabei stehen sie in regem Kontakt und Austausch mit multiplen Zellarten wie Oligodendrozyten, Neuronen, Mikroglia oder Endothelzellen [59]. Über Gap junctions stehen sie sowohl untereinander als auch mit anderen Glia-Zellen im direkten Austausch und bilden ein bis heute noch nicht verstandenes funktionelles Synzytium [64, 65]. Ebenso tragen sie über verschiedenste Kanäle, Pumpen und Rezeptoren erheblich zum elektrophysiologischen Gleichgewicht des ZNS bei [66–68] und unterstützen den Metabolismus des Gewebes [69]. Astrozyten sind maßgeblich an der synaptischen Transmission und neuronalen Plastizität beteiligt und sind dadurch elementar wichtig für das neuronale Netzwerk [70]. Sie können Moleküle wie Glutamat, Adenosintriphosphat (ATP) oder  $\gamma$ -Amino-Buttersäure ( *$\gamma$ -aminobutyric acid* (GABA)) aufnehmen wie auch freisetzen und beeinflussen so direkt die neuronale Erregbarkeit [64, 71, 72]. Ebenfalls beeinflussen sie über die Ausschüttung neurotropher Substanzen ganz grundsätzlich die Synaptogenese und die Ausreifung von Synapsen [73, 74].

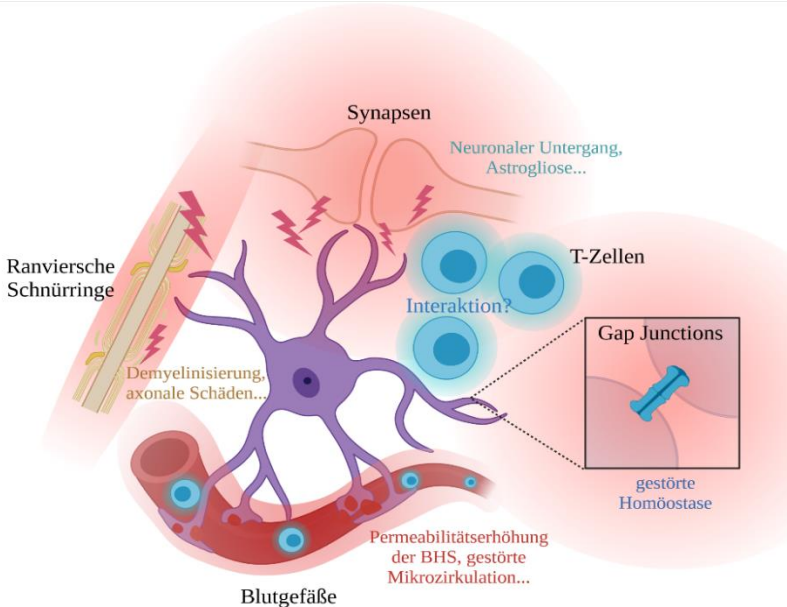
Auch auf den zerebralen Blutfluss können sie Einfluss nehmen. Über ihre Ausläufer sind sie mit den Endothelzellen von Arteriolen verbunden und bilden die Glia limitans als funktionelle Einheit mit der BHS [1, 75, 76]. Ebenfalls über ihre Ausläufer sind sie verbunden mit den Ranvierschen Schnürringen und versorgen das axonale Gewebe mit Energie, z.B. in Form von Glucose [64]. Beim Versuch Astrozyten in Gruppen einzuordnen, stößt man durch den mittlerweile doch erheblich gewachsenen Wissensumfang auf die nächsten Schwierigkeiten. Die geläufigste Einteilung ist deshalb immer noch eine nach optischen Eigenschaften: zum einen protoplasmatische, in der grauen Substanz vorkommende, eher verzweigte Astrozyten und zum anderen fibrilläre Astrozyten, die eher in der weißen Substanz vorkommen und lange, dünne und unverzweigte Fortsätze aufweisen [77]. Diese Einteilung wird den enorm vielseitigen Astrozyten allerdings nicht gerecht, weshalb ein genaueres Verständnis von Astrozyten dringend erforderlich ist.



**Abbildung 5:** Schematische Darstellung der Aufgaben von Astrozyten unter physiologischen Bedingungen (A) und unter Neuroinflammation (B).

**A)** Unter physiologischen Bedingungen erfüllen Astrozyten eine Vielzahl von Funktionen. Sie stehen in Kontakt mit Synapsen, den Axonen an den Ranvierschen Schnürringen, mit anderen Astrozyten oder weiteren Gliazellen über Gap Junctions und mit ihren Ausläufern mit den Endothelzellen der zerebralen Blutgefäße.

**B)** Unter pathologischen Bedingungen im Rahmen von Neuroinflammation verändern Astrozyten ihre Morphologie und verlieren einige ihrer Eigenschaften zur Aufrechterhaltung der Homöostase des Gewebes (loss of function). Zusätzlich verändert sich ihr Sekretionsverhalten, was zur Aufrechterhaltung des inflammatorischen Milieus beiträgt (gain of function). T-Zellen gelangen über die Blutgefäße ins ZNS. Die Interaktion zwischen T-Zellen und Astrozyten ist Gegenstand dieser Doktorarbeit. Abbildung angelehnt an Sofroniew et al. (2009), erstellt mit BioRender.



## 2.2.2 Astrozyten und Neuroinflammation

Sind Astrozyten doch schon im Gesunden nicht einer Schublade zuzuordnen, so wird es unter Neuroinflammation nicht einfacher mit der Klassifizierung und Beurteilung. Die für geraume Zeit geläufige Einteilung der Astrozyten in eher inflammatorische A1- und anti-inflammatorische, neuroprotektive A2-Typen ist zu eng binär gedacht [78, 79]. Dass Astrozyten an Erkrankungen des ZNS beteiligt sind und sich unter pathologischen Verhältnissen verändern, wurde bereits im 19. Jahrhundert erkannt [80]. Heute weiß man, dass Astrozyten an der Pathogenese verschiedenster Erkrankungen, wie zum Beispiel MS, Amyotropher Lateralsklerose (ALS), Epilepsie, aber auch Schizophrenie, Bipolarität oder Depressionen, deren Ursprung und Pathogenese immer noch nicht im Detail erklärbar sind, beteiligt sind [61]. So schwimmt auch durch den Fortschritt der Wissenschaft in der Erforschung von Astrozyten die Grenze zwischen der klassischen Neurologie und der Psychiatrie [81]. Ebenso wie unter physiologischen Bedingungen lassen sich reaktive Astrozyten in ihrer

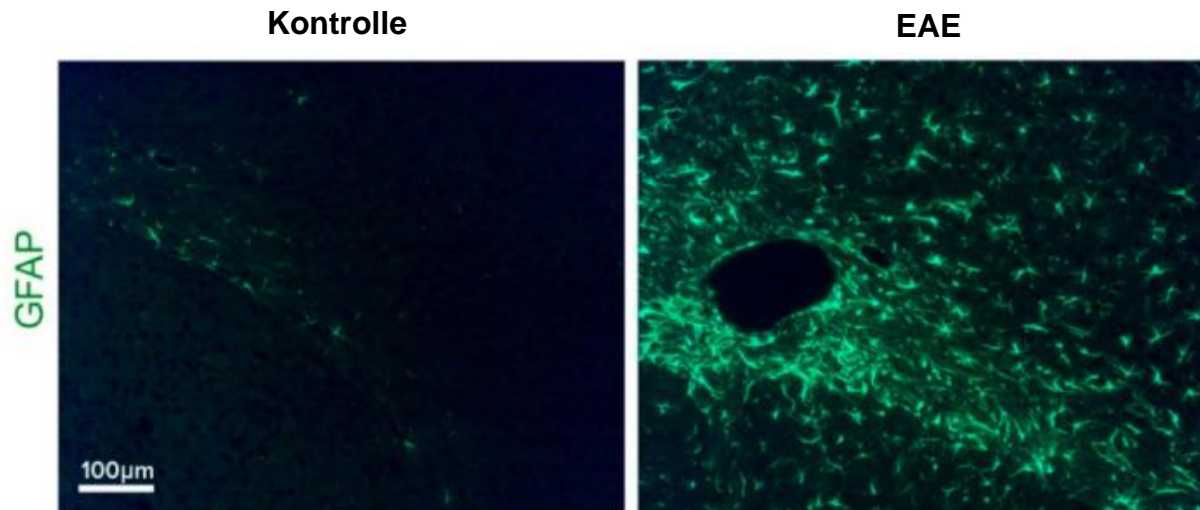


Genexpression und den exprimierten pathologischen Markern nicht in ein „*one fits all*“ Schema pressen [78]. Liddelow und Hasel ordnen sie in ein Dreieck zwischen „normal physiologisch“, „pathologisch trophisch“ und „pathologisch toxisch“ (und wahrscheinlich vielen weiteren Zwischenstufen) ein [82]. Schematisch dargestellt ist die Rolle von Astrozyten unter Neuroinflammation in **Abbildung 5B**.

Als frühes Zeichen ihrer Reaktivität schwellen Astrozyten in frischen MS Läsionen an und exprimieren vermehrt GFAP [56, 83]. Die vermehrte GFAP-Expression ist aber keinesfalls als homogene Reaktion zu werten, schwankt sie lokal doch sehr. Ebenfalls können Astrozyten als Reaktion auf pathologische Reize proliferieren, was allerdings durch die gleichzeitig auftretende vermehrte Expression von GFAP als übermäßig interpretiert werden kann [79]. Unter inflammatorischen Bedingungen verlieren oder verändern Astrozyten teilweise ihre unterstützenden Eigenschaften (*loss of functions*), wodurch die Homöostase des Gewebes gestört wird und Neurone, Synapsen und ausdifferenzierte Oligodendrozyten untergehen [58, 82]. Liddelow et al. konnten ebenfalls zeigen, dass die Inhibition der Ausdifferenzierung zu reaktiven [A1] Astrozyten nach akuten ZNS-Verletzungen in Mäusen den Zelltod von axotomierten Neuronen verhinderte, was für einen verheerenden Einfluss von reaktiven Astrozyten auf den neuronalen Untergang spricht [58]. In reaktiven Astrozyten werden eine Vielzahl an sekretorischen Molekülen hochreguliert (*gain of function*), die wiederum Einfluss auf das pathologische Geschehen um sie herum nehmen. Dies beinhaltet Zytokine wie TNF $\alpha$ , Interleukine oder koloniestimulierender Faktoren, aber auch Chemokine und neurotrophische Faktoren [56]. Ebenfalls vermehrt exprimiert werden Adhäsionsmoleküle oder die induzierbare Stickstoffmonoxidsynthase, welche reaktive Stickstoffspezies produzieren [84, 85]. Viele der so unter pathologischen, vor allem inflammatorischen Bedingungen hochregulierten Moleküle stellen eine Verbindung zum Immunsystem dar: über Antigenpräsentation zur Reaktivierung von T-Zellen, Rekrutierung weiterer Immunzellen ins ZNS sowie die Aktivierung zu proinflammatorischen Phänotypen über Chemokine und Zytokine [86].

Neben all den negativen Eigenschaften, die Astrozyten unter Inflammation entwickeln, darf man aber nicht verschweigen, dass sie auch durchaus weiter an der Aufrechterhaltung der Homöostase des Gewebes beteiligt sind. Sie entwickeln Eigenschaften, die dem A2-Typ zugeordnet wurden und räumen im Chaos der Zerstörung auf. Sie phagozytieren abgestorbene Synapsen, sekretieren neurotrophische Faktoren, beseitigen abgestorbenen Zellschrott und nicht zuletzt füllen sie entstandene Lücken mit der sogenannten Glianarbe [1, 87]. Die Glianarbe verhindert im Rahmen von EAE und anderen Traumata und Inflammationen ein weiteres Ausbreiten von Immunzellen in noch nicht entzündetes Gewebe [88]. Wird nach mechanischem Trauma das Ausbilden einer Glianarbe verhindert, vergrößert sich das pathologisch veränderte Gebiet (Immunzellinfiltration, BHS-Schäden, Neurodegeneration) um ein Vielfaches [89].

Doch welche Faktoren unter welchen Umständen Astrozyten zu dem einen oder dem anderen Subtypen werden lassen, wie diese Subtypen klassifiziert werden können und welchen Einfluss sie auf das pathologische Geschehen haben, ist Gegenstand aktueller Forschung [82]. Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde die Interaktion zwischen Astrozyten und unter MS vorkommenden Th1- und Th17-Zellen untersucht.



**Abbildung 6** Astrogliose im somatosensorischen Kortex einer EAE Maus (rechts) im Vergleich zur gesunden Kontrolle (links). Aharoni et al. 2021

### 2.2.3 Astrozytäre Zytokine

Auch wenn der genaue Pathomechanismus von MS bis heute noch nicht im Detail geklärt ist, ist die Beteiligung von Zytokinen am inflammatorischen Geschehen dennoch unbestritten [90]. Die Sekretion von Zytokinen kann Immunantworten sowohl herauf- als auch herabregulieren und kann sich im Laufe einer pathologischen Episode auch verändern [91]. Auch Astrozyten sekretieren Zytokine, die das inflammatorische Geschehen im Rahmen von MS modulieren können.

#### 2.2.3.1 Interleukin 6

IL-6 ist ein Zytokin mit pleiotropen Effekten und spielt eine Rolle in einer Vielzahl von Erkrankungen. So wird es zum Beispiel im Rahmen von neonataler Sepsis als früher Marker für eine bakterielle Infektion verwendet [92], die Blockade des IL-6-Rezeptors wird in der Behandlung von rheumatoiden Erkrankungen eingesetzt [93] und in Astrozytenkulturen aus pluripotenten Stammzellen bipolarer Menschen konnte eine erhöhte Expression von IL-6 als Antwort auf inflammatorische Reize gemessen werden ebenso wie erhöhte IL-6 Werte in Blutproben von Menschen mit Bipolarität [94]. In EAE korreliert die schwere der Symptomatik in der chronischen Phase der Erkrankung mit erhöhten Messwerten für IL-6 [95]. Unter physiologischen Bedingungen ist die IL-6-Konzentration im ZNS gering, steigt aber unter Inflammation stark an, wobei Astrozyten die Hauptquelle von zentralnervös sekretiertem IL-6 darstellen [96]. In aktiven und chronischen MS-Läsionen ist von Astrozyten sekretiertes IL-6

nachweisbar, was für eine aktive Rolle an der Aufrechterhaltung der Läsionen im chronischen Stadium der MS spricht [97]. Die Auswirkungen von IL-6 auf das ZNS sind vielseitig. Zum einen hat es trophische Auswirkungen auf Neurone, Oligodendrozyten und Astrozyten [98], zum anderen spielt es als endogenes Pyrogen eine zentrale Rolle in der Inflammationskaskade. So ist es in der EAE essenzieller Bestandteil der autoimmunen Reaktionen, indem es periphere Induktion autoreaktiver T-Zellen moduliert und deren Rekrutierung in das ZNS unterstützt [95]. Als Stimulation für die IL-6-Produktion in Astrozyten dienen unter anderem die Zytokine TNF $\alpha$  und IL-1 $\beta$ , aber auch weitere Neuromodulatoren wie Adenosin, Bradykinin oder Adrenalin [96, 99]. Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde die Reaktion von Astrozyten auf neuroinflammatorische Reize aus dem autoreaktiven Formenkreis in Form von Th1- und Th17-Zellen sowie deren Überstände und den jeweiligen Hauptzytokinen untersucht.

#### 2.2.3.2 Interleukin 10

IL-10 ist eines der am besten erforschten anti-inflammatorischen Zytokine bei peripheren Erkrankungen. Seine Rolle bei Erkrankungen des ZNS ist weiterhin Gegenstand intensiver Forschung. Im ZNS wird es produziert von Astrozyten und Mikroglia als Antwort auf eine Vielzahl von ZNS-Defekten wie bakterielle Infektionen, Trauma, aber auch als Reaktion auf weitere inflammatorische Reize im Rahmen steriler Inflammationsprozesse wie IL-6, TNF $\alpha$ , Adenosin oder Glutamat [100]. Über die Inhibition der Transkription proinflammatorischer Gene hat IL-10 vor allem Einfluss auf die Synthese proinflammatorischer Zytokine von Th1-Zellen, aber auch residenter ZNS Zellen wie Astrozyten, Oligodendrozyten oder Mikroglia [100, 101]. Im Rahmen von MS steht die IL-10-Konzentration im peripheren Blut im Zusammenhang mit verschiedenen Stadien der Erkrankung [102]. Nasal verabreichtes IL-10 kann zu einer herabgesetzten Schwere des Verlaufs von EAE in Mäusen führen, weshalb IL-10 als Zielstruktur für immunmodulatorische Ansätze für künftige Therapien neuroinflammatorischer Erkrankungen von Interesse ist [103]. Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde die Reaktion von Astrozyten auf neuroinflammatorische Reize aus dem autoreaktiven Formenkreis in Form von Th1- und Th17-Zellen sowie deren Überstände und den jeweiligen Hauptzytokinen untersucht.

#### 2.2.3.3 IL-23

IL-23 besteht aus zwei Untereinheiten. Die p40 Untereinheit hat es gemeinsam mit IL-12, die zweite Untereinheit p19 macht den Unterschied zu IL-12 aus [101]. Astrozyten sind unter inflammatorischer Stimulation in der Lage, beide Untereinheiten für IL-23 zu synthetisieren [104]. Durch IL-23 können Th17-Zellen, aber auch B-Zellen aktiviert werden, was zu weiterer Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine führt und zentraler Bestandteil der Pathogenese von MS ist [105, 106]. Sowohl im Serum als auch im Liquor von MS-erkrankten Personen konnten erhöhte Messwerte für IL-23 festgestellt werden, was die Rolle von IL-23 im inflammatorischen Geschehen von MS unterstreicht [107]. Zentralnervöse IL-23 Sekretion

führt zu erschweren und chronifizierten EAE-Verläufen bei Mäusen [105]. Knockout-Mäuse, die nicht in der Lage sind, IL-23 zu produzieren sind dagegen resistent gegenüber EAE [90]. Da Astrozyten unter physiologischen Bedingungen nicht in der Lage sind, IL-23 zu synthetisieren, wurde im Rahmen dieser Doktorarbeit genauer untersucht, welche inflammatorischen Stimuli aus dem autoimmunen Formenkreis zur vermehrten mRNA-Expression für IL-23 in Astrozyten führen.

#### 2.2.3.4 GMCSF

Auch wenn der Name etwas einseitig klingen mag, ist der Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierende-Faktor (*granulocyte-macrophage colony stimulating factor* (GMCSF)) ein wahres Multitalent in Sachen Neuroinflammation. Zu den Zellen, die GMCSF außerhalb des ZNS produzieren können, gehören Mastzellen, T-Zellen, Endothelzellen oder Epithelzellen. Die vielfältigen Auswirkungen reichen von Induktion der Ausreifung über Induktion von Zytokin- und Chemokinproduktion, Induktion reaktiver Sauerstoffspezies bis hin zu durch GMCSF generierte Proliferation und Migration in einer Reihe weiterer Zellen [90]. In Neuroinflammation wird GMCSF als zentraler Bestandteil der Interaktion zwischen T-Zellen und weiteren gewebiszertörenden myeloiden Zellen (Monozyten) gesehen [108]. Doch auch Astrozyten können im Rahmen von EAE sowohl GMCSF als auch den Rezeptor für GMCSF generieren [56]. IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$  konnten die GMCSF Produktion in Astrozyten anregen [109]. Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde untersucht, ob weitere inflammatorische Stimuli aus dem EAE-spezifischen Inflammationsfeld die mRNA-Produktion für GMCSF in Astrozyten hochregulieren können.

#### 2.2.4 Astrozytäre Aktivierungsmarker

Astrozyten reagieren auf pathologische Reize mit einer Vielzahl von Veränderungen [1]. Dabei unterlaufen sie morphologische, molekulare und funktionale Veränderungen, deren Auswirkungen auf Krankheitsverläufe wie bei MS noch nicht endgültig geklärt sind [79].

##### 2.2.4.1 GFAP

GFAP stellt zwar das Haupt-Intermediärfilament von ausgereiften Astrozyten dar, doch ist es weit mehr als nur eine Stütze des Zytoskeletts [14]. Reaktive Astrozyten verändern ihre Morphologie und die GFAP-Expression wird hochreguliert [64]. GFAP gehört zu den Typ III Intermediärfilamenten und ist beteiligt am Aufbau zellulärer Fortsätze, an der Migration und Proliferation von Astrozyten, an intrazellulärem Vesikeltransport, der Interaktion zwischen Neuronen und Astrozyten, der Integrität der BHS, der Myelinisierung sowie nach Verletzungen des ZNS am Aufbau eines Schutzwalls [14]. Im Liquor von MS-Erkrankten lassen sich erhöhte Werte für GFAP im Rahmen neuer Schübe messen [110]. Auch im Rahmen von EAE nimmt die GFAP-Expression von Astrozyten zu [56], was GFAP zu einem Marker von Neuroinflammation macht. Zusätzlich ist die GFAP-Expression aber weder im physiologischen

noch pathologischen Milieu bei allen Astrozyten im ZNS gleichmäßig verteilt, weshalb die Mehrexpression von GFAP allein nicht als Neuroinflammationsmarker ausreicht. Reaktive Astrozyten können auch trotz vermehrter GFAP-Expression Fähigkeiten wie die Ausbildung stabiler Ausläufer und Endfüße, welche Kontakt mit Gefäßen haben, verlieren. Dies kann zum Verlust der Funktionalität der BHS führen und zum massiven Einstrom von Immunzellen ins ZNS [56]. In welchem Rahmen neuroinflammatorische Reize Einfluss auf die mRNA-Expression von GFAP in Astrozytenkulturen haben, ist Gegenstand dieser Doktorarbeit. Ebenso wurde die GFAP-Expression von Astrozyten in hippocampalen Schnittkulturen als Antwort auf neuroinflammatorische Stimuli untersucht.

#### 2.2.4.2 H2D1

Damit T-Zellen aktiviert werden können, muss ihnen das Antigen, gegen welches sie reaktiv werden, über Haupthistokompatibilitätskomplexe präsentiert werden. Es gibt zwei Gruppen von Haupthistokompatibilitätskomplexen: MHC I, welches eher in akuten Läsionen von MS und vor allem zur Aktivierung von CD8<sup>+</sup>-T-Zellen auftritt, und MHC II, welches eher in chronischen Läsionen von MS und zur Aktivierung CD4<sup>+</sup>-T-Zellen auftritt [111]. Auch Astrozyten sind unter verschiedenen inflammatorischen Bedingungen in der Lage, als APC zu fungieren [58, 104]. H2D1 dient als Zielgen für MHC I und wird von reaktiven Astrozyten zum Beispiel nach der Stimulation mit Lipopolysaccharid (LPS) exprimiert [58]. Wird die Expression von MHC I auf Astrozyten verhindert, führt dies zu einer verminderten Expression proinflammatorischer Zytokine und neurotrophischer Faktoren bei Astrozyten, was eine Beteiligung von MHC I an der Reaktivität von Astrozyten und so der gesamten neuroinflammatorischen Kaskade nahelegt [112]. Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde die mRNA-Expression für H2D1 unter verschiedenen inflammatorischen Stimuli getestet.

#### 2.2.4.3 iNOS

Stickstoffmonoxid (NO) ist ein wichtiger biologischer Mediator in allen Organismen, welcher mithilfe von NADPH und molekularem Sauerstoff aus L-Arginin synthetisiert wird. Die Funktionen des Gases, das frei diffundieren kann, sind weitläufig und reichen von der Regulation des Blutdruckes über Neurotransmission bis hin zu wichtigen Abwehreffekten des Immunsystems [113, 114]. Als freies Radikal kann es aber auch in pathologischen, vor allem inflammatorischen Prozessen zytotoxisch wirken, was bei MS zu Demyelinisierung und axonalem Untergang führt [115]. Astrozyten sind über die induzierbare Stickstoffmonoxidsynthase (*inducible nitric oxide synthase* (iNOS)) in der Lage, NO zu produzieren und stellen im menschlichen ZNS die Hauptquelle für NO dar [85]. Im Rahmen neuroinflammatorischer Prozesse nimmt die Konzentration von reaktiven Stickstoffspezies (*reactive nitrogen species* (RNS)) im ZNS zu und in postmortem untersuchten Astrozyten von MS-Betroffenen konnte eine erhöhte Aktivität von iNOS sowie der mRNA-Expression für iNOS

gemessen werden [116]. Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde untersucht, welche neuroinflammatorischen Reize die mRNA-Expression für iNOS in Astrozyten beeinflussen.

## 2.3 Interaktion zwischen T-Zellen und Astrozyten

### 2.3.1 T-Zellen in MS

Die genaue Pathogenese von MS ist bis heute noch nicht im Detail geklärt. Im komplexen Zusammenspiel zwischen residenten Zellen des ZNS und Immunzellen stehen CD4<sup>+</sup> T-Zellen seit geraumer Zeit im Fokus wissenschaftlicher Untersuchungen als Treiber der Neuroinflammation [17, 25]. CD4<sup>+</sup> T-Zellen werden auch T-Helferzellen genannt (Th), weil sie B-Zellen bei der Produktion von Antikörpern „helfen“ und Zytokine zur Abwehr verschiedener Pathogene produzieren können [117]. Th-Zellen werden im Knochenmark produziert, reifen im Thymus aus und können in unterschiedliche Subtypen ausdifferenzieren, die je spezifische sekretorische Eigenschaften haben [118]. Zur Pathogenese von MS und auch EAE tragen Th1- und Th17-Zellen entscheidend bei [117, 119, 120]. Th1-Zellen sekretieren als Hauptzytokin Interferon  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ), aber auch IL-2 sowie TNF $\alpha$  und benötigen zur Differenzierung IL-12, während Th17-Zellen zur Differenzierung IL-23 benötigen und als Hauptzytokin IL-17 (IL-17 A und IL-17F), aber auch IL-22 produzieren [119]. Prajeeth et al. konnten zeigen, dass sowohl Th1- als auch Th17-Zellen sowie deren Kulturüberstände Einfluss auf Astrozyten und deren Sekretion von neurotrophischen Faktoren und inflammatorischen Zytokinen sowie Chemokinen haben [120]. Auch wenn weitere Th-Subtypen und andere Immunzellarten zur Pathogenese von MS und EAE beitragen, liegt der Fokus dieser Doktorarbeit auf der Interaktion zwischen Th1- sowie Th17-Zellen und Astrozyten.

