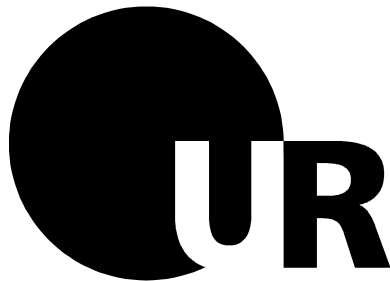


**Identifizierung von CCR6 als Marker für
Th17 Zellen bei der Infekt-Abwehr und
Autoimmunerkrankungen**



**Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der
Naturwissenschaften (Dr.rer.nat.) der
naturwissenschaftlichen Fakultät III der Universität
Regensburg**

**vorgelegt von
Johann Pötzl aus Regensburg
November 2008**

Diese Dissertation entstand im Zeitraum von November 2005 bis November 2008 unter der Anleitung von Frau Prof. Dr. Daniela N. Männel, Institut für Immunologie der Universität Regensburg.

Promotionsgesuch eingereicht am: 24.11.2008

Kolloquium abgehalten am: 20.01.2009

Die Arbeit wurde angeleitet von: PD Dr. Werner Kremer
Prof. Dr. Daniela N.Männel

Prüfungsausschuss: Prof. Dr. Wirth (Vorsitz)
PD Dr. Kremer
Prof. Dr. Daniela N. Männel
Prof. Dr. Warth

Eidesstattliche Erklärung:

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe des Literaturzitats gekennzeichnet.

Regensburg, den

.....

(Johann Pötzl)

Für meine Frau

Der höchste Lohn für unsere Bemühungen ist nicht das, was wir dafür bekommen, sondern das, was wir dadurch werden.

John Ruskin (1819-1900)

Inhalt

1. Einleitung.....	10
1.1 Regulation der Immunantwort – ein Überblick	10
1.2 T Helfer-Zell-Differenzierung	11
1.2.1 T Helfer-Zell-Subpopulationen.....	11
1.2.2 Th17 Zellen – eine neue Subpopulation von Th Zellen	13
1.3 Migration von T-Zellen.....	14
1.4 Chemokine und ihre Rezeptoren.....	15
1.4.1 Chemokine	15
1.4.1.1 Funktion und Aufbau von Chemokinen.....	15
1.4.1.2 Das Chemokin CCL20.....	16
1.4.2 Chemokinrezeptoren	17
1.4.2.1 Aufbau und Signaltransduktion von Chemokinrezeptoren	17
1.4.2.2 Der Chemokinrezeptor CCR6.....	17
1.4.2.3 Die Einteilung von Th Zellpopulationen mittels Chemokinrezeptoren	18
1.5 Die Multiple Sklerose und ihr Mausmodell Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis	20
1.5.1 Prävalenz und Ätiologie von Multipler Sklerose	20
1.5.2 Kurze Zusammenfassung der Immunologie von MS.....	20
1.5.3 Die Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis als Modellerkrankung für MS.....	21
1.6 Chronischer Stress als Ursache und Verstärker von chronischen Erkrankungen... 22	
1.6.1 Terminologie und Arten von Stress.....	22
1.6.2 Akuter Stress.....	23
1.6.3 Chronischer Stress	24
1.7 Zielsetzung der Arbeit	25
2. Material und Methoden	26
2.1 Material	26
2.1.1 Versuchstiere	26
2.1.2 Chemikalien und Reagenzien.....	27
2.1.3 Puffer und Lösungen	28
2.1.4 Kits	29
2.1.5 Enzyme	29

2.1.6	Antikörper / Konjugate	30
2.1.7	Oligonukleotide.....	31
2.1.8	Verbrauchsmaterialien und Geräte	31
2.2	Methoden	33
2.2.1	Immunisierungen	33
2.2.2	Isolation von primären Lymphozyten	33
2.2.3	Isolation von Milzzellen.....	34
2.2.4	Isolation von Knochenmarkzellen	34
2.2.5	Isolation von Zellen aus dem Fuß.....	35
2.2.6	Bestimmung der Lebend-Zellzahl	35
2.2.7	Durchflusszytometrie	35
2.2.8	Intrazelluläre Markierung mit Antikörpern	36
2.2.9	Zellseparation.....	37
2.2.10	Polyklonale und antigenspezifische Stimulation von primären Mausszellen....	38
2.2.11	CFSE-Markierung von Zellen.....	38
2.2.12	<i>