### 2.3.2 Interaktion

Lange galt das ZNS aufgrund fehlender Lymphsysteme und der BHS als Barriere als komplett immunprivilegiert, was jedoch widerlegt werden konnte, da auch unter physiologischen Bedingungen eine geringe Anzahl an T-Zellen im Liquor messbar ist [118]. Unter pathologischen Bedingungen, wie bei MS oder EAE, steigt die Zahl an T-Zellen im ZNS jedoch stark [117]. Wie und warum unter pathologischen Bedingungen Immunzellen die BHS und damit auch das ZNS in erhöhter Zahl penetrieren können, ist Gegenstand weiterer Forschung. Einmal im ZNS angekommen, sind Astrozyten über ihre Ausläufer und Endfüße, die alle Gefäße des ZNS umgeben, mit die ersten residenten Zellen, auf die T-Zellen treffen können [118, 120]. Astrozyten reagieren in EAE sehr früh, also noch vor Einsetzen klinischer Symptome und der Infiltration des Gewebes mit T-Zellen auf die dann noch nicht zellulären pathologischen Reize [56, 121]. Dabei sind Astrozyten nicht bloße Rezipienten pathologischer Signale. Die immunmodulatorischen Eigenschaften von Astrozyten wurden lange

unterschätzt, doch sind Astrozyten durch die Sekretion verschiedenster Botenstoffe und der Expression unterschiedlicher Oberflächenmarker durchaus in der Lage, das inflammatorische Geschehen und damit auch T-Zellen zu beeinflussen [64, 122]. Auf einzelne Zytokine, die Astrozyten sekretieren und deren Auswirkungen auf das umliegende Gewebe sowie T-Zellen wurde bereits in den vorherigen Absätzen eingegangen. Astrozyten sind unter pathologischen Bedingungen in der Lage, Immunzellen zu rekrutieren, deren pathologische Eigenschaften zu initiieren und tragen somit zur positiven-Feedback Schleife der Neuroinflammation bei MS bei [56]. Doch das genaue Wechselspiel zwischen Astrozyten und T-Zellen in Neuroinflammation ist noch nicht vollends entschlüsselt. Ein weiterer Aspekt der Interaktion zwischen Astrozyten und T-Zellen ist die Möglichkeit des direkten Kontakts über Adhäsionsmoleküle.

### 2.3.3 Bedeutung von Zelladhäsion in MS und EAE

Zelladhäsionsmoleküle (*cell adhesion molecules* (CAM)) sind Oberflächenstrukturen, die Zell-Zell- sowie Zell-Extrazellulärmatrix-Kontakte ermöglichen und je nach Struktur in die Gruppe der Selektine, Immunglobulin-Superfamilie oder Integrine eingeteilt werden können [84]. Das interzelluläre Zelladhäsionsmolekül 1 (*intercellular cell adhesion molecule 1* (ICAM-1)) aus der Gruppe der Integrine und das vaskuläre Zelladhäsionsmolekül 1 (*vascular cell adhesion molecule 1* (VCAM-1)) aus der Immunglobulin-Superfamilie, welche auf verschiedenen residenten Zellen des ZNS exprimiert werden können, spielen bei MS eine wichtige Rolle bei der Interaktion zwischen Immunzellen und dem umliegenden Gewebe [123]. Über Adhäsionsmoleküle erfolgt Antigen-unabhängiger Kontakt zwischen T-Zellen und umliegenden Zellen. Als Gegenspieler zu ICAM-1 dient das Lymphozyten Funktions-assoziierte Antigen 1 (*lymphocyte function-associated antigen 1* (LFA-1, CD11a/CD18)) aus der Familie der Integrine und als Gegenspieler zu VCAM-1 dient das aus der Gruppe der Integrine stammende *Very late Antigen 4* (VLA-4, VD49d/CD29) [124]. Mithilfe von Adhäsionsmolekülen erfolgt unter anderem die Extravasion von Immunzellen und somit auch die Infiltration des zentralnervösen Gewebes in Erkrankungen wie MS oder dem Mausmodell EAE [125]. Auch Gliazellen wie Astrozyten sind in der Lage, Adhäsionsmoleküle zu exprimieren, wobei die Expression unter Einfluss pathologischer Stimuli stark schwankt [84]. Dabei lassen sich VCAM-1/VLA-4 vermehrt in älteren MS-Läsionen messen. ICAM-1/LFA-1 als Kommunikation zwischen Endothelzellen und Lymphozyten sind konstitutiv messbar, wobei die gesamte ICAM-1/LFA-1 Expression unter pathologischen Reizen auch auf anderen Zellarten akut stark ansteigt [126]. Im Blut und Liquor von MS-Erkrankten lassen sich erhöhte Werte für Adhäsionsmoleküle messen, was die Beteiligung am aktiven Inflammationsgeschehen unterstreicht [127]. Aus immunologischer Sicht sind Adhäsionsmoleküle in jedem Prozess von Zell-Interaktion beteiligt, von Selektion, Antigen-Priming und -Erkennung über Zellaktivierung und Lymphozyten-Zirkulation im Gewebe [128]. Was die möglichen Folgen der Interaktion zwischen Astrozyten und T-Zellen über

Adhäsionsmoleküle betrifft, formulierten Liddelov et al. verschiedene Möglichkeiten wie zum Beispiel die Steigerung der Immunantwort und damit einhergehend die Schaffung eines schädlichen Umfelds, welches zum Untergang von Neuronen und anderen Zellen des ZNS führt. Des Weiteren zeigten sie die Möglichkeit einer durch die Interaktion mit Astrozyten geschaffenen Abschwächung der Immunantwort entweder über die Umprogrammierung von T-Zellen oder das Abfangen der Zellen und damit einhergehend die Abbremsung der Infiltration [129]. Die genauen Mechanismen, die zur Expression von Adhäsionsmolekülen auf Astrozyten führen sowie deren Konsequenz für das pathologische Geschehen bei MS sind noch nicht endgültig geklärt [130]. Doch die insgesamt bekannte Multifunktionalität und breite Expression macht Adhäsionsmoleküle zu einem interessanten Ziel für zukünftige Therapieansätze.

#### 2.3.3.1 ICAM-1

Die Expression von ICAM-1 (CD 54) ist unter physiologischen Bedingungen vorwiegend auf Gefäßen des ZNS ausgeprägt und zentraler Bestandteil der Extravasation von Lymphozyten [84]. Unter der Stimulation mit pathologischen Reizen wie Endotoxin, IL-1 oder TNF $\alpha$  steigt die Expression von ICAM-1 auf Endothelzellen stark an und bleibt für einige Tage bestehen [128]. Aber auch Astrozyten sind in der Lage, ICAM-1 zu exprimieren und unter Aktivierung mit proinflammatorischen Stimuli wie TNF $\alpha$ , IL1 $\beta$ , IFN $\gamma$  oder LPS die Expression um ein Vielfaches zu steigern [84, 129]. Auch bei weiteren neuropsychiatrischen Erkrankungen wie Schizophrenie oder Bipolarität ist eine stärkere Expression von ICAM-1 auf residenten Zellen des ZNS wie Astrozyten messbar [131]. Der genaue Mechanismus, welcher hinter der Interaktion zwischen Astrozyten und den eingewanderten Lymphozyten über ICAM-1 und auf den Lymphozyten exprimiertem LFA-1 steht, ist noch nicht geklärt. Denn auch verschiedene experimentelle Verfahren zur Inhibition von ICAM-1 führten zu unterschiedlichen Ergebnissen im Verlauf und der Schwere von EAE, was teilweise durch die unterschiedlichen Splice-Varianten von ICAM-1 oder die nicht einheitliche Verwendung monoklonaler Antikörper erklärt werden konnte [132]. Es bestehen die Thesen, dass durch die Interaktion zwischen Astrozyten und T-Zellen über ICAM-1 einerseits T-Zellen auf ZNS-spezifische Antigene umprogrammiert werden können, was zu einem verheerenderen Inflammationsgeschehen führt. Oder aber über die Interaktion könnten andererseits T-Zellen so umprogrammiert werden, dass die Autoimmunität abgeschwächt wird, beziehungsweise Astrozyten und Mikroglia über die zeitgleiche Expression von MHC-Molekülen Antigene eliminieren und somit die Inflammation abschwächen können [129]. Ein tieferes Verständnis zur Expression von ICAM-1 auf Astrozyten ist somit essenziell, um die immunmodulatorische Rolle des Adhäsionsmoleküls besser zu verstehen. Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde deshalb einerseits die Veränderung der Expression auf mRNA-Ebene nach Stimulation mit Th1- und Th17-Zellen sowie deren Kulturüberständen und Hauptzytokinen gemessen. Dies geschah in



Astrozytenkulturen, um eine weitere Beeinflussung auf Astrozyten durch zum Beispiel Mikroglia zu verhindern. Zur Kontrolle erfolgte die Visualisierung der gemessenen gesteigerten mRNA-Expression mittels immunhistochemischer Färbung von hippocampalen Schnittkulturen. Die Validierung der in vitro gewonnenen Ergebnisse erfolgte mittels durch Th1- und Th17-Zellen induzierter Transfer-EAE.

### 2.3.3.2 VCAM-1

Außerhalb des ZNS ist VCAM-1 (CD106) auf Gefäßen, aber auch auf Zellen verschiedener Malignome exprimiert, was es zur Zielstruktur intensiver Forschung gemacht hat [133]. Im gesunden Gehirn ist VCAM-1 kaum detektierbar, doch steigt die Expression in MS-Läsionen drastisch an, was für eine Beteiligung des Adhäsionsmoleküls am inflammatorischen Geschehen spricht [91]. Über die Expression von VCAM-1 auf Endothelzellen und VLA-4 auf ihren Gegenspielern wird die Adhäsion und Extravasion von Lymphozyten, Monozyten, eosinophilen und basophilen Granulozyten ermöglicht [128]. Auch reaktive Astrozyten sind in der Lage, VCAM-1 auf ihrer Oberfläche zu exprimieren und darüber in Interaktion mit T-Zellen zu treten [130]. Mit dem monoklonalen Antikörper Natalizumab, welcher VLA-4 auf vor allem Immunzellen inhibiert und in der Behandlung von RRMS eingesetzt wird, kann die Zellmigration ins ZNS verhindert werden, was sich einerseits positiv auf den Krankheitsverlauf auswirkt, aber als Nebenwirkung eine ebenfalls demyelinisierende progressive multifokale Leukenzephalopathie hervorrufen kann [134]. Ein Erklärungsansatz dafür ist die Herunterregulierung der Expression von VCAM-1 auf Astrozyten als Reaktion der VLA-4 Blockade, was zu einer gesteigerten Gewebspenetration von bereits migrierten T-Zellen führt [129]. Wie bereits erwähnt, sind Astrozyten keine homogene Population, weshalb auch die Expression von VCAM-1 auf Astrozyten nicht als homogen zu betrachten ist. Williams et al. beschreiben eine Th17-abhängige Hochregulation der Expression von VCAM-1 auf Astrozyten des Hirnstamms und eine IFN $\gamma$ -abhängige Herunterregulierung von VCAM-1 auf Astrozyten im Hirnstamm [130]. Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden murine Astrozytenkulturen aus Cortices sowie murine Astrozyten der CA1-Region des Hippocampus und Aufarbeitungen des gesamten murinen Gehirns nach EAE untersucht. Dort zeigten sich eher Th1 vermittelte Effekte auf die Hochregulierung der Expression von VCAM-1 auf Astrozyten sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene. Ein tieferes Verständnis zur Regulation der VCAM-1-Expression auf Astrozyten ist demnach auch in Hinsicht auf mögliche unerwünschte Arzneimittelwirkungen essenziell.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Instrumente und Geräte

**Tabelle 1:** Instrumente und Geräte

Gerät	Firma
Analog Vortex Mixer	VWR International GmbH, Darmstadt (Deutschland)
Autoclavierer Heraeus	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
BD FACS Canto II	BD Bioscience, Franklin Lakes (USA)
CFX Connect™ Real Time Detection System	Bio-Rad Laboratories, München (Deutschland)
Keyence Fluoreszenzmikroskop	Keyence, Itasca (USA)
Eppendorf "Research Adjustable-volume" Pipetten	Eppendorf GmbH, Wesseling-Berzdorf (Deutschland)
Gamma Strahler GammaZell 2000	Mølsgaard Medical, Risø (Dänemark)
Greiner Pipetten	Greiner, Kremsmünster (Deutschland)
Kühl- und Gefrierschränke	Liebherr, Bulle (Schweiz)
Magnetische Säule "Magnetic Stand Ambion"	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
McILWAIN Gewebeschnaider	Campden Instruments LTD, Loughborough (England)
MidiMACS und QuadroMACS Separiersysteme	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach (Deutschland)
NanoDrop 2000c	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Operationsbesteck	Fine Science Tools Inc., Heidelberg (Deutschland)
pH-Meter	Mettler-Toledo GmbH, Gießen (Deutschland)
Pipetus	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co.KG, Eberstadt (Deutschland)
Schüttelplatte	Edmund Bühler GmbH, Hechingen (Deutschland)
Semi-sterile Werkbank Thermo Scientific™ Heraguard™ ECO	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)

Thermo Cycler	Peqlab GmbH, Erlangen (Deutschland)
Vibratom Microm HM 650V	Thermo Scientific, Waltham (USA)
Wasserbad Aqualine	AL18 Lauda GmbH & CO. KG, Lauda-Königshofen (Deutschland)
Werkbank "Horizontal Laminar Flow Hood" Heraguard	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Werkbank "Vertical Laminar Flow Hood SAFE 2020	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Zellkultur Inkubator	Binder GmbH, Tuttlingen (Deutschland)
Zellkultur Licht-Mikroskop	Hund, Wetzlar (Deutschland)
Zellzähler LUNA	Logos Biosystems, Berlin (Deutschland)
Zell-Zählkammer	Neubauer Brand, Wertheim (Deutschland)
Zentrifuge Heraeus Fresco 21	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Zentrifuge Multifuge Heraeus XIR	Thermo Fisher Scientific,

### 3.1.2 Laborutensilien und Verbrauchsgegenstände

**Tabelle 2:** Laborutensilien und Verbrauchsgegenstände

Produkt	Firma
Coverslips 24x60mm, 24x50mm	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham (USA)
Eppendorf Röhrchen 1.5 mL + 2 mL	Eppendorf GmbH, Wesseling-Berzdorf (Deutschland)
Filter Pipettenspitzen 10 µL, 100 µL 200 µL, 1000 µL	Starlab, Hamburg (Deutschland)
Frischhaltefolie	Carl Roth GmbH, Karlsruhe (Deutschland)
Handschuhe, Nitril, Größe S	Starlab, Hamburg (Deutschland)
Injektionskanülen 20G - 27G	BD Microlance, Gateshead (UK)
LUNA Zählkammern	Logos biosystems, Berlin (Deutschland)
MACS LS Säulen	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach (Deutschland)
Millicell Zellkultur Einsätze, 30 mm, 0,4 µm	Merck Millipore, Darmstadt (Deutschland)
Multiplate PCR Platten, 96 Wells, klar	Bio-Rad Laboratories GmbH, München (Deutschland)
MultiWell Platten, Polystyrene, 6-Well, 24-Well, 48-Well, 96-Well	BD Bioscience, Franklin Lakes (USA)

Nalgene Rapid-Flow Filter Unit, 500 ml	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham (USA)
Netzeinsatz für 12-Well Platte, Ø 15 mm, Netzgröße 74 µm	Sigma-Aldrich Corp., St Louis (USA)
Objektträger	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham (USA)
Pipettenspitzen 10 µL, 200 µL, 1000 µL	VWR International GmbH, Darmstadt (Deutschland)
Polystyren abgerundeter Boden Test Tubes 5 mL (FACS tubes)	BD Bioscience, Franklin Lakes (USA)
Rasierklingen	Wilkinson
Serologische Pipetten, Polystyren, 5 mL + 10 mL + 25 mL	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen (Deutschland)
Skalpelle	B. Braun AG, Melsungen (Deutschland)
Spritzen, 1 mL + 2 mL + 30 mL	B. Braun AG, Melsungen (Deutschland)
Zellkulturplatte, Polystyrene, Ø 60 mm	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen (Deutschland)
Zell-Schaber	Corning, Corning (USA)
Zell-Sieb, Nylon, Netzgröße 70 und 100 µm	BD Bioscience, Franklin Lakes (USA)
Zentrifugenröhrchen, Polypropylen (PP), 15 mL + 50 mL	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen (Deutschland)

### 3.1.3 Chemikalien und Reagenzien

**Tabelle 3:** Chemikalien und Reagenzien

Chemikalien /Reagenzien/Lösungen	Firma
4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazineethansulfonat HEPES	Life Technologies Corp., Grand Island (USA)
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Acridine Orange/Propidium Iodide LUNA Zellzähler	Logos Biosystems, Berlin (Deutschland)
Agarose	Carl Roth GmbH, Karlsruhe (Deutschland)
Ammoniumchlorid (NH <sub>4</sub> Cl)	Sigma-Aldrich Corp., St Louis (USA)
Aqua bi. dest. steril	B. Braun AG, Melsungen (Deutschland)
Basales Medium Eagle (BME)	Life Technologies Corp., Carlsbad (USA)

Bovines Serumalbumin (BSA)	Serva Electrophoresis, Heidelberg (Deutschland)
Brefeldin A	Sigma-Aldrich Corp., St Louis (USA)
D-Glukose	Carl Roth GmbH, Karlsruhe (Deutschland)
Dispase	R&D Systems, Inc., Minneapolis (USA)
DNase I	F. Hoffmann-La Roche AG, Basel (Schweiz)
dNTP Mix (je 10 mM)	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium ohne L-Glutamin. Ohne Pyruvat (DMEM)	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Dulbecco's phosphate buffered saline (PBS) mit und ohne Ca <sup>2+</sup> & Mg <sup>2+</sup>	Gentaur, Kampenhout (Belgium)
EDTA Disodium Salz Dehydrat (Na <sub>2</sub> EDTA) Lösung (0.5 M)	Sigma-Aldrich Corp., St Louis (USA)
Ethanol 100 % (v/v) (EtOH)	AppliChem GmbH, Darmstadt (Deutschland)
Ethanol 70 % (v/v) (EtOH)	AppliChem GmbH, Darmstadt (Deutschland)
Ethylenediamintetraacetat (EDTA)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe (Deutschland)
Fetales Bovines Serum, hitzedeaktiviert (FBS)	Biochrom AG, Berlin (Deutschland)
IMDM	Life Technologies Corp., Grand Island (USA)
iQ™ SYBR® Green Supermix	Bio-Rad Laboratories, München (Deutschland)
Kaliumhydrogencarbonat (KHCO <sub>3</sub> )	Sigma-Aldrich Corp., St Louis (USA)
Ketamin	Hameln Pharma Plus GmbH, Hameln (Deutschland)
Kollagenase	R&D Systems, Inc., Minneapolis (USA)
L-Glutamin (200 mM)	Sigma-Aldrich Corp., St Louis (USA)
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	Sigma-Aldrich Corp., St Louis (USA)
Minimum essential medium (MEM)	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
NaCl Lösung 0.9 %	B. Braun AG, Melsungen (Deutschland)
Paraformaldehyd (PFA)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe (Deutschland)
Penicillin / Streptomycin (P/S) (10,000 IU Penicillin und 10 mg Streptomycin pro mL)	Sigma-Aldrich Corp., St Louis (USA)
Percoll	Sigma-Aldrich Corp., St Louis (USA)
ProLong Gold „Antifade Mountant“	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
RNase Inhibitor	Clontech, Mountain View (USA)

Rompun 2% Injektionslösung (Xylazin)	Bayer Health Care, Leverkusen (Deutschland)
RPMI Gibco 1640 Medium	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Saponin	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe (Deutschland)
$\beta$ -Mercaptoethanol ( $\beta$ -ME)	Sigma-Aldrich Corp., St Louis (USA)
Triton X-100	Sigma-Aldrich Corp., St Louis (USA)
Typ F Immersion Öl	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar (Deutschland)
Ziegenserum „Normal goat serum“ (NGS)	Vector Laboratories, Burlingame (USA)

### 3.1.4 Puffer und Kulturmedien

**Table 4:** Puffer und Kulturmedien

<b>Puffer / Lösung</b>	<b>Inhalt</b>
Ammoniumchlorid	400 mL PBS (0,1 M) + 1,06 g NH <sub>4</sub> Cl
Anästhesie	77,5 mL NaCl-Lösung (0,9%) + 20 mL Ketamin (50 mg/mL) + 2,5 mL Rompun (2%)
Astrozytenmedium (DMEMC)	500 mL DMEM + 50 mL FBS + 5 mL P/S + 5 mL L-Glutamin
Blocking-Lösung	100 mL PBS (0,1 M) + 0,05 % NGS (5 mL) + 0,1 % BSA (10 mL) + 0,2 % Triton X (200 $\mu$ L)
FACS-Puffer	1 L PBS (0,1 M) + 5 g BSA
Glukose-Lösung (20 %)	100 mL dH <sub>2</sub> O + 20 g d-Glukose
Lyse-Puffer	1 L dH <sub>2</sub> O + 8,29 g NH <sub>4</sub> Cl (155 mM) + 1,00 g KHCO <sub>3</sub> (0,01 mM) + 0,0372 g Na <sub>2</sub> EDTA x H <sub>2</sub> O (0,1 mM)
MACS-Puffer	1 L PBS (0,1 M)

	+ 5 g BSA + 4 mL EDTA (0,5 M)
Maus Medium (MM)	500 mL RPMI + 1 % HEPES (5 mL) + 10 % FCS (50 mL) + 1 % L-Glutamin (5 mL) + 1 % P/S (5 mL) + 0,1 % $\beta$ -ME (0,5 mL)
MEM (2x)	5 L dH <sub>2</sub> O + 0,35 g NaHCO <sub>3</sub> + 160,93 g MEM
OHSC-Medium „Slice Culture Medium“ (SCM)	50 mL 2x MEM + 41,8 mL dH <sub>2</sub> O + 50 mL BME + 50 mL Pferdeserum, hitzedeaktiviert + 2 mL L-Glutamin (200 mM) + 6,25 mL Glukose-Lösung (20%) pH 7,2
OHSC-Präparations-Medium „Slice Preperation Medium“ (SPM)	200 mL 2x MEM + 98 mL dH <sub>2</sub> O + 1 mL L-Glutamin (200mM) pH 7,35
Saponin-Puffer	PBS (0,1 M) + 0,5 % BSA + 0,5 % Saponin
Wasch-Medium (WM)	500 mL RPMI + 1 % Hepes (5 mL) + 5 % FBS (25 mL) + 1 % P/S (5 mL)

### 3.1.5 Kits

**Tabelle 5:** Kits

Kit	Firma
CD4 T-Zell Isolationskit	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach (Deutschland)
DNase I rekombinant, RNase frei mit 10x	F. Hoffmann-La Roche AG, Basel (Schweiz)

Inkubationspuffer	
RNeasy® Micro Kit	Qiagen, Hilden (Deutschland)
Superscript III First Strand Synthese System	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)

### 3.1.6 Mikrobeads

**Tabelle 6:** Microbeads

Kit	Isotyp	Firma
CD62L MicroBeads	Ratte- $\alpha$ -Maus monoklonales IgG2a	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach (Deutschland)
CD90.2 MicroBeads	Ratte- $\alpha$ -Maus IgG2b	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach (Deutschland)

### 3.1.7 Zytokine

**Tabelle 7:** Zytokine

Zytokine	Firma
huTGF- $\beta$	R&D Systems, Inc., Minneapolis (USA)
IFN $\gamma$	Peprtech, Cranbury (USA)
IL-2	R&D Systems, Inc., Minneapolis (USA)
IL-6	R&D Systems, Minneapolis (USA)
IL-12	BioXcell, West Lebanon (USA)
IL-17	Peprtech, Cranbury (USA)
IL-18	MBL, Woburn (USA)
IL-23	R&D Systems, Inc., Minneapolis (USA)
$\alpha$ CD3	BD Biosciences, Franklin Lakes (USA)
$\alpha$ IFN $\gamma$	BioXcell West Lebanon (USA)
$\alpha$ IL-4	BioXCell, West Lebanon (USA)

### 3.1.8 Antikörper FACS

**Tabelle 8:** Antikörper FACS

FACS-Antikörper	Klon	Verdünnung	Firma
$\alpha$ CD16/ $\alpha$ CD32 (FC-Block)	2.4G2	1:200	BD Biosciences, Franklin Lakes (USA)



<b>I/d V450</b>		1:1000	BD Bioscience, Franklin Lakes (USA)
<b>GLAST APC</b>	ACSA-1	1:20	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach (Deutschland)
<b>CD 54 Biotin</b>	3E2	1:200	BD Biosciences, Franklin Lakes (USA)
<b>Streptavidin PerCP</b>	AB_2336918 (RRID)	1:600	BD Bioscience, Franklin Lakes (USA)
<b><math>\alpha</math>CD 106 PeCy7</b>	429	1:500	BioLegend, San Diego (USA)

### 3.1.9 Antikörper Immunhistochemie

**Tabelle 9:** Antikörper Immunhistochemie

Antikörper	Spezies	Verdünnung	Hersteller
$\alpha$ GFAP	Kaninchen	1:1000	Sigma
$\alpha$ ICAM-1	Ratte	1:100	Invitrogen
$\alpha$ Ratte 647	Ziege	1:1000	Invitrogen
$\alpha$ Kaninchen 568	Ziege	1:1000	Invitrogen
$\alpha$ VCAM-1	Ratte	1:100	ThermoFisher

### 3.1.10 Primer-Sequenzen qRT-PCR

**Tabelle 10:** Primer Sequenzen qRT-PCR

Gen	Sequenz des Vorwärtsprimers	Sequenz des Rückwärtsprimers	Konzentration [nM]	T <sub>m</sub> [°C]
CD4	ACCAGACTCACATTCTAACC	TTACCGCTCATCCACTTG	200	58
GFAP	TCAACTAACAGGATACTC	ATAACAACAAGGATGAAG	200	52
GLAST	AGTCTCGTCACAGGAATG	CCAATCACACAGCAATG	200	62
GLT-1	CCCTGAAGAACTAAGAT	CCGAAAGCAATAAAGAAT	400	56
GMCSF	GCTACTACCAGACATACT	ATATCAGTCAGAAAGGTTT	200	58
H2D1	GGTCCTGAGTTCAAATCC	GCAGAAGAGGGTGTTAGA	400	57
IBA-1	GGACAGACTGCCAGCCTAAG	GACGGCAGATCCTCATCATT	200	62
I-CAM	ACTGGACTATAATCATT	CCTTCTGTAAGTTGTATA	200	51
IL-10	CATGGGTCTTGGGAAGAGAA	AACTGGCCACAGTTTTTCAGG	200	63
IL-23	GACTACCAATACGAACTG	ACCATCATCTATACTGTTAC	400	57
IL-4	TCATCCTGCTCTTCTTTCTC	TCCTGTGACCTCGTTCAA	200	57

IL-6	CCGGAGAGGAGACTTCACAG	TCCACGATTTCCCAGAGAAC	200	65
iNOS	TGTCCTATCTCCATTCTACTAC	TGACCTTTTCGCATTAGCA	200	61
MCAM	AATGTTCTGTGTAAGAG	CATTGGCTTGAATAGTTG	200	56
Rps 29	CAAATACGGGCTGAACAT	GTCGCTTAGTCCAACCTAA	200	58
V-CAM	AGACTACACTGATGAAGAA	GAGGCAAACAAGAGATTT	400	58

### 3.1.11 Mäuse

**Tabelle 11:** Mäuse

Stamm	Eigenschaft	Herkunft/Referenz/Eigenzucht
B6.2d2	CD4+ T-Zellen sind MOG <sub>35-55</sub> spezifisch	(Bettelli et al., 2003)
B6.OT2	CD4+ T-Zellen sind OVA spezifisch	Eigenzucht
C57BL/6 (B6)	Wildtyp	Envigo
B6/Rag <sup>-/-</sup>	T-Zellen sind nicht funktionsfähig	Eigenzucht

### 3.1.12 Software

**Tabelle 12:** Software

Software	Einsatzbereich	Firma
<b>Beacon Designer 8 Software</b>	Primer Design	Premier Biosoft International, Palo Alto (USA)
<b>Bio-Rad CFX Manager</b>	Akquirieren der qRT-PCR Daten	Bio-Rad Laboratories, Munich (Deutschland)
<b>BioRender</b>	Grafikdesign	BioRender, Toronto (Kanada)
<b>BZ-X Viewer 1.32</b>	Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen	Keyence, Itasca (USA)
<b>FACSDiva</b>	FACS Analyse	BD Bioscience, Franklin Lakes (USA)
<b>FlowJo</b>	FACS Analyse	Tree Star, Ashland (USA)
<b>GraphPad Prism 6, 7, 8,9</b>	Statistische Analyse	GraphPad Software, Inc., La Jolla (USA)

<b>ImageJ</b>	Analyse histologischer Färbungen	National Institutes of Health, Bethesda (USA)
<b>Mendeley</b>	Zitations-Manager	Elsevier, Amsterdam (Niederlande)
<b>Microsoft Office 2016</b>	Verfassung der Texte und Erstellung der Tabellen	Microsoft Corp., Redmond (USA)
<b>NanoDrop 2000 Operating Software</b>	Bestimmung der RNA-Konzentration	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Präparation der Mäuse

Das eingesetzte Operationsbesteck wurde hitzesterilisiert und vor Einsatz mit 70 %igem Ethanol desinfiziert. Die Tiere wurden entweder durch Genickbruch oder eine letale Dosis Anästhetika (Ketamin, Rompun) abgetötet. Erst nach Erlöschen aller Schutzreflexe wurde mit der Organentnahme begonnen.

#### 3.2.1.1 Extraktion und Aufarbeitung des ZNS

Um bei der Aufarbeitung möglichst wenig Blutzell-Kontamination des ZNS zu erlangen, wurden die Mäuse vor Entnahme des ZNS mit PBS perfundiert. Dazu wurde der Thorax der Tiere eröffnet und zum besseren Zugang zum Herzen das Diaphragma entfernt. Zum Ablauf wurde das rechte Atrium eröffnet. Mittels 21 G Butterfly-Kanüle wurden 20-30 mL PBS in den linken Ventrikel gespritzt. Nach Beendigung der Perfusion wurde das Gehirn aus dem Schädel entfernt und in ein 15 mL Röhrchen mit 5 mL eiskaltem IMDM überführt.

Primär wurde das Gehirn manuell mittels Skalpell zerkleinert und im Anschluss mit 50 µL Kollagenase (5 mg/µL) 50 µL Kollagenase/Dispase (1000 U/µL) und 50 µL DNase (1 mg/mL) für 30 min bei 37 °C anverdaut. Im Anschluss wurde die Probe durch ein Netz (100 µm Porengröße) gerieben, das Netz mit 50 mL IMDM gespült und danach der aufgefangene Durchfluss zentrifugiert (550 g, 5 min, 4 °C). Zur Astrozytenisolation wurde das Zellpellet in 20%igem Percoll resuspendiert. Als zweite, untere Phase wurde 40 %iges Percoll in einem Falcon vorbereitet und die Astrozytenlösung wurde vorsichtig hinzugefügt. Das Zwei-Phasengemisch wurde kontinuierlich zentrifugiert (750 g, 30 min, RT, keine Beschleunigung, kein Abbremsen) und die Interphase zur weiteren Verarbeitung isoliert. Das Zellgemisch wurde einmal mit PBS gewaschen und anschließend zur Färbung für die Durchflusszytometrie weiterverwendet.

### 3.2.1.2 Extraktion der Milz

Nach Desinfektion des Abdomens mit 70%-igem Ethanol und Eröffnung der Abdominalhöhle wurde das Milzgewebe in toto in 15 mL Reagenzglas, gefüllt mit 5 mL eiskaltem Waschmedium (WM) überführt.

### 3.2.2 T-Zellkultur

Zur Gewinnung der Th1 und Th17 Zelllinien wurden naive T-Zellen gemeinsam mit antigenpräsentierenden Zellen (APC) kultiviert. Der Einsatz linienspezifischer Zytokine wird im Folgenden näher beschrieben.

#### 3.2.2.1 APC-Isolation

Die Isolierung der APC erfolgte aus Milzgewebe von 6 bis 12 Wochen alten C57BL/6 Mäusen. Zur Homogenisierung wurde das Gewebe durch ein Nygonsieb mit einer Porengröße von 100 µm gerieben und in einem 50 mL Reagenzglas aufgefangen. Anschließend erfolgte die zweimalige Waschung des Siebes mit je 10 mL WM. Nach Zentrifugation (550 g, 5 min, 4 °C) und Entfernung des Überstandes begann die Lyse der Erythrozyten durch die Resuspension des Zell-Pellets in 10 mL Lysepuffer. Zur Beendigung der Lyse wurden 5 mL WM hinzugefügt. Nach erneuter Zentrifugation (550 g, 5 min, 4 °C) wurde das Zell-Pellet in 50 mL MACS-Puffer aufgenommen. Es erfolgte eine Zellzählung zur genaueren Abschätzung der adäquaten Menge an Reagenzvolumen für die Durchführung einer auf magnetischen Partikeln (*beads*) beruhenden Separierung (MACS) der CD90.2 negativen Zellen. CD90.2 bindende *beads* markieren Lymphozyten, die nicht in der Lage sind, Antigene zu präsentieren. Alle weiteren Schritte der MACS wurden auf Eis durchgeführt. Für die MACS wurde nach erneuter Zentrifugation (550 g, 5 min, 4°C) das Zellpellet in 95 µL MACS-Puffer und 5 µL CD90.2 *beads* pro  $1 \times 10^7$  Zellen für 15 min bei 4 °C aufgenommen. Die Beendigung der Inkubation mit den *beads* wurde mittels Hinzugabe von 35 mL MACS-Puffer und anschließender Zentrifugation (550 g, 5 min, 4°C) herbeigeführt. Das Zell-Pellet wurde in 1 mL MACS-Puffer aufgenommen. Die MACS-Säulen wurden mitsamt 30 µL Prä-Separationsfilter im vorgekühlten (-20 °C) QuadroMACS Magneten angebracht und mit 3 mL MACS-Puffer gespült. Direkt im Anschluss wurde die Zellsuspension in die MACS-Säule gegeben, das Reagenzglas insgesamt zweimal mit je 3 mL MACS-Puffer gespült und das Volumen ebenfalls auf die MACS-Säule pipettiert. Als Letztes wurde die MACS-Säule mit 3 mL MACS-Puffer gespült. Das durchfließende Volumen von insgesamt 10 mL wurde in einem frischen 50 mL Reagenzglas aufgefangen. Mithilfe der MACS wurden alle CD90.2 positiven Zellen aussortiert, da diese in dem magnetischen Feld zwischen MACS-Säule und Magneten fixiert wurden. Da die gewonnenen APC lediglich zur Kultivierung der T-Zellen herbeigezogen wurden, wurde zur Verhinderung der Proliferation der APC eine Bestrahlung mittels Gamma-Strahler (3000 rad) durchgeführt. Nach der Bestrahlung erfolgte die Zentrifugation (550 g, 5 min, 4°C) und Aufnahme des Zell-

Pellets in 20-50 mL MM (je nach Pellet Größe) und die händische Zählung mittels Neubauer Kammer.

### 3.2.2.2 T-Zell-Isolation

Ziel war es, naive CD4<sup>+</sup>T-Zellen zu isolieren, um diese später zu Th1 und Th17 Zellen ausreifen zu lassen. Die Isolierung der naiven CD4<sup>+</sup>T-Zellen erfolgte aus Milzgewebe von 6 bis 9 Wochen alten B6.2D2 oder B6.OT2 Mäusen. Zur Homogenisierung wurde das Gewebe durch ein Nylonsieb mit einer Porengröße von 100 µm gerieben und in einem 50 mL Röhrchen aufgefangen. Anschließend erfolgte die zweimalige Waschung des Siebes mit je 10 mL WM. Nach Zentrifugation (550 g, 5 min, 4°C) und Entfernung des Überstandes begann die Lyse der Erythrozyten durch die Resuspension des Zell-Pellets in 10 mL Lysepuffer. Zur Beendigung der Lyse wurden 5 mL WM hinzugefügt. Nach erneuter Zentrifugation (550 g, 5 min, 4°C) wurde das Zell-Pellet in 50 mL MACS-Puffer aufgenommen. Es erfolgte eine Zellzählung zur genaueren Abschätzung der adäquaten Menge an Reagenzvolumen für die Durchführung des MACS-Isolationsverfahren der naiven CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>hi</sup> Zellen. Es wurden zuerst das Miltenyi CD4 Isolations-Kit entsprechend den Herstellerangaben verwendet und im Anschluss eine Positiven-Separierung der CD62L positiven Zellen. Dabei verblieben die mit *beads* markierten Zellen in der magnetischen Säule, der Durchfluss wurde verworfen und im Anschluss die Säule ohne magnetisches Feld gespült. Als Vorbereitung auf die magnetische Isolation wurden 40 µL MACS Puffer und 10 µL des CD4-Biotin-Antikörper-Reagenz pro 10<sup>7</sup> Zellen zusammen für 10 min bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden 30 µL MACS Puffer und 20 µL Anti-Biotin Mikrobeads dem Gemisch hinzugefügt und das Ganze für weitere 5 min inkubiert. Zur Reduktion einer Kontamination der Kultur mit CD8<sup>+</sup> Zellen, die nur durch eine Isolation der CD4<sup>+</sup> Zellen kaum zu erreichen ist, wurden zur letzten Inkubation ebenfalls gegen CD8 gerichtete Mikrobeads hinzugefügt. Die magnetisch aktivierte Zellisolation wurde gleich der APC-Isolation durchgeführt. Die Effektivität der Isolation wurde direkt im Anschluss durch eine Durchflusszytometrie erörtert. Eingesetzt wurde dafür als Oberflächenmarker αCD4-Horizon-Antikörper. Der Anteil an CD4<sup>+</sup> Zellen betrug meist ca. 90 % aller Lymphozyten. Parallel zur Effektivitätskontrolle der CD4<sup>+</sup> Isolation wurde die CD62L Positiven-Separierung durchgeführt. Hierfür wurden 960 µL MACS Puffer und 40 µL der CD62L Mikrobeads mit dem Zellpellet für 10 min bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Die Effektivität der Isolation wurde direkt im Anschluss durch eine Durchflusszytometrie erörtert. Eingesetzt wurden dafür als Oberflächenmarker αCD4-PeCy7- und αCD62L-APC-Antikörper. Zur weiteren experimentellen Nutzung wurden lediglich naive T-Zellen mit einer Reinheit von mehr als 96 % verwendet.

### 3.2.2.3 T-Zell-Kultur und Differenzierung

Um aus den naiven T-Zellen differenzierte Th1 und Th17 Zellen zu gewinnen, wurden die naiven Zellen mit antigenpräsentierenden Zellen ko-kultiviert und mit dem jeweils entsprechenden Zytokinprofil behandelt. Die Kultivierung erfolgte auf 24-Well-Platten in 2 mL MM mit einem APC zu T-Zell-Verhältnis von 5:1 (Th1) oder 10:1 (Th17). Zu den jeweiligen Kulturen wurden zusätzlich folgende Zytokine hinzugefügt (Endkonzentrationen):

Th1: 2 µg/mL α-CD3, 10µg/mL α-IL-4, 50 ng/mL IL-12 und 25 ng/mL IL-18.

Th17: 2µg/mL α-CD3, 10 µg/mL α-IFN $\gamma$ , 10 µg/mL α-IL-4, 3 ng/mL huTGF- $\beta$ , 20 ng/mL IL-6 und 20 ng/mL IL-23.

Um dem Wachstum der Zellen gerecht zu werden und die Kulturen ausreichend zu versorgen, wurden diese regelmäßig geteilt und mit den entsprechenden Zytokinen in MM versorgt:

Th1: an Tag 2 und Tag 4 je 100 U/mL IL-2 .

Th17: an Tag 3 je 50 U/mL IL-2 und 10 ng/mL IL-23 und Tag 5 je 25 U/mL IL-2 und 10 ng/mL IL-23.

Für die Ko-Kultivierung der Astrozytenkulturen und der OHSC wurden die Zellen an Tag 5 geerntet. Für die Induktion der EAE wurden die Th17 Zellen an Tag 7 restimuliert. Dafür wurde eine neue Co-Kultur der Th17 Zellen mit frisch isolierten antigenpräsentierenden Zellen im Verhältnis 1:5 angesetzt. Die beigefügten Zytokine in MM waren:

Th17: 2 µg/ml αCD3, 5 µg/mL α-IFN $\gamma$ , 5 µg/mL α-IL-4, 0.75 ng/ml TGF- $\beta$ , 20 ng/ml IL-23, and 10 ng/ml IL-6.

An Tag 10 konnten die Th17 Zellen zur Induktion der EAE geerntet werden.

Th1 Zellen wurden ausschließlich an Tag 5 verwendet.

### 3.2.2.4 Zytokincheck der T-Zell-Kulturen

Zur Überwachung der gewollten Differenzierung und dem entsprechenden Zytokinprofil erfolgte an Tag 5 und bei längerer Kultivierung auch an Tag 10 die Kontrolle des Profils mittels Durchflusszytometrie. Als Vorbereitung dafür wurde 24 h vor der Kontrolle eine 48-Well Platte mit pro Well je 3 µg/mL αCD3 $\epsilon$ - und 2,5 µg/mL αCD28- Antikörpern in je 120 µL PBS beschichtet. Zum Schutz vor Kontamination wurde die Platte in Frischhaltefolie gewickelt und anschließend mit 70%igem Ethanol gereinigt und bei 4 °C über Nacht gelagert. Die als Stimulation dienende Beschichtung wurde vor Hinzugabe der T-Zellen entfernt. Von den entsprechenden T-Zellkulturen wurden je 0,4 mL entnommen, resuspendiert und je 0,2 mL in ein beschichtetes und ein unbeschichtetes Well gegeben, wobei das unbeschichtete Well als Kontrolle diente. Damit eine weitere Zytokinsekretion gestoppt werden konnte, wurde Brefeldin A in einer Konzentration von je 5 µg/mL zu allen Zellsuspensionen hinzugefügt und das Ganze

für 4 h inkubiert. Nach Ende der Inkubationszeit wurden die Zellen geerntet und zur Analyse mittels Durchflusszytometrie vorbereitet. Zur Oberflächenfärbung wurde CD4 eingesetzt, zur intrazellulären Färbung IFN $\gamma$ , IL-17 und TNF $\alpha$ . Die Expressionsrate lag für Th1 Zellen im Durchschnitt bei etwa 30-40 % IFN $\gamma$  positiven Zellen, ohne signifikante IL-17 Expression und für TH17 Zellen bei etwa 30-40 % IL-17 positiven Zellen, ohne signifikante IFN $\gamma$  Expression.

### 3.2.3 Astrozyten-Kultur

Das Gewebe für die Astrozytenkulturen wurde aus B6 Mäusen (p0-p1) gewonnen und nach dem modifizierten Protokoll von Weinstein vorgegangen [7]. Das Operationsbesteck wurde zur sterilen Entnahme des Gewebes hitzeluftsterilisiert, vor Einsatz mit Ethanol desinfiziert und in PBS gelagert.

Die Mäuse wurden mittels Schere enthauptet und das Gehirn aus dem Schädel entfernt. Die nächsten Schritte erfolgten in gekühlten HBSS (5 mL, 4 °C). Hirnstamm, Mittelhirn, Kleinhirn, Hippocampus und Bulbi olfactorii wurden verworfen und es wurde lediglich mit den Cortices nach Entfernung der Meningen weitergearbeitet. Cortices von bis zu drei Mäusen wurden gemeinsam zu einer Kultur verarbeitet. Nach manueller Zerkleinerung der Cortices mit einem sterilen Skalpell erfolgte die zweimalige Waschung mit je 7,5 mL eiskaltem HBSS durch Resuspendieren und anschließender Zentrifugation (550 g, 5 min, 4 °C). Danach erfolgte die Anverdauung des Gewebes mit 1 % DNase und 0.05 % Trypsin in HBSS für 10 min bei 37 °C. Die Reaktion wurde gestoppt durch die Hinzugabe von 3 mL vorgewärmtem DMEMC (DMEM mit 1 % Pen/Strep, 10 % fetales bovines Serum, 2 mM L-Glutamine). Alle weiteren Schritte erfolgten mit vorgewärmten DMEMC als Medium. Mithilfe von sterilen Pasteur-Glaspipetten wurde das Gewebe durch Resuspendieren homogenisiert und anschließend durch ein 70  $\mu$ m Netz gespült. Das aufgefangene gewebefreie Volumen wurde mit 75 000 – 150 000 Zellen/Well in 6 Well-Platten ausplattiert. Zur Förderung der Adhärenz wurden die einzelnen Wells vor der Ausplattierung für 24 h mit PLL inkubiert. 24h nach der Ausplattierung und anschließend alle 48-72 h wurde die Kultur nach kräftigem Rütteln der Platte mit DMEMC gewaschen. An Tag acht nach Ausplattierung erfolgte für 24 h die Behandlung der Kultur. Zur Behandlung wurde genutzt:

**Tabelle 13:** *Behandlung Astrozytenkulturen*

Argenz	Konzentration	Gesamtvolumen
Th1.2d2 in MM	250.000 /mL	2 mL
Th1.2d2 Zellkulturüberstand		2 mL
Th1.OT2 in MM	250.000 /mL	2 mL
Th1.OT2 Zellkulturüberstand		2 mL
IFN $\gamma$ in MM	2 ng/mL	2 mL

Th17.2d2 in MM	250.000 /mL	2 mL
Th17.2d2 Zellkulturüberstand		2 mL
Th17.OT2 in MM	250.000 /mL	2 mL
Th17.OT2 Zellkulturüberstand		2 mL
IL-17 in MM	200 ng/mL	2 mL
MM mit pH 6,2		2 mL
MM mit pH 6,6		2 mL

Geerntet wurde in gekühltem PBS (4 °C) und direkt anschließend erfolgte die Weiterverarbeitung zur RNA-Analyse. Zum Ernten der Astrozyten aus den 6-Well-Platten wurde ein Zell-Kratzer benutzt.

### 3.2.3.1 RNA-Präparation

Zur RNA-Isolation wurde das RNeasy® Micro Kit (Qiagen) verwendet und entsprechend der Anleitung des Herstellers vorgegangen. Alle Schritte wurden bei Raumtemperatur (RT) durchgeführt. Zu Beginn erfolgte zur Lyse der Zellkörper die Resuspension in 350 µL RLT-Puffer durch eine 20 Gauge Nadel mit mindestens fünf Wiederholungen. Im nächsten Schritt wurden 350 µL frisch angesetzter 70 %iger RNase-freier Ethanol dem Lysat hinzugefügt. Die einzelnen Proben wurden in eine „RNeasy® Spin Column“ mit einem 2 mL Sammelröhrchen überführt und zentrifugiert (8000 g, 1 min, RT). Der Durchfluss wurde verworfen. Im nächsten Schritt wurden 700 µL RW1 Puffer auf die Säule gegeben und erneut zentrifugiert (8000 g, 1 min, RT), der Durchfluss wurde erneut verworfen. Als nächstes wurde zweimal hintereinander 500 µL RPE Puffer auf die Säule gegeben und im Anschluss zentrifugiert (8000 g, 1 min, RT), der Durchfluss ebenfalls verworfen. Ein neues 2 mL Sammelröhrchen wurde unter den Säulen platziert und alles erneut zentrifugiert (20.000 g, 1 min, RT), der Durchfluss verworfen. 87 µL RNase-freies Wasser wurde zum Lösen der RNA direkt auf die Membran der Säule gegeben und ein 1,5 mL Sammelröhrchen unter die Säule gesetzt. Nach der Zentrifugation (8000 g, 1min, RT) wurde der Durchfluss zur weiteren Verarbeitung genutzt. Pro Probe wurden 10 µL 10X RT Puffer, 1,0 µL RNase-Out und 2,0 µL DNase-I hinzugefügt und bei 37°C für 20 min unter kontinuierlicher Bewegung inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Verwendung des RNeasy® minElute Cleanup Kits (Qiagen) und es wurde entsprechend der Anleitung des Herstellers vorgegangen. 10 µL β-Mercaptoethanol wurden pro 1 mL RLT Puffer zusammengeführt. 350 µL des RLT Puffers wurden auf die Lösung gegeben und durch mehrfaches Resuspendieren mit einer Pipette durchmischt. 250 µL 100 %iger Ethanol wurden der Lösung hinzugefügt und ebenfalls gut durchmischt. Im Anschluss erfolgte die Überführung in die „RNeasy® mini Spin Column“ mit einem angefügten 2 mL Sammelröhrchen. Nach Zentrifugation (20.000 g, 1 min, RT) wurde der Durchfluss verworfen. 500 µL RPE Puffer



wurden auf die Säule gegeben und anschließend zentrifugiert (20.000 g, 1 min, RT). Der Durchfluss wurde verworfen. 500 µL 80 %iger Ethanol wurden auf die Säule gegeben, zentrifugiert (20.000 g, 2 min, RT) und der Durchfluss verworfen. Im Anschluss wurde mit geöffnetem Deckel der Säule erneut zentrifugiert (20.000 g, 5 min, RT), der Durchfluss verworfen. Als letztes wurde die RNA durch das Hinzufügen von 20 µL RNase-freiem MilliQ-Wassers aus der Säule gelöst und in einem neuen 1,5 mL Sammelröhrchen nach Zentrifugation (20.000 g, 1 min, RT) aufgefangen. Zur Messung der RNA-Konzentration wurde der Nanodrop 2000c eingesetzt und nach Herstellerangaben genutzt.

### 3.2.3.2 cDNA-Synthese

Um die RNA für die qRT-PCR zu nutzen, wurde diese in cDNA mit Hilfe des SuperScript® III First Strand Synthesis Systems (Invitrogen) umgeschrieben. Es wurde den Herstellerangaben entsprechend vorgegangen. Pro Probe wurde 1 µg RNA verwendet. Wenn nicht ausreichend RNA nach der Isolation vorhanden war, wurde die gesamte vorhandene Menge verwendet und mit RNase-freiem MilliQ-Wasser aufgefüllt. Zur Lösung wurden 5 µL unspezifischer Hexamer-Primer hinzugefügt und mit MilliQ-Wasser auf ein Gesamtvolumen von 23 µL aufgefüllt. Im Anschluss wurde zur Primer-Bindung für 5 min bei 65 °C inkubiert. Zur Beendigung der Inkubation wurden die Proben auf Eis gelegt. Pro Probe wurden 27 µL folgender Reaktionslösung hinzugefügt:

**Tabelle 14:** Master Mix cDNA-Synthese

Reagenz	Volumen [µL]
MgCl <sub>2</sub>	10
10x RT Puffer	5
0,1 M DTT	5
dNTP mix (je 10 mM)	5
RNaseOUT	1
Superscript III reverse transcriptase	1

Die weiteren Schritte der Inkubation wurden automatisiert im Thermo-Cycler durchgeführt. Folgendes Programm wurde verwendet:

**Tabelle 15:** Thermo-Cycler Zyklen

Zyklen	Temperatur [°C]	Zeit [min]
1	25	10
2	50	50
3	85	5
4	4	permanent

Bei einer RNA-Menge von 1 µg wurde die gewonnene cDNA in 150 µL Nuklease-freiem Wasser aufgenommen, bei geringerer RNA-Menge wurde das Volumen angepasst.

### 3.2.3.3 qRT-PCR

Die qRT-PCR ist ein technisches Verfahren zur simultanen Amplifikation und Quantifikation eines untersuchten Zielgens. Mittels interkalierender Fluoreszenzfarbstoffe kann doppelsträngige DNS markiert werden. Die doppelsträngige DNS wird mittels für die gesuchte Zielsequenz spezifische Primer generiert. Das Fluoreszenzsignal kann in Echtzeit durch einen modifizierten Thermocycler detektiert werden.

Zur qRT-PCR wurde der iQ SYBR® Green supermix (ThermoFisher) und das CFX Connect™ Real Time Detection System genutzt. 10 µl der Reaktionslösung des iQ SYBR® Green supermix wurden 200-400 nM Forward- und Reverse-Primer der entsprechenden Zielsequenz hinzugefügt. Die Primer wurden mit der Beacon Designer 8 Software entworfen und auf ihre Amplifikationseffektivität und -spezifität getestet. Die Reaktionslösung wurde mit Nuklease-freiem Wasser auf 16 µL aufgefüllt. Jeder Probe wurden je 4 µL einer isolierten RNA-Bedingung hinzugefügt und die gesamten Proben getrennt auf eine 96-Well Platte überführt. Zur genaueren Erzielung des quantitativen Messwertes wurden pro Einzelprobe Triplets vorgelegt. Die weitere Analyse erfolgte im CFX Connect™ Real Time Detection System mit folgenden thermischen Zyklen:

**Tabelle 16:** qRT-PCR Zyklen

Zyklen	Vorgang	Temperatur [°C]	Zeit
1	Initiale Denaturierung	95	3 min
2-41	Denaturierung	95	10 s
	Hybridisierung, („Annealing und Elongation)	Primer spezifische Schmelztemperatur	45 s
	Floureszenz- Quantifizierung		
42	Denaturierung	95	1 min
43	Abkühlung	55	1 min
44	Schmelzkurve	55-99	Δ 0,5 °C/ 10 s

Die Auswertung der Daten erfolgte mit der Bio-Rad CFX Manager Software. Lediglich Triplikate mit einer Standardabweichung von <0,5 wurden weiter ausgewertet. Wie Tabelle 16 zu entnehmen ist, wurde 40 Zyklen lang amplifiziert. Die Expression des jeweiligen Zielgens

wurde verglichen mit der Expression des Housekeeping-Gens RPS29. Zur Findung des Housekeeping-Gens wurden in den ersten Proben ebenfalls weitere potenzielle Housekeeping-Gene getestet, unter denen sich aber RPS29 als das am stabilsten exprimierte herausstellte (Daten nicht gezeigt). Das Gen RPS29 kodiert für das Protein29 der 40S Untereinheit von Ribosomen [135].

### 3.2.4 Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis

Alle Experimente mit Tieren wurden entsprechend des Deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt. Zur Minimierung weiterer Stressoren und gewährleisteten Akklimatisation wurden die Tiere mindestens eine Woche vor Start der EAE von der Tierversorgungsstelle in die Räumlichkeiten des Laboratoriums übersiedelt. Die Tiere wurden in pathogen-freiem Milieu in Gruppen (2-5 Tiere) in separat ventilierten Käfigen gehalten. Ein Tag-Nacht-Rhythmus von je 12 h wurde eingehalten.

Als Modell für die Untersuchung von Th1- und Th17-spezifischen Effekten wurde eine Transfer-EAE gewählt. Diesbezüglich wurden gentechnisch veränderten Mäusen ohne funktionsfähige T-Zellen (Rag 2<sup>-/-</sup>) [136] in vitro differenzierte und ZNF-spezifische (MOG<sub>35-55</sub>) T-Zellen transfundiert. Für die in vitro gewonnenen T-Zellen wurden B6.2d2.GFP/RFP [137] Mäuse verwendet.

Zur Induktion der Transfer-EAE wurden den Rag 2<sup>-/-</sup> Mäusen intravenös T-Zellen in die Schwanzvene transfundiert. Die dafür benötigten T-Zellen wurden dem Protokoll entsprechend differenziert und geerntet, anschließend gezählt und dreimal in PBS + (mit Calcium und Magnesium) gewaschen.

Zur Erfassung des Krankheitsverlaufs wurden die Tiere ab Tag 7 nach der Induktion täglich untersucht. Die Untersuchung umfasste Gewichtsverlust, Allgemeinzustand und die krankheitstypischen auftretenden Lähmungserscheinungen. Diese wurden eingeteilt in einen klassischen/typischen Verlauf und einen atypischen. Zur genaueren Dokumentation wurde ein Scoring-System angewandt.

#### *Typischer Verlauf*

**Tabelle 17:** *Typischer EAE-Verlauf*

Symptomwert	Klinische Symptome
0	Keine sichtbaren Symptome
0,5	Schwanz-Schwäche
1	Komplette Schwanz-Parese
1,5	Abgeschwächte Richtungs-Reflexe
2	Partielle Parese der hinteren Extremitäten

2,5	Unilaterale komplette Parese der hinteren Extremitäten
3	Komplette bilaterale Parese der hinteren Extremität
3,5	Komplette bilaterale Parese der hinteren Extremität und partielle Parese der vorderen Extremität
4	Komplette Parese aller Extremitäten
5	Tot

### Atypischer Verlauf

**Tabelle 18:** Atypischer EAE-Verlauf

Symptomwert	Klinische Symptome
0	Keine sichtbaren Symptome
1	Milde Ataxie
2	Ataxie
3	Schwere Ataxie
4	Moribund
5	Tot

Für das Experiment wurden Tiere im Alter zwischen 8-12 Wochen verwendet.

#### 3.2.4.1 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie mit fluoreszenzmarkierter Zellfärbung, im Englischen FACS (fluorescence-activated cell sorting), ist ein Zellzähl- und Analyseverfahren. Mithilfe fokussierter Laserstrahlen können somit sowohl Fluoreszenzen detektiert als auch durch die Messung der Streuung des Laserstrahls Größe und Morphologie einer Zelle bestimmt werden [138]. Dies erlaubt die Einteilung einer Zellpopulation nach Größe und Morphologie wie auch im Rahmen der fluoreszenzmarkierten antikörpervermittelten Zellfärbung nach Eigenschaften der exprimierten Oberflächenmoleküle oder intrazellulärer und intranukleärer Bestandteile.

#### 3.2.4.2 Zellfärbung für Durchflusszytometrie

Als Vorbereitung auf die Oberflächenfärbung zur Durchflusszytometrie wurden die Zellsuspensionen zentrifugiert (550 g, 5 min, 4 °C), die Überstände verworfen und zweimalig mit FACS-Puffer gewaschen. Zur Erhöhung der Bindespezifität wurden die Färbeschritte in PBS durchgeführt und, wenn nicht anders erwähnt, wurden 100 µL PBS mit dem entsprechend konzentrierten Antikörpern auf  $10 \times 10^6$  Zellen verwendet. Zur Färbung mit den

fluoreszenzmarkierten Antikörpern wurde das Zellpellet für 10 min bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Das Ende der Inkubation wurde mit 1 mL PBS, welches zur Färbelösung hinzugefügt wurde, herbeigeführt und die Probe anschließend erneut zentrifugiert (550 g, 5 min, 4°C).

Die so oberflächengefärbten Zellen konnten nach Hinzugabe von 1000 µL FACS-Puffer direkt zur Aufarbeitung mittels Durchflusszytometrie verwendet werden. Dafür erfolgte die Überführung in FACS-Röhrchen.

Im Falle einer Intrazellulärfärbung wurden die Zellen fixiert und permeabilisiert. Als Vorbereitung dafür wurden die Zellen erneut zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet mit PBS gewaschen.

Die Fixation der Zellen erfolgte für 20 min mit 2 %igem PFA bei 4 °C im Dunkeln. Der folgende und alle weiteren Zentrifugationsschritte werden bei 1000g für 5 min bei 4 °C durchgeführt. Nach der Fixierung erfolgte die Permeabilisierung mittels Saponin Puffer. Dafür wurde das Zellpellet zweimalig mit je 2 mL Saponin Puffer gewaschen und im Anschluss jeweils zentrifugiert. Zur Erhöhung der Bindungsspezifität wurde im nächsten Schritt zum Saponin Puffer ebenfalls eine Blockierungs-Lösung mit  $\alpha$ CD16/ $\alpha$ CD32 (FC-Blocking) mit einer Verdünnung von 1:100 und einem Gesamtvolumen von 70 µL auf die Zellen gegeben und das Ganze für 10 min bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Im Anschluss wurden der Zelllösung für die intrazelluläre Färbung die fluoreszenzmarkierten Antikörper, gelöst in 20 µL Saponin, in den jeweiligen Konzentrationen hinzugefügt und für 20 min bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Die Konzentration der Antikörper wurde in Bezug auf das Gesamtvolumen des Färbeschrittes (100 µL, bestehend aus 70 µL FC-Blocking, 20 µL Antikörperlösung und 10 µL Zellpellet) berechnet. Zum Beenden der Inkubation wurde je 1 mL Saponin Puffer der Zelllösung hinzugefügt und im Anschluss zentrifugiert. Es folgte die zweimalige Waschung mit FACS-Puffer. Zur Analyse mittels Durchflusszytometrie wurden die Zellen in je 200 -300 µL FACS-Puffer in FACS-Röhrchen überführt.

### 3.2.5 Organotypische hippocampale Schnittkultur

Das Gewebe für die organotypischen hippocampalen Schnittkulturen (OHSC) wurde aus B6 Mäusen (p5) gewonnen. Das Operationsbesteck wurde zur sterilen Entnahme des Gewebes hitzeluftsterilisiert, vor Einsatz mit Ethanol desinfiziert und in PBS gelagert.

Nach Enthauptung mittels Schere wurde die Schädeldecke eröffnet, das Gehirn mit einem Spatel entnommen und anschließend in eine 6 cm Petrischale mit 5 mL Slice Preparation Medium (SPM) überführt. Die weiteren Schritte erfolgten unter Vergrößerung im Hellfeldmikroskop. Zur Entnahme des hippocampalen Gewebes wurde das Gehirn an der Mittellinie zertrennt und das Stammhirn entfernt. Anschließend erfolgte die manuelle Ablösung der Meningen. Die Entnahme der hippocampalen Strukturen erfolgte manuell mittels Skalpell

mit 15er Klinge, das restliche Gewebe wurde verworfen. Im Anschluss wurde das hippocampale Gewebe auf den McILWAIN tissue chopper® überführt und in der Frontalebene in 300 µm dicke Stücke geschnitten. Nach visueller Kontrolle im Hellfeldmikroskop wurden intakte Schnitte auf Millicell® Zellkulturplatten-Einsätze in Slice Culture Medium (SCM) überführt und für zwei Tage auf den Einsätzen kultiviert. Darauffolgend erfolgte der Wechsel des Mediums nach 24h. Nach zwei Tagen wurden entweder je  $1 \times 10^5$  Th1- oder je  $1 \times 10^5$  Th17-Zellen in 10 µL MM oder 10µL MM als Kontrolle direkt auf die Schnitte gegeben und für 24 h kokultiviert.

### 3.2.5.1 Gewebepvorbereitung für immunhistochemische Färbung

Zur Herstellung dünnerer Gewebeschnitte wurden die Schnittkulturen mittels Microtome® HM 650 V (Vibratom) erneut in Frontalebene geschnitten (Re-Slicen). Als Vorbereitung dafür wurde das Gewebe in 4%igem Formaldehyd fixiert und im Anschluss in PB bei 4 °C weiterverarbeitet. Aus den Einsätzen wurde das Netz mit den aufliegenden Gewebestücken mittels Skalpell herausgeschnitten und mithilfe von HistoFix Gewebekleber auf einem frisch angefertigten 1 cm<sup>3</sup> Agaroseblock befestigt. Der Agaroseblock wurde auf die metallene Halterung des Vibratoms geklebt und in das Medium zum Schneiden komplett eingetaucht. Geschnitten wurde in 4°C kaltem Medium aus PB und MilliQ Wasser (1:1). Die Schnitteinstellungen am Vibratom waren wie folgt:

**Tabelle 19:** Vibratom Einstellungen

<b>Geschwindigkeit V</b>	<b>9-11 (Herstellerangabe)</b>
<b>Schnittdicke</b>	50 µm
<b>Frequenz</b>	57 (Herstellerangabe)
<b>Amplitude</b>	0,7 (Herstellerangabe)

Visuell einwandfreie Schnitte wurden für weitere Färbeschritte verwendet und auf 12 Well-Platten Netz-Einsätze (74 µm Porengröße) in 2 mL PB überführt. Die immunhistochemische Färbung erfolgte direkt im Anschluss.

### 3.2.5.2 Immunhistochemische Färbung

Zur Vorbereitung wurden alle Proben für 10 min mit NH<sub>4</sub>Cl bei Raumtemperatur inkubiert. Des Weiteren wurde zur Optimierung der Bindungsspezifität ein Blocking-Puffer, bestehend aus normalem Ziegen Serum (NGS) und in PB gelöstem Triton X-100 (0,2 %), für alle Färbeschritte verwendet. Alle Inkubationszeiten der Färbeschritte wurden abgedunkelt auf einer Schüttelplatte und, wenn nicht anders erwähnt, bei Raumtemperatur durchgeführt. An Tag 1 wurden initial die Schnitte für eine Stunde in 1,5 mL Blocking-Puffer inkubiert und im Anschluss dreimal für je 5 min mit PBST gewaschen. Über Nacht erfolgte bei 4 °C die Inkubation mit den

primären Maus-Antikörpern. Verwendet wurden für GFAP anti-Maus Antikörper aus der Spezies Kaninchen, für ICAM-1 und VCAM-1 anti-Maus Antikörper aus der Spezies Ratte. Am Tag 2 wurden die Schnitte erneut dreimal mit PBS gewaschen und im Anschluss mit den sekundären Anti-Kaninchen und Anti-Ratte Antikörper für drei Stunden inkubiert. Nach erneuter dreimaliger Waschung mit PBS erfolgte die Kernfärbung mittels DAPI für 10 min mit einer Konzentration von 500 ng/mL, gelöst in PB. Nach erneuter dreimaliger Waschung mittels PB für je 5 min wurden die einzelnen Schnitte manuell auf Objektträger überführt und mit ProLong Gold Antifade Mountant und einem Deckgläschen eingedeckt. Zur Bildaufnahme wurde das Fluoreszenzmikroskop BZ-X700 von Keyence verwendet, die Dateien wurden als TIFF exportiert und die weitere Verarbeitung und Analyse erfolgte mittels ImageJ.

### 3.2.5.3 Fluoreszenzmikroskop (Keyence BZ-X800)

Fluoreszenzmikroskope sind Lichtmikroskope, die fluoreszierende Partikel detektieren können. Die Detektion wird in einer Dunkelkammer durchgeführt. Die zu mikroskopierenden Objekte werden mit einer definierten Wellenlänge angeregt, was zur Absorption des Lichts durch den angestrahlten Bereich führt. Die vor der Mikroskopie mit fluoreszierenden Antikörpern gefärbten Zielstrukturen emittieren das Licht in einer längeren Wellenlänge, was zum Leuchten der Struktur führt. Zielstrukturen können so im Vergleich zu Hellfeldmikroskopie deutlicher und spezifischer dargestellt werden. Durch die Detektion definierter Wellenlängen können Details in unterschiedlicher Intensität dargestellt werden. Alle Aufnahmen innerhalb einer Experimentengruppe wurden unter denselben Bedingungen mikroskopiert. Zum Ausschluss von Autofluoreszenzen und unspezifischem Bindeverhalten der Sekundärantikörper wurden Negativkontrollen ohne primäre Antikörper, lediglich mit DAPI gefärbt, angefertigt. In den Negativkontrollen konnten unter den Einstellungen, unter denen in den Proben Signal für GFAP und ICAM-1/VCAM-1 nachweisbar war, keine Fluoreszenz detektiert werden (Negativkontrollen nicht abgebildet). DAPI wurde bei einer Wellenlänge von 405 nm (blau) gemessen, die sekundären Antikörper für ICAM-1 und VCAM-1 getrennt je bei einer Wellenlänge von 647 nm (in der **Abbildung 10** als rot dargestellt) und für GFAP bei einer Wellenlänge von 568 nm (in der **Abbildung 10** als grün dargestellt). Alle Bilder wurden als TIFF exportiert. Die weitere Bearbeitung der Bilder mittels ImageJ wurde innerhalb einer Experimentengruppe ebenfalls konstant gehalten. Zur besseren Darstellung wurde bei den Abbildungen der ICAM-1 Färbung das Maximum der Helligkeit für DAPI in die Range 0-98, für ICAM-1 0-205 gesetzt. Für die VCAM-1 Färbung erfolgte die Anpassung des Maximums der Helligkeit für DAPI in der Range 0-165 und GFAP 0-172. Die jeweiligen Abbildungen der ICAM-1 und VCAM-1 Färbung wurden nicht mittels ImageJ angepasst.

### 3.2.6 Statistische Analyse

Die statistische Analyse der Daten erfolgte mittels der GraphPad Prism Software, Version 8 – 9. Outlier wurden mithilfe des GraphPad Outlier Calculator identifiziert und ausgeschlossen, das Signifikanzlevel lag beidseits bei 0,05 ( $P < 0.05$ ). Die Testung des Unterschieds des Durchschnitts unter den Gruppen erfolgte für die aus dem FACS gewonnenen Daten mittels One-Way-Anova. Die RT-qPCR-Daten wurden mittels nicht-parametrischem Vergleich und dem jeweiligen Vergleich zur Kontroll-Gruppe mittels Kruskal-Wallis-Test statistisch getestet.



## 4 Ergebnisse

### 4.1 Astrozytäre Reaktionen auf inflammatorische Stimuli im mRNA-Expressionsmuster

#### 4.1.1 Heterogene astrozytäre mRNA-Expression für Zytokine als Reaktion auf Neuroinflammation

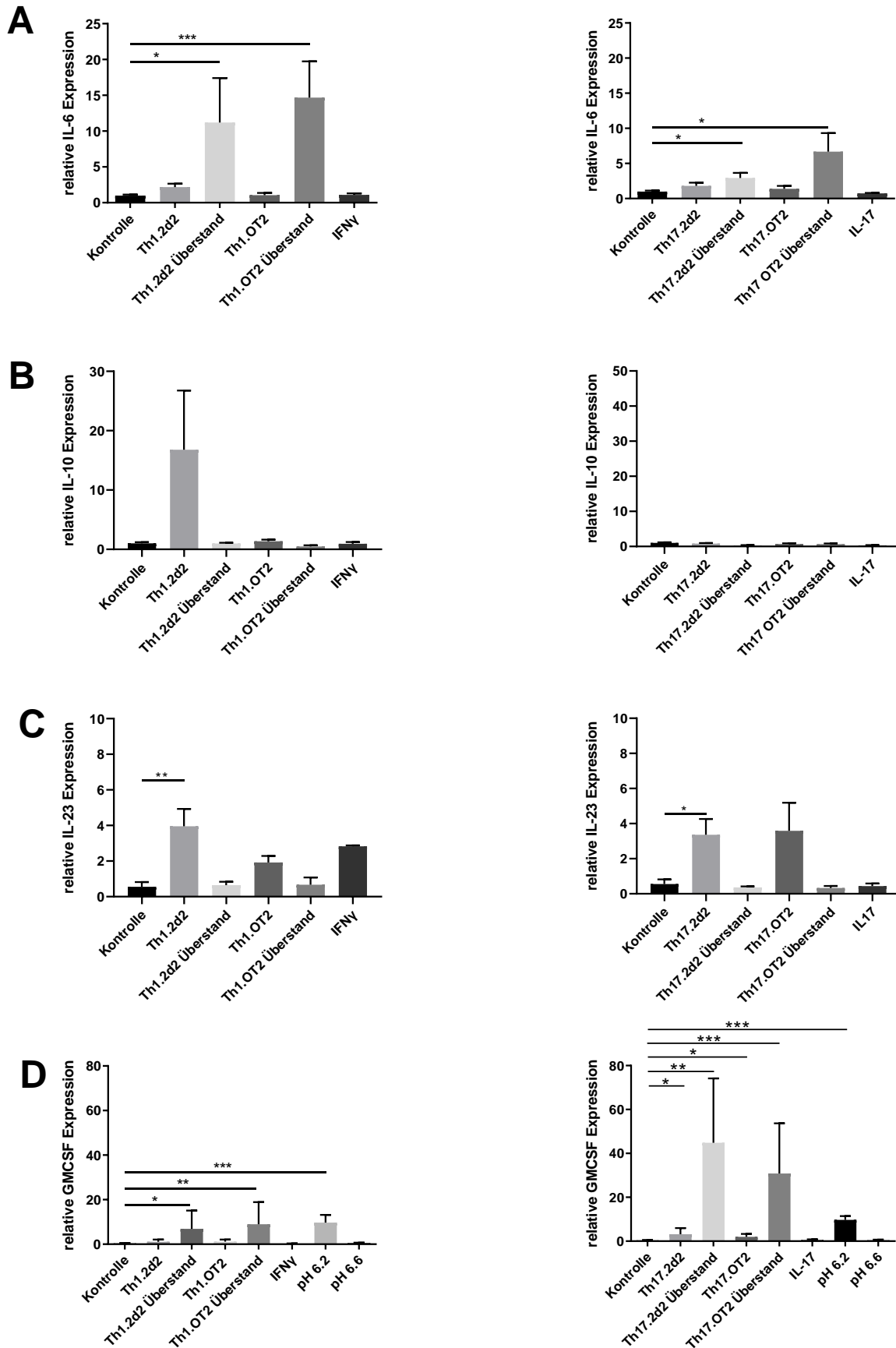
##### 4.1.1.1 Sekretorische Effekte auf die mRNA-Expression von IL-6

Im ZNS stellen Astrozyten eine der Hauptquellen für IL-6 Produktion dar [96]. IL-6 hat pleiotrope Effekte, die von neuroprotektiv bis pyrogen reichen [99]. Die relative Expression von IL-6 in Astrozyten stellte sich sowohl im Inflammationsprofil der Th1- als auch im Inflammationsprofil der Th17-Zellen durch die Inkubation mit den jeweiligen Zellkultur-Überständen als signifikant gesteigert dar (Th1.2d2 Überstand:  $p < 0,05$ , Th1.OT2 Überstand:  $p < 0.001$ , Th17.2d2 Überstand:  $p < 0,05$ , Th17.OT2 Überstand:  $p < 0,05$ ; **Abbildung 7A**). Der Effekt war weder durch die Hauptzytokine der jeweiligen Kulturen noch durch pH-Änderungen (nicht abgebildet) reproduzierbar, weshalb man von einem sekretorischen Effekt der T-Zellsubtypen ausgehen kann. So könnte  $\text{TNF}\alpha$  als Zytokin beider T-Lymphozyten für die gemessenen Effekte verantwortlich sein. Denkbar wären aber auch weitere sekretierte Stoffe der beiden Zellsubtypen, die nicht Teil des gewählten Inflammationspanels waren. Die genauere Analyse der Überstände auf gemeinsame sekretorische Eigenschaften sollte dahingehend Gegenstand weiterer Untersuchungen sein und ist im Rahmen dieser Doktorarbeit nicht erfolgt.

##### 4.1.1.2 Keine messbaren T-Zell-spezifischen Affekte auf die mRNA-Expression von IL-10

Auch für das anti-inflammatorische und neuroprotektive IL-10 stellen Astrozyten, neben Mikroglia, die Hauptquelle im ZNS dar [139]. In Bezug auf die relative Expression der mRNA für IL-10 konnte keine signifikante Steigerung in Bezug auf die ausgewählten Inflammationsstimuli ausgemacht werden (**Abbildung 7B**). Lediglich bei der Inkubation mit Th1.2d2-Zellen konnte eine nicht signifikante ( $p=0,1111$ ) Erhöhung der Expression ausgemacht werden. Ein antigen- und zelltypspezifischer Effekt der ZNS-spezifischen Th1-Zellen zur Unterbrechung innerhalb der inflammatorischen Kaskade wäre denkbar, ist aber durch die fehlende Signifikanz nicht belegbar. Unter Berücksichtigung des hohen Standardfehlers der Messung wäre es ebenso denkbar, dass unter den gesetzten proinflammatorischen Stimuli keine Hochregulierung der mRNA für IL-10 erfolgt. Astrozyten sind potenziell nicht über IL-10 Sekretion an der antiinflammatorischen Reaktion auf Th-Zell vermittelte Neuroinflammation nach einem akuten Stimulus beteiligt. Weitere Untersuchungen zur Regulation der Mechanismen zur mRNA Regulation von IL-10 sind im Rahmen dieser

Doktorarbeit nicht erfolgt.



**Abbildung 7:** Zytokin-Expression von kortikalen Astrozytenkulturen auf mRNA Ebene unter inflammatorischen Bedingungen. Als Referenzen zur Normalisierung der Marker wurde die Expression des Haushaltsgens Ribosomal Protein Small 29 (RPS29) zugrunde gelegt. Als nicht-inflammatorische und Lösungsmittel-Kontrolle wurde MM verwendet. Die Inflammationsprofile wurden in Th1- (links) und Th17- (rechts) vermittelte Effekte eingeteilt. Die Bedingungen im Th1-vermittelten Inflammationsprofil waren: Th1.2d2-Zellen, Th1.2d2-Zellkulturüberstand, Th1.OT2-Zellen, Th1-OT2-Zellkulturüberstand, IFN $\gamma$ . Die Bedingungen im Th17-vermittelten Inflammationsprofil waren: Th17.2d2-Zellen, Th17.2d2-Zellkulturüberstand, Th17.OT2-Zellen, Th17.OT2-Zellkulturüberstand, IL-17. Wenn nicht anders angegeben, zeigten sich keine signifikanten Änderungen der mRNA-Expression unter pH-Variationen. Die Darstellung der Daten erfolgte immer als Mittelwert  $\pm$ SEM. **A links)** Relative IL-6 Expression im Th1-vermittelten Inflammationsprofil. \*  $p < 0,05$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ,  $n=4-9$  in den Bedingungen,  $n=28$  in der Kontrolle **A rechts)** Relative IL-6 Expression im Th17-vermittelten Inflammationsprofil. \*  $p < 0,05$ ;  $n=4-10$  in den Bedingungen,  $n=28$  in der Kontrolle **B links)** Relative IL-10 Expression im Th1-vermittelten Inflammationsprofil.  $n=3-9$  in den Bedingungen,  $n=21$  in der Kontrolle **B rechts)** Relative IL-10 Expression im Th17-vermittelten Inflammationsprofil.  $n=6-10$  in den Bedingungen,  $n=21$  in der Kontrolle **C links)** Relative IL-23 Expression im Th1-vermittelten Inflammationsprofil.  $n=3-6$  in den Bedingungen,  $n=7$  in der Kontrolle. \*\*  $p < 0,01$  **C rechts)** Relative IL-23 Expression im Th17-vermittelten Inflammationsprofil.  $n=4-6$  in den Bedingungen,  $n=7$  in der Kontrolle. \*  $p < 0,05$  **D links)** Relative GMCSF Expression im Th1-vermittelten Inflammationsprofil. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$ .  $n=3-6$  in den Bedingungen,  $n=18$  in der Kontrolle **D rechts)** Relative GMCSF Expression im Th17-vermittelten Inflammationsprofil. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$ .  $n=3-6$  in den Bedingungen,  $n=18$  in der Kontrolle.

#### 4.1.1.3 Vermehrte mRNA-Expression von IL-23 nach Inkubation mit MOG-spezifischen T-Zellen

Klassischerweise wird IL-23 von antigenpräsentierenden Zellen produziert und kann unter neuroinflammatorischen Bedingungen von Astrozyten produziert werden, was bei EAE zu aggravierten Verläufen führt [105]. Bei der relativen Expression von IL-23 war ein stark signifikanter Anstieg der mRNA nach Inkubation der Astrozyten mit Th1.2d2-Zellen zu vermerken ( $p < 0,01$ ). Ebenfalls zeigte sich eine Tendenz zur gesteigerten Expression nach Inkubation mit den Th1.OT2-Zellen und IFN $\gamma$ . Auf Seite des Inflammationsprofils der Th17-Zellen zeigte sich ein signifikanter Anstieg der mRNA-Expression für IL-23 nach der Inkubation mit Th17.2d2-Zellen ( $p < 0,01$ ). Ebenso zeigte sich eine Tendenz zur gesteigerten Expression nach der Inkubation mit Th17.OT2-Zellen (**Abbildung 7C**). Denkbar wäre ein über zelluläre Kontakte vermittelter Effekt auf die mRNA-Expression von IL-23 unabhängig vom Subtypen. Die Tendenz zur gesteigerten Expression unter Einfluss von IFN $\gamma$  legt aber auch die Annahme nahe, dass die Hochregulierung als Antwort auf die Stimulation mit IFN $\gamma$  erfolgt. Wie weiter unten erläutert, sind auch Th17-Zellen befähigt, IFN $\gamma$  zu produzieren (Kapitel 4.1.2.1).

#### 4.1.1.4 Vermutlich pH-Wert gesteuerte Mehrexpression von mRNA für GMCSF

Das Zytokin GMCSF zeigte mehrere signifikante Steigerungen der Expression von mRNA als Antwort auf verschiedene inflammatorische Stimuli (**Abbildung 7D**). Im Inflammationsprofil der Th1-Zellen zeigte sich eine gesteigerte Expression als Antwort auf die Inkubation mit den beiden Kulturüberständen der ZNS-spezifischen und der nicht ZNS-spezifischen Zellen (Th1.2d2 Überstand:  $p < 0,05$ , Th1.OT2 Überstand:  $p < 0,01$ ), nicht jedoch auf das Hauptzytokin IFN $\gamma$ . Ebenso zeigten die Kulturüberständen (Th17.2d2 Überstand:  $p < 0,01$ , Th17.OT2 Überstand:  $p \leq 0,001$ ) und nicht das Hauptzytokin IL-17 im Th17-Profil signifikante Einflüsse auf die mRNA-Expression, dort auch beide T-Zellsubtypen (Th17.2d2:  $p < 0,05$ , Th17.OT2:  $p < 0,05$ ). Zusätzlich ließ sich eine stark signifikante Steigerung der Expression der mRNA für GMCSF als Antwort auf die pH-Veränderung (pH 6,2:  $p < 0,001$ ) ausmachen. Die

Effekte lassen sich also nicht zweifelsfrei auf sekretorische Effekte der T-Zellen im Allgemeinen zurückführen, sondern können auch als Antwort auf die pH-Änderungen in den Kulturmedien der T-Zellen gelesen werden und geben Hinweis auf potenziell multiple, gleichzeitig zu beobachtende Effekte.

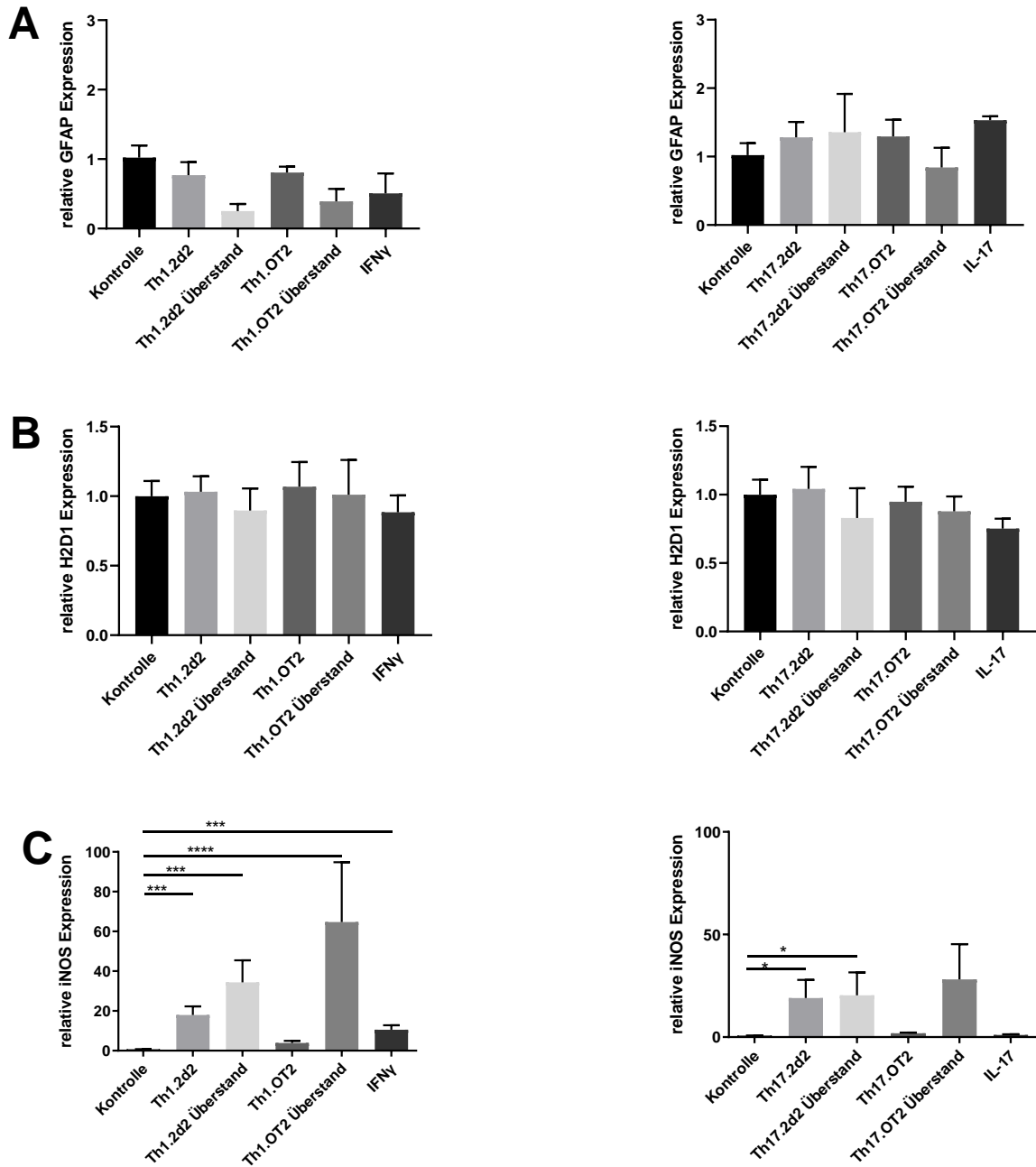
#### 4.1.2 Die Regulation von astrozytären Aktivierungsmarkern auf mRNA-Ebene

##### 4.1.2.1 IFN $\gamma$ vermittelte Hochregulierung der mRNA-Expression von iNOS

Auch für die induzierbare Stickstoff-Monoxid-Synthetase (iNOS) stellen Astrozyten die Hauptquelle im ZNS dar [85]. Durch iNOS produzierte Stickstoffspezies haben pleiotrope Effekte auf das umliegende Gewebe [113]. Als Stimulus für die Hochregulation der Expression von mRNA für iNOS lässt sich am ehesten der Einfluss von IFN $\gamma$  sowie ein antigenspezifischer Einfluss ausmachen (**Abbildung 8C**). So zeigten sich im Inflammationsprofil der Th1-Zellen bei den ZNS-spezifischen Th1-Zellen (Th1.2d2:  $p < 0,001$ ), aber auch bei den Überständen beider T-Zellsubtypen (Th1.2d2 Überstand:  $p < 0,001$ , Th1.OT2 Überstand:  $p < 0,0001$ ) und bei IFN $\gamma$  allein (IFN $\gamma$ :  $p < 0,001$ ) stark signifikante Steigerungen in der Expression. Ebenso stieg die Expression von mRNA für iNOS unter der Inkubation mit ZNS-spezifischen Th17-Zellen (Th17.2d2:  $p < 0,05$ ) sowie deren Überstand (Th17.2d2 Überstand:  $p < 0,5$ ). Das Hauptzytokin der Th17-Zellen, IL-17, zeigte keine Effekte auf die Expression der mRNA für iNOS. Im Rahmen von Colitis Ulcerosa ist im Mausmodell bereits bekannt, dass auch Th17-Zellen IFN $\gamma$  produzieren können [140]. Ebenso konnten Loos et al. zeigen, dass im Rahmen von neuroinflammatorischen Vorgängen Th17-Zellen Eigenschaften von Th1-Zellen adaptieren und zu sogenannten ex-Th17-Zellen werden, welche zur IFN $\gamma$ -Produktion befähigt sind [13]. Somit lässt sich von einem direkten Einfluss von IFN $\gamma$  auf die Regulation der mRNA-Synthese für iNOS ausgehen.

##### 4.1.2.2 mRNA-Expression von MHC I unbeeinflusst von T-Zell vermittelten Stimuli

Über Haupthistokompatibilitätskomplexe (*major histocompatibility complex* (MHC)) können Astrozyten mit T-Zellen in Verbindung treten. Dies scheinen sie jedoch vor allem unter pathologischen Bedingungen zu tun und können über MHC I sogar als antigenpräsentierende Zellen fungieren [141]. Die Regulation der Expression von H2D1 als Zielgen für die Expression von MHC I [58] zeigte in unserer Versuchsreihe keinerlei signifikanten Veränderungen der mRNA-Expression als Antwort auf die gewählten Inflammationsreize (**Abbildung 8B**). Es ist somit davon auszugehen, dass die Regulation der Expression von MHC I auf Astrozyten nicht auf mRNA-Ebene oder durch andere inflammatorische Stimuli reguliert wird.



**Abbildung 8:** Expression weiterer Aktivierungsmarker von kortikalen Astrozytenkulturen auf mRNA Ebene unter inflammatorischen Bedingungen. Als Referenzen zur Normalisierung der Marker wurde die Expression des Haushaltsgens Ribosomal Protein Small 29 (RPS29) zugrunde gelegt. Als nicht-inflammatorische und Lösungsmittel-Kontrolle wurde MM verwendet. Die Inflamationsprofile wurden in Th1- (links) und Th17- (rechts) vermittelte Effekte eingeteilt. Die Bedingungen im Th1-vermittelten Inflamationsprofil waren: Th1.2d2-Zellen, Th1.2d2-Zellkulturüberstand, Th1.OT2-Zellen, Th1.OT2-Zellkulturüberstand, IFN $\gamma$ . Die Bedingungen im Th17-vermittelten Inflamationsprofil waren: Th17.2d2-Zellen, Th17.2d2-Zellkulturüberstand, Th17.OT2-Zellen, Th17.OT2-Zellkulturüberstand, IL-17. Wenn nicht anders angegeben, zeigten sich keine signifikanten Änderungen der mRNA-Expression unter pH-Variationen. Die Darstellung der Daten erfolgte immer als Mittelwert  $\pm$ SEM. **A links)** Relative iNOS Expression im Th1-vermittelten Inflamationsprofil. \*\*\* $p < 0,001$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$ . In den Bedingungen  $n=5-7$ , in der Kontrolle  $n=18$  **A rechts)** Relative iNOS Expression im Th17-vermittelten Inflamationsprofil. \* $p < 0,05$ . In den Bedingungen  $n=5-7$ , in der Kontrolle  $n=18$  **B links)** Relative H2D1 Expression im Th1-vermittelten Inflamationsprofil. In den Bedingungen  $n=5-11$ , in der Kontrolle  $n=24$  **B rechts)** Relative H2D1 Expression im Th17-vermittelten Inflamationsprofil. In den Bedingungen  $n=6-9$ , in der Kontrolle  $n=24$  **C links)** Relative GFAP Expression im Th1-vermittelten Inflamationsprofil. In den Bedingungen  $n=3-8$ , in der Kontrolle  $n=17$  **C rechts)** Relative GFAP Expression im Th17-vermittelten Inflamationsprofil. In den Bedingungen  $n=6-8$ , in der Kontrolle  $n=17$

#### 4.1.2.3 Keine Veränderungen auf mRNA-Ebene für GFAP unter T-Zell vermittelter Inflammation

Die mRNA-Expression für GFAP als Zytoskelettbestandteil und umstrittener Aktivitätsmarker von Astrozyten zeigt sich ähnlich unbeeinflusst von den gesetzten inflammatorischen Reizen (**Abbildung 8A**). Da eine Hochregulierung von GFAP im Rahmen von MS, welches dann sogar im Liquor nachweisbar ist, bekannt ist [110], besteht die Möglichkeit der Inkompatibilität des Maus-Modells zur humanen Pathogenese oder aber auch eine anderweitige Regulation der GFAP-Expressionslevel. Die Regulation kann unabhängig von der mRNA-Expression durch zum Beispiel eine gesteigerte Syntheserate bei gleichbleibender RNA-Menge sein, ebenso ist die Regulation durch weitere, nicht getestete inflammatorische Reize möglich. Die Frage nach der Regulation der GFAP-Expression von Astrozyten sollte Gegenstand weiterer Untersuchungen sein und wurde im Rahmen dieser Doktorarbeit nicht weiter betrachtet.

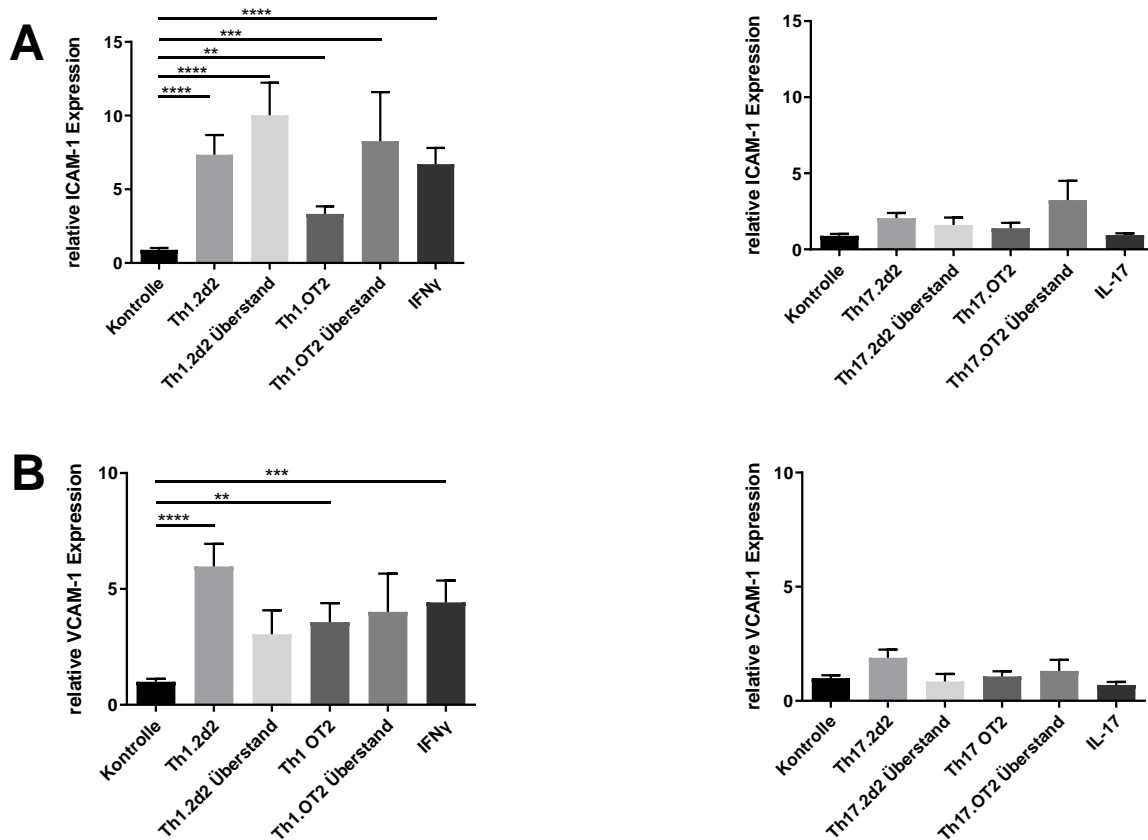
## 4.2 Zelltypabhängige Expression von Adhäsionsmolekülen in vitro und in vivo

Über Adhäsionsmoleküle sind Zell-zu-Zell-Kontakte möglich, die Einfluss auf den Verlauf von MS und EAE haben können [84]. Die Betrachtung von Adhäsionsmolekülen der CAM-Gruppe auf Astrozyten, insbesondere von ICAM-1 und VCAM-1, erbrachte in vitro die aussagekräftigsten Ergebnisse im Hinblick auf die mRNA-Expression (**Abbildung 9**). Dass die in vitro gesehene mRNA-Expression auch auf Proteinebene umgesetzt wurde, konnten histologische Schnittkulturen (OHSC) zeigen (**Abbildung 10**). Die in vitro gewonnenen Daten, die eine vermehrte Expression auf mRNA-Ebene im Zusammenhang mit der Inkubation aus Zellen der Th1-Zellgruppe zeigten, ließen sich in vivo bestätigen. Auch im Rahmen einer Transfer-EAE ließ sich eine deutlich gesteigerte Expression von ICAM-1 und VCAM-1 auf den Astrozyten im Rahmen der Induktion der EAE durch Th1.2d2-Zellen ausmachen (**Abbildung 11**).

### 4.2.1 Th1 spezifische Hochregulation von Adhäsionsmolekülen auf mRNA-Ebene

Im Rahmen der mRNA-Analyse mittels RT-qPCR von Astrozyten zeigte sich ein zellspezifischer Effekt aus dem Inflamationsprofil der Th1-Zellen bei den Adhäsionsmolekülen ICAM-1 und VCAM-1. Die mRNA-Expression des Adhäsionsmoleküls ICAM-1 wurde auf Astrozyten signifikant gesteigert im Zusammenhang mit allen Reizen aus der Th1-assoziierten Gruppe (**Abbildung 9A**: Th1.2d2:  $p < 0,0001$ , Th1.2d2 Überstand:  $p < 0,0001$ , Th1.OT2:  $p < 0,01$ , Th1.OT2 Überstand:  $p < 0,001$ , IFN $\gamma$ :  $p < 0,0001$ ). Somit stieg die Expression sowohl nach der Inkubation mit den antigenspezifischen und -unspezifischen Th1-Zellen, deren jeweiligen Kulturüberständen als auch dem Hauptzytokin IFN $\gamma$ . Im Vergleich

dazu blieb eine Veränderung der Expression nach Inkubation mit allen Komponenten des Inflammationsprofils der Th17-Zellen aus. Daraus lässt sich schließen, dass der Effekt auf zelltypspezifische und ebenso sekretorische Effekte zurückzuführen ist, wobei IFN $\gamma$  als das Hauptzytokin der Th1-Zellen maßgeblich daran beteiligt zu sein scheint.



**Abbildung 9:** Expression von Adhäsionsmolekülen von kortikalen Astrozytenkulturen auf mRNA Ebene unter inflammatorischen Bedingungen. Als Referenzgen zur Normalisierung der Marker wurde die Expression des Haushaltsgens Ribosomal Protein Small 29 (RPS29) zugrunde gelegt. Als nicht-inflammatorische und Lösungsmittel-Kontrolle wurde MM verwendet. Die Inflammationsprofile wurden in Th1- (links) und Th17- (rechts) vermittelte Effekte eingeteilt. Die Bedingungen im Th1-vermittelten Inflammationsprofil waren: Th1.2d2-Zellen, Th1.2d2-Zellkulturüberstand, Th1.OT2-Zellen, Th1-OT2-Zellkulturüberstand, IFN $\gamma$ . Die Bedingungen im Th17-vermittelten Inflammationsprofil waren: Th17.2d2-Zellen, Th17.2d2-Zellkulturüberstand, Th17.OT2-Zellen, Th17.OT2-Zellkulturüberstand, IL-17. Wenn nicht anders angegeben, zeigten sich keine signifikanten Änderungen der mRNA-Expression unter pH-Variationen. Die Darstellung der Daten erfolgte immer als Mittelwert  $\pm$ SEM. **A links)** Relative ICAM-1 Expression im Th1-vermittelten Inflammationsprofil. \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$ . In den Bedingungen  $n=5-11$ , in der Kontrolle  $n=27$  **A rechts)** Relative ICAM-1 Expression im Th17-vermittelten Inflammationsprofil. In den Bedingungen  $n=6-10$ , in der Kontrolle  $n=27$  **B links)** Relative VCAM-1 Expression im Th1-vermittelten Inflammationsprofil. \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ . In den Bedingungen  $n=5-11$ , in der Kontrolle  $n=28$  **B rechts)** Relative VCAM-1 Expression im Th17-vermittelten Inflammationsprofil. In den Bedingungen  $n=7-10$ , in der Kontrolle  $n=28$  **C links)** Relative MCAM-1 Expression im Th1-vermittelten Inflammationsprofil. In den Bedingungen  $n=4-9$ , in der Kontrolle  $n=15$  **C rechts)** Relative MCAM-1 Expression im Th17-vermittelten Inflammationsprofil. In den Bedingungen  $n=5-7$ , in der Kontrolle  $n=15$

In Bezug auf das Adhäsionsmolekül VCAM-1 ließ sich ebenfalls ein Th1-vermittelter Effekt auf die Hochregulation der mRNA-Expression festhalten (**Abbildung 9B**). Im Gegensatz zu ICAM-1 konnte aber bei der mRNA-Expression von VCAM-1 lediglich ein Effekt durch die beiden Th1-Zellkulturen (Th1.2d2:  $p < 0,0001$ , Th1.OT2:  $p < 0,01$ ) sowie IFN $\gamma$

(IFN $\gamma$ :  $p < 0,001$ ), nicht aber durch die Kulturüberstände hervorgerufen werden. Erneut zeigte sich bei keiner Th17-assoziierten Exposition eine Veränderung der Expression der mRNA für VCAM-1. Da die IFN $\gamma$ -Konzentration der Zellkulturen und deren Überstände nicht gemessen wurden, ist ein konzentrationsabhängiger Effekt nicht auszuschließen. Darüber hinaus scheint aber ebenso die zelltypspezifische Interaktion zwischen den Th1-Zellen und den Astrozyten zu einer vermehrten mRNA-Expression von VCAM-1 zu führen.

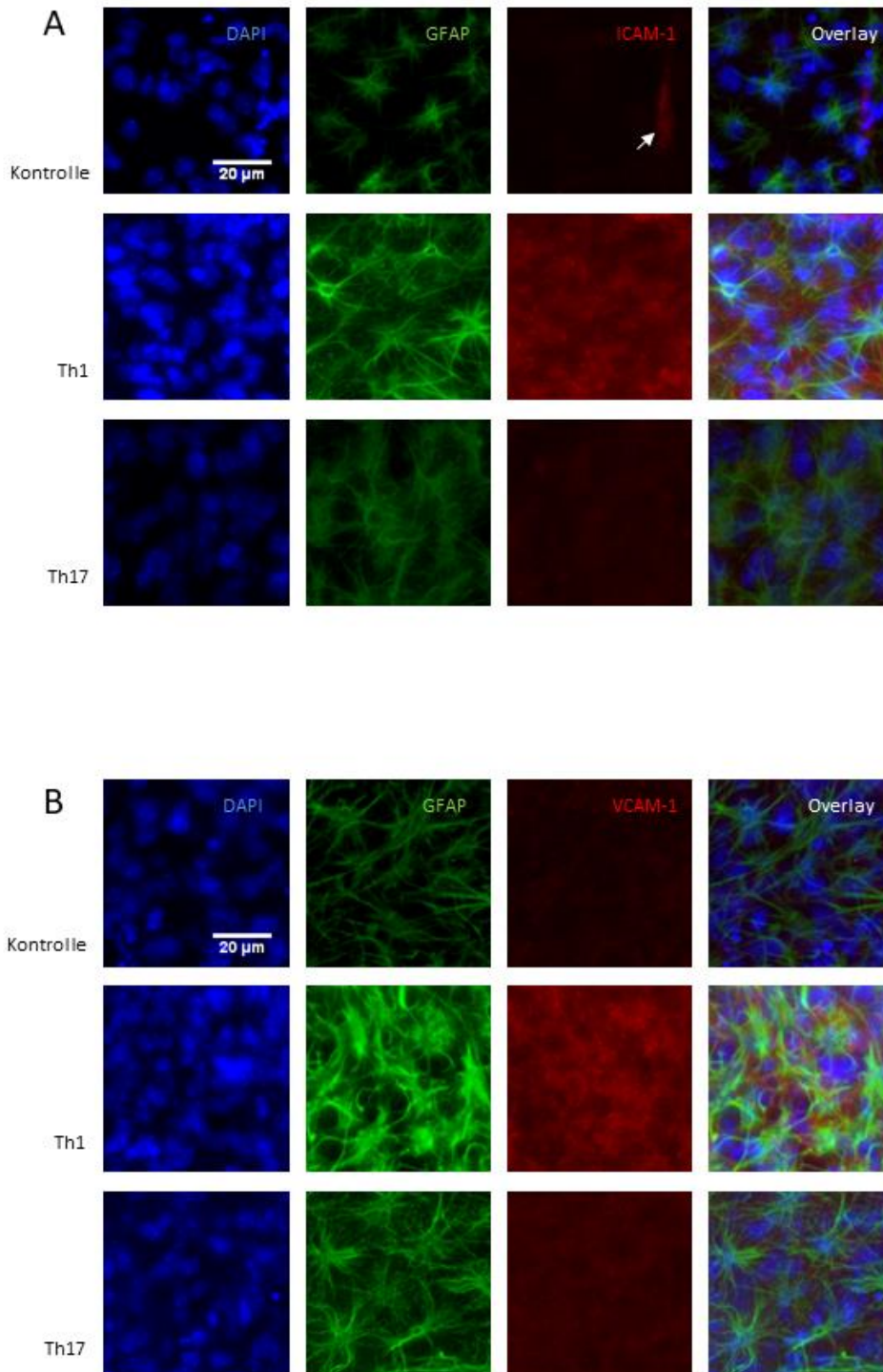
#### 4.2.2 Expression von ICAM-1 und VCAM-1 auf Astrozyten in organotypischen hippocampalen Schnittkulturen

**Abbildung 10A** zeigt exemplarisch die Expression von ICAM-1 auf Astrozyten unter der Kontrollbedingung, der Inkubation mit Th1.2d2- und der Inkubation mit Th17.2d2-Zellen. Unter der Kontrollbedingung ließ sich bereits vereinzelt eine schwache ICAM-1-Expression auf Astrozyten ausmachen (**Abbildung 10A**). Zur Bestätigung der erfolgreichen Färbung wurde in der Kontrolle exemplarisch die vermehrte Expression von ICAM-1 auf einem Gefäß mit dargestellt (weißer Pfeil in **Abbildung 10A**). Unter der Inkubation mit Th1-Zellen konnte eine deutliche Zunahme des Signals für ICAM-1 verzeichnet werden. Ebenfalls unter der Inkubation mit den Th17-Zellen konnte im Vergleich zur Kontrolle ein leichter Anstieg des Signals von ICAM-1 beobachtet werden. Dieser blieb aber weit hinter dem Anstieg des Signals unter Inkubation mit Th1-Zellen zurück. Es ist also ein gradueller Anstieg von Mausmedium zu Th17-Exposition zu Th1-Exposition zu beobachten. Ebenso ließen sich Unterschiede im GFAP-Signal visualisieren. Sahen die Astrozyten unter der Inkubation mit MM klein und filigran aus, schollen ihre Zellkörper sowie die Ausläufer unter den inflammatorischen Reizen mit beiden T-Zellsubtypen an und optisch ließ sich eine Zunahme der Intensität von GFAP ausmachen. Die angefärbten Zellen stellten sich insgesamt unter den inflammatorischen Stimuli als verzweigter und im Umfang ihres Zellkörpers und den Ausläufern als kräftiger dar, was ebenfalls als Zeichen der Reaktion von Astrozyten auf den präsentierten Stimulus gewertet werden kann. Eine Quantifizierung der Intensität des Signals von GFAP, ICAM-1 und VCAM-1 wurde nicht durchgeführt, da es sich um lichtmikroskopische Aufnahmen handelt.

Auch die Expression von VCAM-1 auf Astrozyten nahm nach der Inkubation mit den Th1.2d2- und den Th17.2d2-Zellen im Vergleich zur Kontrollbedingung zu (**Abbildung 10B**). Die stärkste Signalerhöhung war jedoch unter der Inkubation mit Th1-Zellen auszumachen, was die Thesen der auf mRNA-Ebene gewonnenen Ergebnisse unterstützt. Auch unter der Inkubation mit Th17-Zellen war optisch im Vergleich zur Kontrolle mehr VCAM-1 Signal wahrnehmbar, aber auch hier blieb das Signal hinter dem Signal unter der Th1-Bedingung zurück. Ebenso zeigte sich die Expression von GFAP unter den inflammatorischen Reizen verändert. Sie nahm an Intensität zu, genauso wie die Verzweigung der Astrozyten. Außerdem war eine optische Zunahme der Dicke der Ausläufer und Zellkörper ausmachbar, was eine



typische astrozytäre Reaktion auf Inflammation darstellt. Es erfolgte ebenfalls keine quantitative Auswertung der Signalerhöhung, da lediglich exemplarisch die Expression auf Proteinebene dargestellt und weitere quantitative Analysen im *in vivo* Modell durchgeführt wurden.



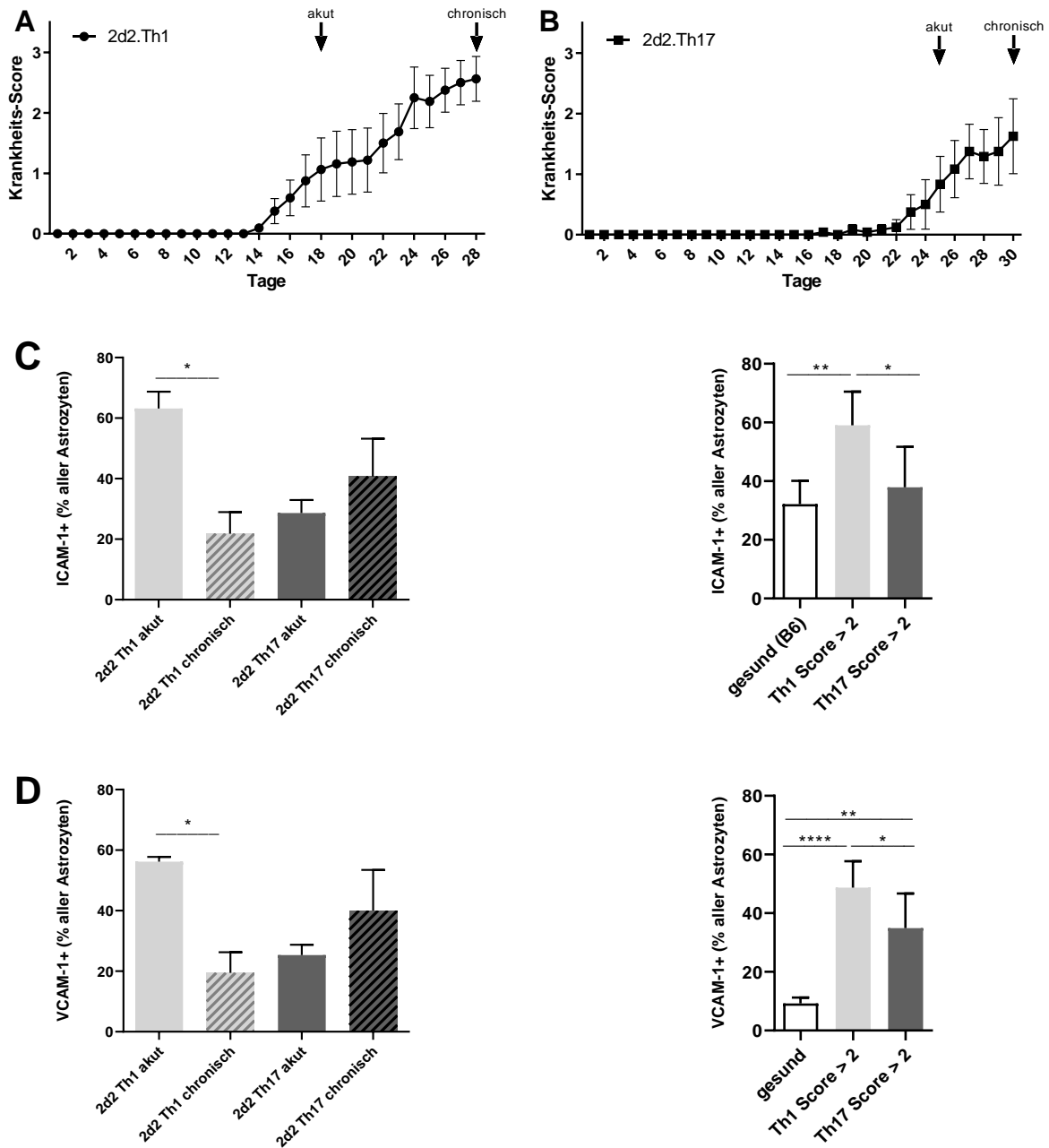
**Abbildung 10:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von OHSC aus B6 Mäusen (p5) nach 24 h Inkubation mit MM (Kontrolle), Th1-Zellen oder Th17-Zellen. 40 fache Vergrößerung. **A)** DAPI in blau, GFAP in grün, ICAM-1 in rot. In der Kontrollbedingung wurde exemplarisch die ICAM-1-Expression auf einem Blutgefäß mit dargestellt (weißer Pfeil). **B)** DAPI in blau, GFAP in grün, VCAM-1 in rot.

#### 4.2.3 Th1 spezifische Effekte auf die Expression von ICAM-1 und VCAM-1 auf Astrozyten in vivo

In **Abbildung 11A** sieht man repräsentativ den Verlauf einer durch Th1-Zellen vermittelten Transfer-EAE. An Tag 15 setzte der Symptombeginn ein und drei Tage später wurde der für den Verlauf als akut definierte Zeitpunkt festgelegt sowie Tiere zur Analyse der akuten Phase getötet und aufgearbeitet. Als chronisch wurde der Verlauf an Tag 28 festgelegt. Zu diesem Zeitpunkt wurden alle verbliebenen Tiere perfundiert und zur weiteren Analyse aufgearbeitet.

Für den Verlauf der Th17-vermittelten Transfer-EAE ließ sich ein etwas späteres Einsetzen der Symptomatik festmachen (**Abbildung 11B**). An Tag 22 konnte der deutliche Symptombeginn gemessen werden und auch dort wurde drei Tage später (Tag 25) die akute Phase des Krankheitsverlaufs festgelegt und Tiere wurden zu diesem Zeitpunkt getötet sowie zur Analyse aufgearbeitet. Die chronische Phase wurde ab Tag 30 definiert und alle verbleibenden Tiere perfundiert sowie zur Analyse weiter aufgearbeitet.

Im Vergleich der Expression in den jeweiligen Krankheitsphasen wurde die stärkste ICAM-1 Expression bei den akut erkrankten Mäusen, welche mit Th1.2d2-Zellen behandelt wurden, beobachtet (**Abbildung 11C** links). Es zeigte sich eine signifikante Mehrexpression im Vergleich zur chronischen Phase der durch Th1-Zellen induzierten EAE ( $p < 0,05$ ). Somit exprimierten in der akuten Phase der durch Th1.2d2-Zellen induzierten EAE etwa 60% aller Astrozyten ICAM-1 auf ihrer Oberfläche, während es in der chronischen Phase nur etwa 20% waren. Bei der durch Th17-Zellen induzierten EAE ließ sich ein entgegengesetzter Trend beobachten. So ergab sich der Trend zur vermehrten Expression von ICAM-1 in der chronischen Phase, mit etwa 40% ICAM-1 Expression auf der Oberfläche aller Astrozyten im Vergleich zur akuten Phase, wo es etwa 30% waren. Dies steht im Einklang mit der These von Loos et al. zu IFN $\gamma$ -produzierenden exTh17-Zellen und dem Einfluss von IFN $\gamma$  auf die ICAM-1-Expression. Demnach wäre die vermehrte ICAM-1 Expression auf der Oberfläche der Astrozyten durch die IFN $\gamma$ -Sekretion der Th1-Zellen sowie exTh17-Zellen erklärbar. Warum es jedoch in der chronischen Phase der durch Th1-Zellen induzierten EAE zum Abfall der Oberflächenexpression von ICAM-1 kommt, sollte Gegenstand weiterer Untersuchungen sein und wurde im Rahmen dieser Doktorarbeit nicht weiter untersucht. Eine astrozytäre Feedbackregulation, die nach wenigen Tagen zur Reduktion der vermehrten inflammatorischen Genexpression führt, oder ähnliche Kompensationsmechanismen sind nicht auszuschließen [82].



**Abbildung 11:** In vivo Expression der Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1 auf Astrozyten während einer T-Zellsubtyp-spezifischen Transfer-EAE. Eine EAE Induktion durch nicht ZNS spezifische T Zellen (OT2) ergab sich als nicht erfolgreich, da die Tiere nicht erkrankten (Daten nicht gezeigt). **A)** Exemplarischer Verlauf einer Transfer-EAE mittels Th1-Zellen. Akute Phase 3 Tage nach Symptombeginn, chronische Phase mind. 10 Tage später. n=8 **B)** Exemplarischer Verlauf einer Transfer-EAE mittels Th17-Zellen. Akute Phase 3 Tage nach Symptombeginn, chronische Phase mind. 5 Tage später. n=6 **C)** ICAM-1 Expression auf Astrozyten nach Transfer-EAE. Aufarbeitung und angeschlossene Markeranalyse mittels Durchflusszytometrie. **C links)** Signifikante Steigerung der Expression von ICAM-1 in der akuten Phase der Th1-vermittelten Transfer-EAE. Trend zur Zunahme der ICAM-1 Expression in der chronischen Phase der Th17-vermittelten Transfer-EAE. \*p < 0,05. n=3-4 **C rechts)** Signifikante Steigerung der Expression von ICAM-1 auf Astrozyten bei Tieren mit einem Krankheitsscore von > 2 in der Th1-vermittelten Transfer-EAE im Vergleich zur gesunden Gruppe und im Vergleich zu Tieren der Th17-vermittelten Transfer-EAE mit einem Krankheitsscore > 2. \*p < 0,05, \*\*p < 0,01. In der gesunden Kontrollgruppe n=4, Th1 n=8, Th17 n=6. (Abbildung modifiziert nach Loos et. al. 2020) **D)** VCAM-1 Expression auf Astrozyten nach Transfer-EAE. Aufarbeitung mittels Durchflusszytometrie. **D links)** Signifikante Steigerung der Expression von VCAM-1 in der akuten Phase der Th1-vermittelten Transfer-EAE. Trend zur Zunahme der VCAM-1 Expression in der chronischen Phase der Th17-vermittelten Transfer-EAE \*p < 0,05. n=3-4 **D rechts)** Signifikante Steigerung der Expression von VCAM-1 auf Astrozyten bei Tieren mit einem Krankheitsscore von > 2 in der Th1-vermittelten Transfer-EAE im Vergleich zur gesunden Gruppe und im Vergleich zu Tieren der Th17-vermittelten Transfer-EAE mit einem Krankheitsscore > 2. Ebenso signifikante Steigerung der Expression von VCAM-1 auf Astrozyten bei Tieren mit

einem Krankheitsscore von  $> 2$  in der Th17-vermittelten Transfer-EAE im Vergleich zur gesunden Gruppe. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$ . In der gesunden Kontrollgruppe  $n=4$ , Th1  $n=8$ , Th17  $n=6$  (Abbildung modifiziert nach Loos et. al. 2020)

Der Vergleich von besonders stark erkrankten Tieren mit einem Krankheitsscore von  $>2$  zu gesunden Tieren zeigte ebenfalls eine signifikant stärkere ICAM-1 Expression auf der Oberfläche von Astrozyten, wenn die Tiere durch den Transfer von Th1.2d2-Zellen erkrankten ( $p < 0,01$  **Abbildung 11C** rechts). Bei den gesunden Tieren ergab sich eine oberflächliche ICAM-1-Expression der Astrozyten auf etwa 30% der Zellen, bei den schwer erkrankten Tieren, die mit Th1.2d2-Zellen behandelt wurden, war ein stark signifikanter Anstieg auf etwa 60% messbar. Bei den ebenfalls schwer erkrankten Tieren aus der Th17.2d2-Gruppe wurde im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe lediglich ein dezenter Anstieg gemessen. Es zeigte sich auf etwa 40% der Astrozyten eine oberflächliche ICAM-1-Expression. Der Unterschied in der Expression zwischen den beiden erkrankten Gruppen stellte sich ebenfalls als signifikant dar ( $p < 0,05$ ). Die Schwere der Symptomatik scheint also mit der Expression von ICAM-1 auf der Oberfläche von Astrozyten zu korrelieren.

In Bezug auf die oberflächliche Expression von VCAM-1 auf Astrozyten im Verlauf der EAEs zeigten sich ähnliche Ergebnisse zu denen von ICAM-1. In der Betrachtung der VCAM-1-Expression auf Astrozyten während der akuten und chronischen Phase der EAEs ergab sich erneut die stärkste Expression bei den mit Th1.2d2-Zellen behandelten Tieren in der akuten Krankheitsphase (**Abbildung 11D** links). Während in der akuten Phase auf etwa 60% aller Astrozyten VCAM-1 gemessen werden konnte, war es in der chronischen Phase auf nur etwa 20% aller Astrozyten messbar, was sich als signifikanter Unterschied darstellte ( $p < 0,05$ ). Bei der durch Th17.2d2 induzierten EAE zeigte sich ebenfalls der Trend zur Zunahme der VCAM-1-Expression auf Astrozyten in der chronischen Phase. Dort war in der akuten Phase auf etwa 25% aller Zellen eine VCAM-1-Expression messbar und in der chronischen Phase kam es zu einer Steigerung der Expression auf etwa 40% aller Astrozyten. Auch hier kann man auf den Einfluss von IFN $\gamma$  auf die Expression von VCAM-1 im EAE-Geschehen schließen und die Ergebnisse stehen im Einklang mit den aus der Analyse der RT-qPCR-Daten gewonnenen Erkenntnissen.

IFN $\gamma$  scheint eine Schlüsselrolle in der Expression der beiden Adhäsionsmoleküle auf Astrozyten zu spielen. Betrachtet man die Ergebnisse der Analyse der VCAM-1-Expression auf Astrozyten bei den schwer erkrankten Tieren, zeigt sich wie bei ICAM-1 auch dort eine signifikante Steigerung der Expression im Vergleich zu den gesunden Tieren (**Abbildung 11D** rechts). Bei den gesunden Tieren konnte lediglich auf etwa 8% aller Astrozyten VCAM-1 auf der Oberfläche gemessen werden. Bei den schwer erkrankten Tieren aus der durch Th1.2d2-Zellen induzierten EAE-Gruppe konnte auf etwa 50% aller Astrozyten und bei den schwer erkrankten Tieren aus der durch Th17.2d2-Zellen induzierten EAE-Gruppe auf etwa 35% aller Astrozyten VCAM-1 als Oberflächenprotein gemessen werden. Der Unterschied zwischen der

gesunden Kontrollgruppe und den schwer erkrankten Tieren aus der Th1.2d2-Gruppe stellte sich als sehr stark signifikant dar ( $p < 0,001$ ), der Unterschied zwischen der gesunden Gruppe und den stark erkrankten Tieren aus der Th17.2d2-Gruppe stellt sich ebenfalls als stark signifikant dar ( $p < 0,01$ ). Im Vergleich zwischen den beiden erkrankten Gruppen stellte sich die Mehrexpression von VCAM-1 unter der Behandlung mit Th1.2d2-Zellen zu der Behandlung mit Th17.2d2-Zellen als signifikant dar ( $p < 0,05$ ). Als Schlussfolgerung lässt sich ziehen, dass die Krankheitsschwere mit der Expression von VCAM-1 auf der Oberfläche von Astrozyten korreliert.

## 5 Diskussion

Die genaue Beteiligung insbesondere von Astrozyten an der Pathogenese verschiedener Erkrankungen des ZNS war lange ein wissenschaftliches Nischenthema. Doch gerade im Zusammenhang mit MS ist die Interaktion zwischen Th1- bzw. Th17-Zellen und Astrozyten von großer Relevanz [142]. Durch ihre enge Beziehung zur Gefäßversorgung des ZNS sind Astrozyten höchstwahrscheinlich die ersten residenten ZNS-Zellen, mit denen eingewanderte Th-Zellen in Kontakt treten können [129, 143]. Aktivierte Th-Zellen, die die BHS überschritten haben, sezernieren im ZNS proinflammatorische Zytokine, wie IL-17, INF $\gamma$  oder TNF $\alpha$  [119]. Bei Astrozyten kann dies zur Umwandlung in einen reaktiven Typ führen, zur Proliferation und Formation einer Glia-Narbe, aber vor allem auch zur Ausschüttung astrozytärer Zytokine, die zur Rekrutierung und Aktivierung weiterer Lymphozyten im ZNS und damit in einen Teufelskreis gegenseitiger Aktivierung führen [56]. Doch nicht nur die humoralen Faktoren haben Einfluss auf Astrozyten. Auch die Zell-Zell-Interaktion zwischen Th-Zellen und Astrozyten ist relevant, zum Beispiel über MHC- oder Adhäsionsmoleküle [84, 104]. Über Adhäsionsmoleküle ist eine antigen-unabhängige Interaktion möglich, weshalb als Teil dieser Doktorarbeit auch die Interaktion von Astrozyten und Th-Zellen, die nicht auf ZNS-spezifische oder gar überhaupt murin exprimierte Antigene geprimed waren, untersucht wurde. Durch die Verwendung kortikaler Astrozytenkulturen wurde die direkte Interaktion zwischen Astrozyten und den Th-Zell vermittelten inflammatorischen Stimuli ohne weitere Co-Stimulation durch anderweitige Zellen analysiert. Ein ähnlicher Untersuchungsansatz wurde von Prajeet et al. 2017 gewählt, wobei der direkte zelluläre Kontakt zwischen Astrozyten und Th-Zellen nicht analysiert wurde. Zudem erfolgte im Gegensatz zu den Untersuchungen von Prajeet et al. die Inkubation für 24 h [142, 144]. Durch die Verwendung von 2d2 und OT2 Th-Zellen sollten die Effekte der Interaktionen auf zellulärer Ebene in antigen-spezifisch oder antigen-unabhängig eingeteilt werden. Zur weiteren Differenzierung der sekretorischen Effekte erfolgte neben der Inkubation mit nur den jeweiligen Hauptzytokinen der Th1- und Th17-Zellkultur ebenfalls die Inkubation mit im pH-Wert verändertem Mausmedium. Damit sollte überprüft werden, ob für die Effekte nach Inkubation mit dem Kulturmedium wirklich die ins Medium

sekretierten Stoffe oder die pH-Senkung ausschlaggebend waren. Gleichzeitig wurde damit die pH-Wert-Senkung im inflammatorischen Milieu gemittelt. Zur Analyse wurden Zielstrukturen gewählt, deren Beteiligung an der Pathogenese von MS bereits bekannt waren. Ebenso bekannt war die Fähigkeit von Astrozyten zur Synthese der Zielstrukturen. Doch ob Th1- oder Th17-spezifische Effekte die Expression der untersuchten Zielstrukturen vermitteln konnten, war der Literatur nicht zu entnehmen.

Als Fortsetzung der experimentellen Arbeit dieser Promotion wären verschiedene Ansatzpunkte denkbar. Einerseits erfolgte die Untersuchung der mRNA-Veränderungen nur zu einem Zeitpunkt. Denkbar wäre die Analyse zu einem früheren und späteren Zeitpunkt, um mögliche Schwankungen in der mRNA-Expression darzustellen. Andererseits erfolgte die Analyse der meisten Zielstrukturen nur auf mRNA-Ebene, weshalb eine Fortsetzung der Analyse auf Protein-Ebene (nur bei ICAM-1 und VCAM-1 erfolgt) zur Validierung der mRNA-Daten möglich wäre. Darüber hinaus wäre die Analyse der astrozytären mRNA nach Inkubation der Astrozytenkulturen mit weiteren T-Zellarten ein Ansatzpunkt zur Erweiterung der Testreihe. In Bezug auf die Heterogenität von Astrozyten wäre die Untersuchung weiterer ZNS-Areale ein weiterer möglicher Ansatzpunkt zur Vertiefung der Recherche.

Im Falle von ICAM-1 und VCAM-1 wäre eine mögliche Fortsetzung der Experimentenreihe die quantitative Auswertung der Adhäsionsmoleküle auf den OHSC mit Hilfe konfokaler Lasermikroskopie. Die Erhöhung der Fallzahl (n) bei der Analyse der Astrozyten aus der Transfer-EAE wäre ebenfalls zur Validierung der Ergebnisse denkbar.

## 5.1 Regulation astrozytärer Zytokine

In Bezug auf die mRNA-Expression von IL-6 konnten in dieser Doktorarbeit die Erkenntnisse von Prajeeth et al. bestätigt werden. Diese beobachteten nach einer 16-stündigen Inkubation mit den Kulturüberständen von Th1- und Th17-Zellen eine signifikante Steigerung der mRNA-Expression von IL-6 um mehr als das Doppelte im Vergleich zur Kontrolle [144]. Auch nach 24-stündiger Inkubation mit den Kulturüberständen stellte sich die mRNA-Expression für IL-6 weiterhin als signifikant gesteigert dar, unabhängig von der Antigenspezifität der Th-Zellen. Da sich die Effekte weder durch die Inkubation mit den Zellen, den Hauptzytokinen der jeweiligen Kulturen, noch durch die pH-Wertänderungen reproduzieren ließen, lässt sich von einem synergistisch sekretorischen Effekt ausgehen. Im Gegensatz zu den Erkenntnissen von Shan et al. konnte keine erhöhte Expression der mRNA für IL-6 nach der Inkubation mit IL-17 allein detektiert werden [145]. Im Gegensatz zu Shan et al., die 100 ng/mL IL-17 zur Stimulation verwendeten, wurde im Rahmen dieser Doktorarbeit eine Konzentration von 200 ng/mL IL-17 verwendet. Ein möglicher Ansatz zur Erklärung der unterschiedlichen Expression könnte ein negativer Feedback-Mechanismus bei erhöhter IL-17-Konzentration sein. Wie Ma et al. zeigen konnten, wirkt sich IL-17 vor allem synergistisch mit weiteren Zytokinen auf die mRNA-Expression von IL-6 aus, welche in den Überständen der Th17-Zellkultur vorzufinden sind

[146]. Eine weitere Analyse der Kulturüberstände zur Bestimmung weiterer möglicher Faktoren ist im Rahmen dieser Doktorarbeit nicht erfolgt.

Die Bedeutung und Beteiligung des immunsuppressiven IL-10 in peripheren Pathologien ist gut erforscht, doch zentralnervös durch Astrozyten sezerniertes IL-10 ist ein Feld mit noch vielen offenen Fragen [100]. Die Beteiligung von IL-10 bei MS ist seit langem belegt, doch die genauen Mechanismen zur Regulation der Expression von IL-10 vor allem in Hinblick auf Astrozyten in MS sind nicht bekannt [147]. Die astrozytäre mRNA-Expression von IL-10 zeigte in den Untersuchungen dieser Doktorarbeit keine signifikanten Veränderungen unter der Inkubation aus dem inflammatorischen Profil von Th1- oder Th17-Zellen. Lediglich unter der Inkubation mit Th1.2d2-Zellen zeigte sich eine gesteigerte Expression für die mRNA von IL-10, jedoch mit einem sehr hohen Standardfehler. Unter der Stimulation mit LPS konnten Ledebauer et al. eine verzögerte Reaktion auf den inflammatorischen Reiz ausfindig machen, die sich sowohl in der mRNA- als auch in der Protein-Expression zeigte und formulierten die mögliche Selbstlimitierung der inflammatorischen Kaskade durch IL-10 [148]. Denkbar wäre also, dass die Inkubationszeit von 24 h nicht ausreichend war, um eine Hochregulierung der mRNA-Expression zu initiieren. Möglicherweise reicht aber auch die alleinige Inkubation mit den Th-Zellen und deren weiter assoziierten Inflammationsstimuli nicht aus, um die mRNA-Expression von IL-10 in Astrozyten anzuregen. Gegebenenfalls benötigt es weitere Zellarten wie Mikroglia oder weitere co-stimulierende Zytokine als Modulatoren. In den Untersuchungen von Prajeeth et al. konnte eine herabgesetzte mRNA-Expression für IL-10 unter der Inkubation mit den Überständen aus Th1- und Th17-Kulturen festgestellt werden, was durch die Untersuchungen im Rahmen dieser Doktorarbeit nicht bestätigt werden konnte. Insgesamt konnte keine Regulierung der mRNA-Expression in Astrozyten durch inflammatorische Reize aus dem Profil von Th1- und Th17-Zellen festgehalten werden.

Die Rolle von astrozytär sekretiertem IL-23 am inflammatorischen Geschehen während EAE ist ebenfalls noch nicht genau geklärt [149]. IL-23 ist ein entscheidender Faktor bei der Rekrutierung autoreaktiver B- und T-Zellen in das ZNS [106]. Die Aktivierung des IL-23-Rezeptorkomplexes auf Th17-Zellen führt zu deren Stimulation und Aktivierung. Doch welchen Einfluss wiederum diese autoreaktiven Lymphozyten auf Astrozyten und deren Produktion von IL-23 haben, ist noch nicht genauer beschrieben. Die gemeinsame Untereinheit p40, die sich IL-23 mit IL-12 teilt, wird von Astrozyten unter der Stimulation mit LPS exprimiert, unter der Stimulation mit IFN $\gamma$  und IL-1 $\beta$  konnten Constantinescu et al. auch die Expression der individuellen Untereinheit p19 darstellen [104]. Im Rahmen der Experimentenreihe dieser Doktorarbeit erfolgte die Untersuchung auf die mRNA-Expression für IL-23 in Astrozyten im Zusammenhang mit der Interaktion mit Th-Zellen. Die sich dort als signifikant präsentierenden Ergebnisse der Hochregulierung der mRNA-Expression unter der Inkubation mit den

ZNS-spezifischen Th-Zellen sowohl des Th1- als auch des Th17-Subtyps legen eine antigenabhängige Interaktion als Mechanismus nahe. IL-23 ist ein entscheidender Faktor bei der Wandlung von Astrozyten zu antigenpräsentierenden Zellen [104]. Daraus lässt sich auf eine mögliche positive Feedbackschleife schließen. Durch Th-Zellen stimulierte Astrozyten fahren die IL-23-Expression hoch, welches dann para- und autokrin wiederum die Fähigkeit der Astrozyten zur Antigenpräsentation und damit Stimulation der Th-Zellen beeinflusst. Allerdings ließen sich auch unter der nicht ZNS-spezifischen Inkubation mit Th1- und Th17-Zellen nicht signifikante, dennoch vorhandene Expressionssteigerungen für die mRNA von IL-23 ausmachen. Diese Steigerung spricht gegen die antigenspezifische Aktivierung von Astrozyten, auch weil MOG nicht auf Astrozyten selbst exprimiert wird und in den reinen Astrozytenkulturen auch keine Interaktion von Astrozyten und Oligodendrozyten stattfand. Auch unter der Inkubation mit IFN $\gamma$  konnte eine nicht signifikante Mehrexpression ausgemacht werden, nicht jedoch durch die Kulturüberstände. Ein möglicher konzentrationsabhängiger Effekt von IFN $\gamma$  wäre somit annehmbar. Die Erhöhung der Fallzahl (n) und eine Untersuchung der Kulturüberstände auf die IFN $\gamma$ -Konzentration wären mögliche Ansatzpunkte zur genaueren Evaluierung der Ergebnisse.

Das Multitalent GMCSF zeigte das breiteste Antwortverhalten von Astrozyten auf Reize aus dem Th-Zell-vermittelten Inflammationsprofil. Das Zytokin spielt eine zentrale Rolle in der Entstehung von MS und nimmt selbst auch Einfluss auf Astrozyten und deren Reaktivität [90]. Doch über die Mechanismen, die die GMCSF-Produktion in Astrozyten vermitteln, gerade auch in Hinblick auf MS und EAE, ist wenig bekannt. Astrozyten zeigen heterogene Reaktionsmuster in EAE, die von Wheeler et al. mittels Einzel-Zell-Sequenzierung in verschiedene Cluster eingeteilt werden konnten. Die in der Auswertung am stärksten vertretende Gruppe von Astrozyten des Cluster 4 zeigten verstärkte Signale für GMCSF [150]. Astrozyten reagieren also im Rahmen von EAE auf die inflammatorischen Stimuli mit einer vermehrten Expression von GMCSF. Es ist bekannt, dass IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$  die Produktion von GMCSF in Astrozyten anregen können [109], doch zu weiteren inflammatorischen Stimuli konnten im Rahmen der Literaturrecherche dieser Doktorarbeit keine zusätzlichen Daten gefunden werden. Auf die ausgewählten inflammatorischen Reize der Experimentenreihe dieser Doktorarbeit war die stärkste Antwort auf die Inkubation mit den Kulturüberständen der Th1- und Th17-Zellkulturen zu beobachten, unabhängig von der Antigenpezifität und teilweise über das Zwanzigfache im Vergleich zur Kontrolle erhöht. Keine Veränderungen ergab sich nach Inkubation mit den Hauptzytokinen der Zellkulturen. Im Inflammationsprofil der Th17-Zellen zeigte sich zudem auch eine signifikante Erhöhung der mRNA-Expression für GMCSF als Antwort auf die Inkubation mit sowohl den 2d2 als auch den OT2 Th17-Zellen. Die vermehrte Expression lässt sich teilweise mit der Sekretion von TNF $\alpha$  in die Kulturüberstände erklären, was sowohl von den Th1- als auch den Th17-Zellen sezerniert wird. Doch scheint es



noch eine zusätzliche zelluläre Stimulation durch Th17-Zellen, jedoch nicht durch Th1-Zellen zu geben. Nach der Inkubation mit im pH-Wert auf 6.2 gesenktem Mausmedium konnte man ebenfalls eine vermehrte Expression von mRNA für GMCSF erkennen, weshalb sich die gesteigerte mRNA-Expression nach Inkubation mit den Zellkulturüberständen auch mit der pH-Wertänderung erklären lässt. Insgesamt scheint die gesteigerte GMCSF-mRNA ein sensibler Marker für astrozytäre Reaktivität unterschiedlicher Genese zu sein.

## 5.2 Astrozytäre Aktivierungsmarker

Die Mehrexpression von GFAP, die auch bei EAE als Astroglieose gut sichtbar ist [56], scheint den Untersuchungen dieser Doktorarbeit zufolge nicht auf mRNA-Ebene reguliert zu sein. In den OHSC dahingegen zeigen sich optisch deutlich wahrnehmbare GFAP-Steigerungen in den Astrozyten, und zwar ebenso wie von Prajeeth et al. formuliert, sowohl durch die Interaktion mit Th1- als auch mit Th17-Zellen. Somit lässt sich bestätigen, dass beide Th-Zellarten in der Lage sind, Astrozyten zur Astroglieose anzuregen. Da sich trotz unveränderter mRNA-Expression in den reinen Astrozytenkulturen die GFAP-Expression in den OHSC jedoch deutlich wahrnehmbar unter den inflammatorischen Reizen auf Proteinebene steigert, muss ein Regulationsmechanismus vorhanden sein. Die Regulation könnte entweder unabhängig der mRNA-Expression ablaufen, da auch in der Entwicklung des ZNS die mRNA-Konzentration für GFAP nicht gleichauf mit der Expression für GFAP korreliert [151]. Denkbar wäre zum Beispiel eine Regulierung über RNA-Stabilisierung oder auch eine post-translationale Regulierung. Oder aber Astrozyten benötigen neben der Stimulation von Th-Zellen auch Stimulation durch weitere Zellarten, die in den reinen Astrozytenkulturen nicht vorhanden waren. Eine Kontrolle der GFAP-Protein-Expression ist in den Astrozytenkulturen nicht erfolgt und kann damit nicht beurteilt werden.

Astrozyten werden auch als nicht-professionelle APC bezeichnet, da sie nicht konstitutiv, sondern unter bestimmten Bedingungen, wie Verletzung, während der Entwicklung aber auch unter verschiedenen inflammatorischen Reizen in der Lage sind, MHC-Moleküle der Klasse I und II zu exprimieren [104, 112]. MHC-Moleküle dienen der Antigenpräsentation für Th-Zellen und stellen somit einen zentralen Punkt in der Autoreaktivität von MS dar. Über MHC-Moleküle der Klasse I können CD8+ T-Zellen aktiviert werden, zusätzlich ist MHC I beteiligt an wichtigen nicht-immunologischen Prozessen wie der synaptischen Plastizität und axonaler Regeneration [112]. Liddel et al. definierten H2D1, ein Zielgen für MHC I Moleküle, als eines der ausschlaggebenden Gene für den reaktiven „A1“-Typ von Astrozyten [58]. Auch wenn die Unterteilung in A1 und A2 Astrozyten nicht mehr genutzt wird, kann doch festgehalten werden, dass H2D1 beziehungsweise MHC I auf Astrozyten eine wichtige Komponente bei ihrer Reaktivität darstellt. Falsig et al. konnten die Hochregulierung der mRNA für MHC I in primären Astrozytenkulturen unter der Inkubation mit einem Zytokinmix aus TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und IFN $\gamma$

beobachten [86]. Die Untersuchungen dieser Doktorarbeit konnten keine Veränderungen im mRNA-Expressionsmuster unter den gewählten inflammatorischen Stimuli festhalten. Der von Falsig verwendete Zytokinmix legte nahe, dass auch unter der Inkubation mit den Kulturüberständen der Th1-Zellkultur eine Mehrexpression der mRNA zu erwarten war. Dies konnte jedoch nicht beobachtet werden. In der Experimentenreihe von Liddel et al. wurden als Stimuli für die Astrozyten die Kulturüberstände aus unterschiedlich aktivierten Mikrogliaulturen verwendet, was wiederum zur Hochregulierung der mRNA-Expression für H2D1 bei den Astrozyten führte [152]. Dies lässt annehmen, dass Th-Zellen allein nicht in der Lage sind, die mRNA-Expression für MHC I auf Astrozyten zu stimulieren, sondern dies über sekretorische Effekte von Mikroglia aus reguliert wird.

Für die induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase zeigten sich in den Untersuchungen dieser Doktorarbeit signifikante Veränderungen in der mRNA-Expression, die sowohl durch zelluläre Interaktion der MOG-spezifischen Zellen beider Th-Zellsubtypen, als auch durch sekretorische Effekte in den Kulturüberständen ausgelöst wurden. Bei den Kulturüberständen spielte die Antigenpezifität der Th-Zellen keine Rolle, wobei der Kulturüberstand der Th17.OT2-Zellen aufgrund des hohen Standardfehlers kein Signifikanzniveau erreichen konnte. Prajeeth et al. konnten ebenfalls eine vermehrte Expression für iNOS unter der 16-stündigen Inkubation mit den Kulturüberständen der Th1- und Th17-Zellsubtypen darstellen, was sich durch die Ergebnisse dieser Doktorarbeit bestätigen ließ [144]. Auch die Inkubation mit INF $\gamma$  löste eine Mehrexpression der mRNA für iNOS in Astrozyten aus, was nahelegt, dass eine hohe INF $\gamma$ -Konzentration auch ohne weitere inflammatorische Zytokine wie IL-1 $\beta$  oder TNF $\alpha$  oder gar LPS ebenfalls ausschlaggebend sein kann [85, 114]. In der für diese Doktorarbeit durchgeführten Literaturrecherche konnten keine Hinweise zu Th-zellspezifischen Effekten auf die mRNA-Produktion von iNOS in Astrozyten gefunden werden. Die ZNS-Antigenpezifität schien bei der Interaktion ausschlaggebend zu sein, auch wenn Astrozyten kein MOG exprimieren und den primären Astrozytenkulturen auch kein zusätzliches MOG hinzugefügt wurde. Der genaue Mechanismus, der zur antigenspezifischen Interaktion zwischen den Th1-/Th17-Zellen und den Astrozyten zur vermehrten Expression von mRNA für iNOS führt, ist im Rahmen dieser Doktorarbeit nicht weiter untersucht worden. Über die durch die Interaktion zwischen Th1-/Th17-Zellen und Astrozyten mögliche Mehrexpression von mRNA für iNOS kann in der Folge die Produktion von reaktiven Stickstoffspezies stark ansteigen und die Gewebeerstörung im Rahmen von MS vorantreiben.

### **5.3 Adhäsionsmoleküle auf Astrozyten unter Neuroinflammation**

Adhäsionsmoleküle sind beteiligt an der Infiltration von Th-Zellen in das ZNS [125]. Die genaue Bedeutung für die Pathophysiologie bei MS oder EAE ist Gegenstand aktueller Forschung. Als Teil dieser Doktorarbeit wurde die Expression der Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1

auf Astrozyten auf Th-zellabhängige Effekte untersucht. Es konnte eine Th1-vermittelte Mehrexpression beider Adhäsionsmoleküle auf murinen kortikalen Astrozyten gezeigt werden. Bei der Auswertung aller Astrozyten-bezogenen Daten ist stets die enorme Heterogenität dieser Zellpopulation zu berücksichtigen. Williams et al. formulierten eine durch Th17-assoziierte zytokinvermittelte Mehrexpression von VCAM-1 auf Astrozyten des Hirnstamms und eine damit einhergehende verhinderte Erholungsphase der autoimmunen Angriffe [130]. In den Ergebnissen dieser Doktorarbeit konnten in der akuten Reaktion von kortikalen Astrozyten keine Th17-vermittelten Effekte auf die Expression von ICAM-1 oder VCAM-1 festgestellt werden, also 24 h nach der Inkubation mit dem Inflammationsprofil der Th1- und Th17-Zellen auf mRNA-Ebene und in der Analyse der akuten Phase der Th1- und Th17-Transfer-EAE. Optisch ließ sich in der Betrachtung von mit Th17.2d2-Zellen inkubierten OHSC eine leichte Steigerung der Expression von ICAM-1 und VCAM-1 ausmachen, was gegebenenfalls mit der zusätzlichen Co-Stimulation über weitere residente ZNS-Zellen wie Mikroglia vermittelt sein kann. In den OHSC zeigte sich dahingegen eine stark betonte Mehrexpression von ICAM-1 und VCAM-1, vermittelt durch die Inkubation mit Th1.2d2-Zellen. Die mRNA-Expression beider Adhäsionsmoleküle scheint ganz klar durch Th1-vermittelte und Antigen-unspezifische Effekte, insbesondere IFN $\gamma$ , hochreguliert zu werden. Die Analyse der chronischen Phase der Transfer-EAE lässt jedoch darauf schließen, dass der Th1-assoziierte Effekt auf die mRNA- und Protein-Expression von ICAM-1 und VCAM-1 eine Akutreaktion der Astrozyten ist, die mit anhaltender Exposition abnimmt. Dies unterstreicht die phasenabhängig unterschiedliche Wirkung von IFN $\gamma$  [153]. In Bezug auf die Veränderung der Zytokinexpression von Th17-Zellen im Verlauf einer EAE zu sogenannten ex-Th17-Zellen, die auch in der Lage sind, IFN $\gamma$  zu produzieren, lässt sich die Tendenz zur Mehrexpression der Adhäsionsmoleküle in der chronischen Phase der Transfer-EAE erklären [13]. In der akuten Phase der Inflammation der Transfer-EAE vermittelt das durch Th1-Zellen sezernierte IFN $\gamma$  den Anstieg von Adhäsionsmolekülen auf Astrozyten, was aber in der chronischen Phase gegebenenfalls durch einen Anstieg der IFN $\gamma$ -Konzentration oder durch die Länge der Exposition abnimmt. Dahingegen setzt die IFN $\gamma$ -Produktion von exTh17-Zellen verzögert ein, was die Tendenz zum Anstieg der Moleküle ICAM-1 und VCAM-1 in der chronischen Phase der durch Th17-Zellen eingeleiteten Transfer-EAE erklärt.

Dass die Expression von Adhäsionsmolekülen auf Astrozyten im Zusammenhang mit der Schwere der Erkrankung steht, zeigt die Auswertung der besonders stark erkrankten Tiere mit einem Score von >2 im Vergleich zu gesunden Tieren. ICAM-1, was auch unter physiologischen Bedingungen von Astrozyten exprimiert werden kann, wurde bei den stark erkrankten Tieren der Th1-vermittelten EAE etwa doppelt so stark auf der Oberfläche exprimiert. Der Effekt wiederholte sich nicht in der gleichen Intensität in der durch Th17-Zellen vermittelten EAE. Für VCAM-1 zeigte sich bei beiden Zellarten eine signifikante

Mehrexpression des Adhäsionsmoleküls bei den schwer erkrankten Tieren beider Gruppen. Daraus lässt sich eine mögliche Korrelation zwischen der Schwere von EAE und dem über Adhäsionsmoleküle auf Astrozyten vermittelten Influx von Immunzellen in das ZNS formulieren.

Betrachtet man in der Zusammenschau der mRNA-Untersuchung die Ergebnisse, lässt sich die These formulieren, dass die Antigenpezifität der Th-Zellen zur Initiierung der Reaktivität von Astrozyten eine untergeordnete Rolle spielt. Viele der untersuchten astrozytären Zytokine und Aktivitätsmarker werden auf mRNA-Ebene sowohl von ZNS-spezifischen 2d2 Th-Zellen als auch von den auf OVA spezialisierten, somit nicht ZNS-spezifischen OT2 Th-Zellen hochreguliert und damit wird eine inflammatorische Kaskade in Gang gesetzt. In Bezugnahme auf die Entstehung der Autoreaktivität bei MS lässt sich damit das intrinsische Entstehungsmodell unterstützen [31]. Durch die Interaktion mit nicht ZNS-spezifischen Th-Zellen, zum Beispiel im Rahmen einer EBV-Erkrankung, werden Astrozyten aktiviert. Die damit einhergehende Hochregulation proinflammatorischer Zytokine und weiterer Aktivierungsmarker, wie iNOS, initiiert die Zerstörung zentralnervösen Gewebes und somit die Freisetzung von ZNS-spezifischen Antigenen.

#### **5.4 Conclusio**

Insgesamt ist festzuhalten, dass murine, kortikale Astrozyten sowohl auf Reize aus dem Inflammationsprofil von Th1- als auch von Th17-Zellen reagieren können und mit der Hochregulation unterschiedlicher Moleküle die Inflammation initiieren und aufrechterhalten. Dies geschieht auch ohne die zusätzliche Co-Stimulation mit weiteren Zellen, wie zum Beispiel Mikroglia. Bereits die direkte Interaktion zwischen Astrozyten und Th-Zellen, sei es über Zell-Zell-Kontakt oder Sekretion, führt zur Einleitung eines reaktiven Habitus bei Astrozyten. Über die in der akuten Phase bestehende Hochregulation von Adhäsionsmolekülen nach Interaktion mit vor allem Th1-Zellen kann der Influx von weiteren Th-Zellen beeinflusst werden, was zur Kumulierung der Immunzellen im ZNS führen kann. Die zusätzlich hochregulierte mRNA für unterschiedliche Zytokine und weitere proinflammatorische Moleküle führt zur Aufrechterhaltung der entzündlichen Kaskade. Astrozyten tragen somit einen großen Teil zur Initiierung der Inflammation und Autoreaktivität bei, die bei MS zur Zerstörung zentralnervösen Gewebes und damit einhergehender progredienter Beeinträchtigung der Betroffenen führt.

## 6 Zusammenfassung

Die Pathogenese von MS ist in ihren genauen Abläufen bis heute noch ungeklärt. Eine Vielzahl an Zellen beeinflusst sich gegenseitig und führt zu den am Ende für die MS charakteristischen lokal begrenzten Läsionen im ZNS [25]. Dass Astrozyten als residente Zellen des ZNS zum pathologischen Geschehen beitragen, ist im Vergleich zur allgemeinen Forschung an MS eine junge Erkenntnis und bringt noch einige ungeklärte Fragen mit sich. Astrozyten weisen eine hohe Heterogenität auf, stehen mit vielen weiteren Zellarten über ihre Ausläufer in Kontakt, erfüllen bereits im Physiologischen eine Vielzahl an Aufgaben zur Aufrechterhaltung der Homöostase im ZNS und sind unter pathologischen Reizen extrem wandelbar [152]. Ein Großteil der Forschung zu Reaktivität von Astrozyten als Antwort auf toxische Reize bezieht sich auf allgemeine pathologische oder inflammatorische Reize wie Ischämie, bakterielle Endotoxine wie LPS oder aber einzelne inflammatorische Zytokine [58, 152]. Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden astrozytäre Reaktionen auf die Interaktion mit Th1- und Th17-vermittelte Neuroinflammation untersucht. Bisherige Untersuchungen zur direkten Interaktion zwischen Astrozyten und Th-Zellen und deren Auswirkung auf die Reaktivität von Astrozyten wurden in der Literaturrecherche zu dieser Arbeit nur marginal beschrieben. Astrozyten tragen über die Freisetzung pro- und antiinflammatorischer Botenstoffe sowie die Expression von Adhäsionsmolekülen an der Aufrechterhaltung und Modulation der Neuroinflammation entscheidend bei. Durch mRNA-Untersuchungen von kortikalen Astrozytenkulturen konnte gezeigt werden, dass Astrozyten sensibel auf die Stimulation mit Reizen aus dem Inflammationsprofil von Th1- und Th17-Zellen reagieren, ohne zusätzliche Co-Stimulation über zum Beispiel Mikroglia. Eine zusätzliche Erkenntnis war, dass die Antigenspezifität der verwendeten Th-Zellen für die Interaktion und Stimulation von Astrozyten keine entscheidende Rolle spielt. Dabei zeigten Astrozyten ein heterogenes Antwortverhalten auf die unterschiedlichen inflammatorischen Stimuli, was die untersuchten Zytokine und Aktivierungsmarker betrifft. In Hinblick auf die Expression von Adhäsionsmolekülen zeigte sich bei der mRNA-Expression von kortikalen Astrozytenkulturen ein deutlich verstärktes Antwortverhalten auf die Stimulation aus dem Th1-vermittelten Inflammationsprofil. Auch die in-vivo-Daten aus einer Transfer-EAE zeigten nach der Analyse mittels Durchflusszytometrie eine vermehrte Expression der Adhäsionsmoleküle in der akuten Phase der Erkrankung, wenn Th1-Zellen zur Induktion verwendet wurden. Die Expression nahm mit zunehmender Chronifizierung der Erkrankung ab. Besonders schwer erkrankte Tiere zeigten ebenfalls eine Mehrexpression der Adhäsionsmoleküle, was eine mögliche Korrelation zwischen dem Erkrankungsgrad und dem über Astrozyten vermittelten Influx von Th-Zellen darstellt. Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass Astrozyten über die Interaktion mit Th1- und Th17-Zellen in ein reaktives Stadium wechseln und damit die Pathogenese der Multiplen Sklerose beziehungsweise EAE bereits in einem frühen Stadium der Erkrankung entscheidend mit beeinflussen.

## 7 Literaturverzeichnis

1. Liddel SA, Barres BA (2017) Reactive Astrocytes: Production, Function, and Therapeutic Potential. *Immunity* 46:957–967
2. Ponath G, Park C, Pitt D (2018) The Role of Astrocytes in Multiple Sclerosis. *Front Immunol* 9:217
3. Ponath G, Park C, Pitt D (2018) The Role of Astrocytes in Multiple Sclerosis. *Front Immunol* 9:1
4. Ding Z-B, Song L-J, Wang Q, Kumar G, Yan Y-Q, Ma C-G (2021) Astrocytes: a double-edged sword in neurodegenerative diseases. *Neural Regen Res* 16:1702–1710
5. Fletcher JM, Lalor SJ, Sweeney CM, Tubridy N, Mills KHG (2010) T cells in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *Clin Exp Immunol* 162:1
6. Nemoto EM, Frinak S (1981) Brain Tissue pH after global brain ischemia and barbiturate loading in rats. *Stroke* 12:77–82
7. Weinstein DE (1997) Isolation and Purification of Primary Rodent Astrocytes. *Curr Protoc Neurosci* 00:3.5.1-3.5.9
8. Durrant CS (2020) Preparation of organotypic hippocampal slice cultures for the study of CNS disease and damage. In: *Methods in Molecular Biology*. Humana Press Inc., pp 133–144
9. Healy S, McMahon J, Fitzgerald U (2018) Seeing the wood for the trees: Towards improved quantification of glial cells in central nervous system tissue. *Neural Regen Res* 13:1520–1523
10. McLendon RE, Bigner DD (1994) Immunohistochemistry of the Glial Fibrillary Acidic Protein: Basic and Applied Considerations. In: *Brain Pathology*. pp 221–228
11. Refaeli R, Doron A, Benmelech-Chovav A, Groysman M, Kreisel T, Loewenstein Y, Goshen I (2021) Features of hippocampal astrocytic domains and their spatial relation to excitatory and inhibitory neurons. *Glia* 69:2378–2390
12. Domingues HS, Mues M, Lassmann H, Wekerle H, Krishnamoorthy G (2010) Functional and pathogenic differences of Th1 and Th17 cells in experimental autoimmune encephalomyelitis. *PLoS One* 5:e15531–e15531
13. Loos J, Schmaul S, Noll TM, Paterka M, Schillner M, Löffel JT, Zipp F, Bittner S (2020) Functional characteristics of Th1, Th17, and ex-Th17 cells in EAE revealed by intravital two-photon microscopy. *J Neuroinflammation* 17:357
14. Middeldorp J, Hol EM (2011) GFAP in health and disease. *Prog Neurobiol* 93:421–443
15. Molofsky AV, Deneen B (2015) Astrocyte development: A Guide for the Perplexed. *Glia* 63:1320–1329
16. Hemmer B (2021) Diagnose und Therapie der Multiplen Sklerose, Neuromyelitis-optica-Spektrum-Erkrankungen und MOG-IgG-assoziierten Erkrankungen Entwicklungsstufe: S2k Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie. [https://www.awmf.org/uploads/tx\\_szleitlinien/030-050l\\_S2e\\_Diagnose-Therapie-Multiplen-Sklerose-Neuromyelitis-Optica-Spektrum-MOG-IgG-assoziierte\\_Erkrankungen\\_2021-05\\_1-verlaengert.pdf](https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/030-050l_S2e_Diagnose-Therapie-Multiplen-Sklerose-Neuromyelitis-Optica-Spektrum-MOG-IgG-assoziierte_Erkrankungen_2021-05_1-verlaengert.pdf). Accessed 12 May 2022
17. Reich DS, Lucchinetti CF, Calabresi PA (2018) Multiple Sclerosis. *New England Journal of Medicine* 378:169–180

18. Browne P, Chandraratna D, Angood C, Tremlett H, Baker C, Taylor B v, Thompson AJ (2014) Atlas of Multiple Sclerosis 2013: A growing global problem with widespread inequity. *Neurology* 83:1022–1024
19. Coles A (2009) Multiple sclerosis. *Pract Neurol* 9:118–126
20. (2020) Mapping multiple sclerosis around the world key epidemiology findings Atlas of MS 3 rd edition. [www.atlasofms.org](http://www.atlasofms.org).
21. Weinshenker BG, Bass B, Rice GPA, Noseworthy J, Carriere W, Baskerville J, Ebers GC (1989) The natural history of Multiple Sclerosis: A geographically based study 2. Predictive value of the early clinical course. *Brain* 112:1419–1428
22. Koch-Henriksen N, Magyari M (2021) Apparent changes in the epidemiology and severity of multiple sclerosis. *Nat Rev Neurol* 17:676–688
23. Dua T, Rompani P, World Health O, Multiple Sclerosis International F (2008) Atlas [electronic resource] : multiple sclerosis resources in the world, 2008. 51 p.
24. Sadovnick AD, Dircks A, Ebers GC (1999) Genetic counselling in multiple sclerosis, risks to sibs and children of affected individuals. *Clin Genet* 56:118–122
25. Thompson AJ, Baranzini SE, Geurts J, Hemmer B, Ciccarelli O (2018) Multiple sclerosis. *The Lancet* 391:1622–1636
26. Lublin FD, Reingold SC (1996) Defining the clinical course of multiple sclerosis: Results of an international survey. *Neurology* 46:907–911
27. Luessi F, Siffrin V, Zipp F (2012) Neurodegeneration in multiple sclerosis: novel treatment strategies. *Expert Rev Neurother* 12:1061–1077
28. Trapp BD, Peterson J, Ransohoff RM, Rudick R, Mörk S, Bö L (1998) Axonal Transection in the Lesions of Multiple Sclerosis. *New England Journal of Medicine* 338:278–285
29. Vercellino M, Plano F, Votta B, Mutani R, Giordana MT, Cavalla P (2005) Grey Matter Pathology in Multiple Sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol* 64:1101–1107
30. Kidd D, Barkhof F, McConnell R, Algra PR, Allen I v., Revesz T (1999) Cortical lesions in multiple sclerosis. *Brain* 122:17–26
31. Hemmer B, Archelos JJ, Hartung HP (2002) New concepts in the immunopathogenesis of multiple sclerosis. *Nat Rev Neurosci* 3:291–301
32. Lucchinetti C, Brück W, Parisi J, Scheithauer B, Rodriguez M, Lassmann H (2000) Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: Implications for the pathogenesis of demyelination. *Ann Neurol* 47:707–717
33. Barnett MH, Prineas JW (2004) Relapsing and Remitting Multiple Sclerosis: Pathology of the Newly Forming Lesion. *Ann Neurol* 55:458–468
34. Glatigny S, Bettelli E (2018) Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE) as Animal Models of Multiple Sclerosis (MS). *Cold Spring Harb Perspect Med* 8:a028977
35. Frohman EM, Racke MK, Raine CS (2006) Multiple Sclerosis — The Plaque and Its Pathogenesis. *New England Journal of Medicine* 354:942–955
36. Gran B, Hemmer B, Vergelli M, McFarland HF, Martin R (1999) Molecular mimicry and multiple sclerosis: Degenerate T-cell recognition and the induction of autoimmunity. *Ann Neurol* 45:559–567
37. Engelhardt B (2006) Molecular mechanisms involved in T cell migration across the blood-brain barrier. *J Neural Transm* 113:477–485

38. Engelhardt B, Ransohoff RM (2012) Capture, crawl, cross: The T cell code to breach the blood-brain barriers. *Trends Immunol* 33:579–589
39. Gold R, Wolinsky JS (2011) Pathophysiology of multiple sclerosis and the place of teriflunomide. *Acta Neurol Scand* 124:75–84
40. Prineas JW, Lee S (2019) Multiple sclerosis: Destruction and regeneration of astrocytes in acute lesions. *J Neuropathol Exp Neurol* 78:140–156
41. Montalban X, Gold R, Thompson AJ, et al (2018)ECTRIMS/EAN guideline on the pharmacological treatment of people with multiple sclerosis. *25:215–237*
42. Ullmann M, Clerosis S, Ohn J, Oseworthy HN, Laudia C, Uccinetti L, Oses M, Odriguez R, Einshenker GW (2000) The New England Journal of Medicine. Review Article Medical Progress 938:
43. Noseworthy JH, Lucchinetti C, Rodriguez M, Weinshenker BG (2000) Multiple Sclerosis. *New England Journal of Medicine* 343:938–952
44. Rivers TM, Sprunt DH, Berry GP (1933) OBSERVATIONS ON ATTEMPTS TO PRODUCE ACUTE DISSEMINATED ENCEPHALOMYELITIS IN MONKEYS. *J Exp Med* 58:39–52
45. Kipp M, van der Star B, Vogel DYS, Puentes F, van der Valk P, Baker D, Amor S (2012) Experimental in vivo and in vitro models of multiple sclerosis: EAE and beyond. *Mult Scler Relat Disord* 1:15–28
46. Constantinescu CS, Farooqi N, O'Brien K, Gran B (2011) Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) as a model for multiple sclerosis (MS). *Br J Pharmacol* 164:1079
47. Krishnamoorthy G, Wekerle H (2009) EAE: An immunologist's magic eye. *Eur J Immunol* 39:2031–2035
48. Furtado GC, Marcondes MCG, Latkowski J-A, Tsai J, Wensky A, Lafaille JJ (2008) Swift Entry of Myelin-Specific T Lymphocytes into the Central Nervous System in Spontaneous Autoimmune Encephalomyelitis. *J Immunol* 181:4648
49. Bittner S, Afzali AM, Wiendl H, Meuth SG (2014) Myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG35-55) induced experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) in C57BL/6 mice. *J Vis Exp* 51275
50. Jäger A, Dardalhon V, Sobel RA, Bettelli E, Kuchroo VK (2009) Th1, Th17 and Th9 effector cells induce experimental autoimmune encephalomyelitis with different pathological phenotypes. *J Immunol* 183:7169
51. Tanaka Y, Arima Y, Higuchi K, Ohki T, Elfeky M, Ota M, Kamimura D, Murakami M (2017) EAE Induction by Passive Transfer of MOG-specific CD4(+) T Cells. *Bio Protoc* 7:e2370–e2370
52. McPherson RC, Cambrook HE, O'Connor RA, Anderton SM (2014) Induction of Passive EAE Using Myelin-Reactive CD4+ T Cells. *Methods in Molecular Biology* 1193:187–198
53. Robinson AP, Harp CT, Noronha A, Miller SD (2014) The experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) model of MS: utility for understanding disease pathophysiology and treatment. *Handb Clin Neurol* 122:173
54. Zamvil S, Nelson P, Trotter J, Mitchell D, Knobler R, Fritz R, Steinman L (1985) T-cell clones specific for myelin basic protein induce chronic relapsing paralysis and demyelination. *Nature* 1985 317:6035 317:355–358



55. Rangachari M, Kuchroo VK (2013) Using EAE to better understand principles of immune function and autoimmune pathology. *J Autoimmun* 45:31
56. Aharoni R, Eilam R, Arnon R (2021) Astrocytes in Multiple Sclerosis-Essential Constituents with Diverse Multifaceted Functions. *Int J Mol Sci* 22:5904
57. Guttenplan KA, Liddel SA (2019) Astrocytes and microglia: Models and tools. *J Exp Med* 216:71–83
58. Liddel SA, Guttenplan KA, Clarke LE, et al (2017) Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. *Nature* 541:481–487
59. Hu X, Yuan Y, Wang D, Su Z (2016) Heterogeneous astrocytes: Active players in CNS. *Brain Res Bull* 125:1–18
60. Virchow R (1856) *Gesammelte Abhandlungen zur wissenschaftlichen Medicin*. Verlag von Meidzinger Sohn & Comp., Frankfurt A.M., Frankfurt am Main
61. Verkhratsky A, Zorec R, Parpura V (2017) Stratification of astrocytes in healthy and diseased brain. *Brain Pathology* 27:629–644
62. Bugiani M, Plug BC, Man JHK, Breur M, van der Knaap MS (2022) Heterogeneity of white matter astrocytes in the human brain. *Acta Neuropathol* 143:159–177
63. Bayraktar OA, Fuentealba LC, Alvarez-Buylla A, Rowitch DH (2015) Astrocyte development and heterogeneity. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 7:a020362–a020362
64. Sofroniew M v, Vinters H v (2010) Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol* 119:7–35
65. Theis M, Söhl G, Eiberger J, Willecke K (2005) Emerging complexities in identity and function of glial connexins. *Trends Neurosci* 28:188–195
66. Larsen BR, Assentoft M, Cotrina ML, Hua SZ, Nedergaard M, Kaila K, Voipio J, MacAulay N (2014) Contributions of the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase, NKCC1, and Kir4.1 to hippocampal K<sup>+</sup> clearance and volume responses. *Glia* 62:608–622
67. Chever O, Djukic B, McCarthy KD, Amzica F (2010) Implication of Kir4.1 channel in excess potassium clearance: An in vivo study on anesthetized glial-conditional Kir4.1 knock-out mice. *Journal of Neuroscience* 30:15769–15777
68. Kettenmann H, Backus KH, Schachner M (1987)  $\gamma$ -Aminobutyric acid opens Cl<sup>-</sup> channels in cultured astrocytes. *Brain Res* 404:1–9
69. Allen A, Messier C (2013) Plastic changes in the astrocyte GLUT1 glucose transporter and beta-tubulin microtubule protein following voluntary exercise in mice. *Behavioural Brain Research* 240:95–102
70. Noriega-Prieto JA, Araque A (2021) Sensing and Regulating Synaptic Activity by Astrocytes at Tripartite Synapse. *Neurochem Res* 46:2580–2585
71. Minelli A, Brecha NC, Karschin C, DeBiasi S, Conti F (1995) GAT-1, a high-affinity GABA plasma membrane transporter, is localized to neurons and astroglia in the cerebral cortex. *Journal of Neuroscience* 15:7734–7746
72. Schroeter S, Apparsundaram S, Wiley RG, Miner LH, Sesack SR, Blakely RD (2000) Immunolocalization of the cocaine- and antidepressant-sensitive I-norepinephrine transporter. *J Comp Neurol* 420:211–232
73. Kucukdereli H, Allen NJ, Lee AT, et al (2011) Control of excitatory CNS synaptogenesis by astrocyte-secreted proteins hevin and SPARC. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:E440

74. Pfrieder FW (2010) Role of glial cells in the formation and maintenance of synapses. *Brain Res Rev* 63:39–46
75. Attwell D, Buchan AM, Charkpak S, Lauritzen M, MacVicar BA, Newman EA (2010) Glial and neuronal control of brain blood flow. *Nature* 468:232–243
76. Iadecola C, Nedergaard M (2007) Glial regulation of the cerebral microvasculature. *Nat Neurosci* 10:1369–1376
77. Wang DD, Bordey A (2008) The astrocyte odyssey. *Prog Neurobiol* 86:342–367
78. Reid JK, Kuipers HF (2021) She Doesn't Even Go Here: The Role of Inflammatory Astrocytes in CNS Disorders. *Front Cell Neurosci* 15:704884
79. Escartin C, Galea E, Lakatos A, et al (2021) Reactive astrocyte nomenclature, definitions, and future directions. *Nat Neurosci* 24:312–325
80. Rindfleisch E (1863) Histologisches Detail zu der grauen Degeneration von Gehirn und Rückenmark. (Zugleich ein Beitrag zu der Lehre von der Entstehung und Verwandlung der Zelle.). *Archiv für Pathologische Anatomie und Physiologie und für Klinische Medicin* 26:474–483
81. Pape K, Tamouza R, Leboyer M, Zipp F (2019) Immunoneuropsychiatry — novel perspectives on brain disorders. *Nat Rev Neurol* 15:317–328
82. Hasel P, Liddel SA (2021) Astrocytes. *Current Biology* 31:R326–R327
83. Brosnan CF, Raine CS (2013) The astrocyte in multiple sclerosis revisited. *Glia* 61:453–465
84. Lee SJ, Benveniste EN (1999) Adhesion molecule expression and regulation on cells of the central nervous system. *J Neuroimmunol* 98:77–88
85. Chao CC, Lokensgard JR, Sheng WS, Hu S, Peterson PK (1997) IL-1-induced iNOS expression in human astrocytes via NF- $\kappa$ B. *Neuroreport* 8:3163–3166
86. Falsig J, Porzgen P, Lund S, Schratzenholz A, Leist M (2006) The inflammatory transcriptome of reactive murine astrocytes and implications for their innate immune function. *J Neurochem* 96:893–907
87. Anderson MA, Burda JE, Ren Y, Ao Y, O'Shea TM, Kawaguchi R, Coppola G, Khakh BS, Deming TJ, Sofroniew M v (2016) Astrocyte scar formation aids central nervous system axon regeneration. *Nature* 532:195
88. Voskuhl RR, Peterson RS, Song B, Ao Y, Morales LB, Tiwari-Woodruff S, Sofroniew M v (2009) Reactive astrocytes form scar-like perivascular barriers to leukocytes during adaptive immune inflammation of the CNS. *J Neurosci* 29:11511–11522
89. Bush TG, Puvanachandra N, Horner CH, Polito A, Ostenfeld T, Svendsen CN, Mucke L, Johnson MH, Sofroniew M v (1999) Leukocyte Infiltration, Neuronal Degeneration, and Neurite Outgrowth after Ablation of Scar-Forming, Reactive Astrocytes in Adult Transgenic Mice. *Neuron* 23:297–308
90. Palle P, Monaghan KL, Milne SM, Wan ECK (2017) Cytokine Signaling in Multiple Sclerosis and Its Therapeutic Applications. *Medical Sciences* 5:23
91. Brosnan CF, Cannella B, Battistini L, et al (1995) Cytokine localization in multiple sclerosis lesions: Correlation with adhesion molecule expression and reactive nitrogen species. *Neurology* 45:S16–S21
92. Ganesan P, Shanmugam P, Sattar SBA, Shankar SL (2016) Evaluation of IL-6, CRP and hs-CRP as Early Markers of Neonatal Sepsis. *J Clin Diagn Res* 10:DC13–DC17

93. Sheppard M, Laskou F, Stapleton PP, Hadavi S, Dasgupta B (2017) Tocilizumab (Actemra). *Hum Vaccin Immunother* 13:1972–1988
94. Vadodaria KC, Mendes APD, Mei A, et al (2021) Altered Neuronal Support and Inflammatory Response in Bipolar Disorder Patient-Derived Astrocytes. *Stem Cell Reports* 16:825–835
95. Savarin C, Hinton DR, Valentin-Torres A, Chen Z, Trapp BD, Bergmann CC, Stohlman SA (2015) Astrocyte response to IFN-gamma limits IL-6-mediated microglia activation and progressive autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroinflammation*. <https://doi.org/10.1186/s12974-015-0293-9>
96. van Wagoner NJ, Oh J-W, Repovic P, Benveniste EN (1999) Interleukin-6 (IL-6) Production by Astrocytes: Autocrine Regulation by IL-6 and the Soluble IL-6 Receptor. *The Journal of Neuroscience* 19:5236
97. Maimone D, Guazzi GC, Annunziata P (1997) IL-6 detection in multiple sclerosis brain. *J Neurol Sci* 146:59–65
98. Gruol DL, Nelson TE (1997) Physiological and pathological roles of interleukin-6 in the central nervous system. *Mol Neurobiol* 15:307–339
99. Schwaninger M, Petersen N, Prinz S, Sallmann S, Neher M, Spranger M (2000) Adenosine-induced expression of interleukin-6 in astrocytes through protein kinase A and NF-IL-6. *Glia* 31:51–58
100. Burmeister AR, Marriott I (2018) The interleukin-10 family of cytokines and their role in the CNS. *Front Cell Neurosci* 12:458
101. Wang K, Song F, Fernandez-Escobar A, Luo G, Wang JH, Sun Y (2018) The Properties of Cytokines in Multiple Sclerosis: Pros and Cons. *American Journal of the Medical Sciences* 356:552–560
102. van Boxel-Dezaire AHH, Hoff SCJ, van Oosten BW, Verweij CL, Dräger AM, Adèr HJ, van Houwelingen JC, Barkhof F, Polman CH, Nagelkerken L (1999) Decreased interleukin-10 and increased interleukin-12p40 mRNA are associated with disease activity and characterize different disease stages in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 45:695–703
103. Slavin AJ, Maron R, Weiner HL (2001) Mucosal administration of IL-10 enhances oral tolerance in autoimmune encephalomyelitis and diabetes. *Int Immunol* 13:825–833
104. Constantinescu CS, Tani M, Ransohoff RM, et al (2005) Astrocytes as antigen-presenting cells: expression of IL-12/IL-23. *J Neurochem* 95:331–340
105. Nitsch L, Petzinna S, Zimmermann J, Schneider L, Krauthausen M, Heneka MT, Getts DR, Becker A, Müller M (2021) Astrocyte-specific expression of interleukin 23 leads to an aggravated phenotype and enhanced inflammatory response with B cell accumulation in the EAE model. *J Neuroinflammation* 18:101
106. Nitsch L, Zimmermann J, Krauthausen M, et al (2019) CNS-Specific Synthesis of Interleukin 23 Induces a Progressive Cerebellar Ataxia and the Accumulation of Both T and B Cells in the Brain: Characterization of a Novel Transgenic Mouse Model. *Mol Neurobiol* 56:7977–7993
107. Wen SR, Liu GJ, Feng RN, Gong FC, Zhong H, Duan SR, Bi S (2012) Increased levels of IL-23 and osteopontin in serum and cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients. *J Neuroimmunol* 244:94–96

108. Komuczki J, Tuzlak S, Friebel E, et al (2019) Fate-Mapping of GM-CSF Expression Identifies a Discrete Subset of Inflammation-Driving T Helper Cells Regulated by Cytokines IL-23 and IL-1 $\beta$ . *Immunity* 50:1289-1304.e6
109. Lee SC, Liu W, Brosnan CF, Dickson DW (1994) GM-CSF promotes proliferation of human fetal and adult microglia in primary cultures. *Glia* 12:309–318
110. Azzolini F, Gilio L, Pavone L, et al (2022) Neuroinflammation Is Associated with GFAP and sTREM2 Levels in Multiple Sclerosis. *Biomolecules* 12:222
111. Traugott U (1987) Multiple sclerosis: relevance of Class I and Class II MHC-expressing cells to lesion development. *J Neuroimmunol* 16:283–302
112. Bombeiro AL, Hell RCR, Simões GF, Castro MV de, Oliveira ALR de (2017) Importance of major histocompatibility complex of class I (MHC-I) expression for astroglial reactivity and stability of neural circuits in vitro. *Neurosci Lett* 647:97–103
113. Aktan F (2004) iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation. *Life Sci* 75:639–653
114. Bogdan C (2001) Nitric oxide and the immune response. *Nat Immunol* 2:907–916
115. Islam MT (2016) Oxidative stress and mitochondrial dysfunction-linked neurodegenerative disorders. *Neurol Res* 39:73–82
116. Duncan AJ, Heales SJR (2005) Nitric oxide and neurological disorders. *Mol Aspects Med* 26:67–96
117. Kunkl M, Frasca S, Amormino C, Volpe E, Tuosto L (2020) T Helper Cells: The Modulators of Inflammation in Multiple Sclerosis. *Cells*. <https://doi.org/10.3390/cells9020482>
118. Xie L, Yang S-H (2015) INTERACTION OF ASTROCYTES AND T CELLS IN PHYSIOLOGICAL AND PATHOLOGICAL CONDITIONS. *Brain Res* 1623:64–73
119. Goverman J (2009) Autoimmune T cell responses in the central nervous system. *Nat Rev Immunol* 9:393–407
120. Prajeeth CK, Kronisch J, Khorooshi R, et al (2017) Effectors of Th1 and Th17 cells act on astrocytes and augment their neuroinflammatory properties. *J Neuroinflammation* 14:204
121. Luo J, Ho P, Steinman L, Wyss-Coray T (2008) Bioluminescence in vivo imaging of autoimmune encephalomyelitis predicts disease. *J Neuroinflammation* 5:6
122. Brambilla R, Morton PD, Ashbaugh JJ, Karmally S, Lambertsen KL, Bethea JR (2014) Astrocytes play a key role in EAE pathophysiology by orchestrating in the CNS the inflammatory response of resident and peripheral immune cells and by suppressing remyelination. *Glia*. <https://doi.org/10.1002/glia.22616>
123. Eikelenboom MJ, Killestein J, Izeboud T, Kalkers NF, Baars PA, van Lier RAW, Barkhof F, Uitdehaag BMJ, Polman CH (2005) Expression of adhesion molecules on peripheral lymphocytes predicts future lesion development in MS. *J Neuroimmunol* 158:222–230
124. Springer TA (1990) Adhesion receptors of the immune system. *Nature* 346:425–434
125. Ransohoff RM (1999) Mechanisms of inflammation in MS tissue: Adhesion molecules and chemokines. *J Neuroimmunol* 98:57–68
126. Cannella B, Raine CS (1995) The adhesion molecule and cytokine profile of multiple sclerosis lesions. *Ann Neurol* 37:424–435

127. Ukkonen M, Wu X, Reipert B, Dastidar P, Elovaara I (2007) Cell surface adhesion molecules and cytokine profiles in primary progressive multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis* 13:701–707
128. Etzioni A (1996) Adhesion molecules - Their role in health and disease. *Pediatr Res* 39:191–198
129. Liddelow S, Hoyer D (2016) Astrocytes: Adhesion Molecules and Immunomodulation. *Curr Drug Targets* 17:1871–1881
130. Williams JL, Manivasagam S, Smith BC, Sim J, Vollmer LL, Daniels BP, Russell JH, Klein RS (2020) Astrocyte-T cell crosstalk regulates region-specific neuroinflammation. *Glia* 68:1361–1374
131. Müller N (2019) The role of intercellular adhesion molecule-1 in the pathogenesis of psychiatric disorders. *Front Pharmacol*. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.01251>
132. Bullard DC, Hu X, Schoeb TR, Collins RG, Beaudet AL, Barnum SR (2007) Intercellular Adhesion Molecule-1 Expression Is Required on Multiple Cell Types for the Development of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *The Journal of Immunology* 178:851–857
133. Ding Y bin, Chen GY, Xia JG, Zang XW, Yang HY, Yang L (2003) Association of VCAM-1 overexpression with oncogenesis, tumor angiogenesis and metastasis of gastric carcinoma. *World J Gastroenterol* 9:1409–1414
134. Khoy K, Mariotte D, Defer G, Petit G, Toutirais O, le Mauff B (2020) Natalizumab in Multiple Sclerosis Treatment: From Biological Effects to Immune Monitoring. *Front Immunol* 11:549842
135. Svingen T, Letting H, Hadrup N, Hass U, Vinggaard AM (2015) Selection of reference genes for quantitative RT-PCR (RT-qPCR) analysis of rat tissues under physiological and toxicological conditions. *PeerJ* 3:e855–e855
136. Shinkai Y, Rathbun OGary, Lam KP, et al (1992) RAG-2-deficient mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate V(D)J rearrangement. *Cell* 68:855–867
137. Bettelli E, Pagany M, Weiner HL, Linington C, Sobel RA, Kuchroo VK (2003) Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein-specific T Cell Receptor Transgenic Mice Develop Spontaneous Autoimmune Optic Neuritis. *The Journal of Experimental Medicine J Exp Med* □ The 197:1073–1081
138. Cossarizza A, Chang HD, Radbruch A, et al (2019) Guidelines for the use of flow cytometry and cell sorting in immunological studies (second edition). *Eur J Immunol* 49:1457
139. Zhang H-Y, Wang Y, He Y, et al (2020) A1 astrocytes contribute to murine depression-like behavior and cognitive dysfunction, which can be alleviated by IL-10 or fluorocitrate treatment. *J Neuroinflammation* 17:200
140. He Y, Lin LJ, Zheng CQ, Jin Y, Lin Y (2012) Cytokine expression and the role of Th17 cells in a mouse model of colitis. *Mol Med Rep* 6:1438–1442
141. Guerrero-García JJ (2020) Participación de los astrocitos en la patogénesis de la esclerosis múltiple. *Neurología* 35:400–408
142. Prajeeth CK, Dittrich-Breiholz O, Talbot SR, Robert PA, Huehn J, Stangel M (2018) IFN- $\gamma$  Producing Th1 Cells Induce Different Transcriptional Profiles in Microglia and Astrocytes. *Front Cell Neurosci* 12:352
143. Iadecola C, Nedergaard M (2007) Glial regulation of the cerebral microvasculature. *Nat Neurosci*. <https://doi.org/10.1038/nn2003>

144. Prajeeth CK, Kronisch J, Khoroshi R, et al (2017) Effectors of Th1 and Th17 cells act on astrocytes and augment their neuroinflammatory properties. *J Neuroinflammation* 14:204
145. Shan K, Pang R, Zhao C, Liu X, Gao W, Zhang J, Zhao D, Wang Y, Qiu W (2017) IL-17-triggered downregulation of miR-497 results in high HIF-1 $\alpha$  expression and consequent IL-1 $\beta$  and IL-6 production by astrocytes in EAE mice. *Cell Mol Immunol* 14:909–923
146. Ma X, Reynolds SL, Baker BJ, Li X, Benveniste EN, Qin H (2010) IL-17 Enhancement of the IL-6 Signaling Cascade in Astrocytes. *The Journal of Immunology* 184:4898–4906
147. Hulshof S, Montagne L, de Groot CJA, van der Valk P (2002) Cellular localization and expression patterns of interleukin-10, interleukin-4, and their receptors in multiple sclerosis lesions. *Glia* 38:24–35
148. Ledebøer A, Brevé JJP, Wierinckx A, van der Jagt S, Bristow AF, Leysen JE, Tilders FJH, van Dam AM (2002) Expression and regulation of interleukin-10 and interleukin-10 receptor in rat astroglial and microglial cells. *European Journal of Neuroscience* 16:1175–1185
149. Nitsch L, Petzinna S, Zimmermann J, Getts DR, Becker A, Müller M (2022) MOG-Specific T Cells Lead to Spontaneous EAE with Multilocular B Cell Infiltration in the GF-IL23 Model. *Neuromolecular Med* 1:3
150. Wheeler MA, Clark IC, Tjon EC, et al (2020) MAFG-driven astrocytes promote CNS inflammation. *Nature* 578:593–599
151. Tardy M, Fages C, le Prince G, Rolland B, Nunez J (1990) Regulation of the glial fibrillary acidic protein (GAFP) and of its encoding mRNA in the developing brain and in cultured astrocytes. In: *Adv Exp Med Biol*. Springer, Boston, MA, pp 41–52
152. Hasel P, Rose IVL, Sadick JS, Kim RD, Liddel SA (2021) Neuroinflammatory astrocyte subtypes in the mouse brain. *Nat Neurosci* 24:1475–1487
153. Arellano G, Ottum PA, Reyes LI, Burgos PI, Naves R (2015) Stage-specific role of interferon-gamma in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Front Immunol* 6:29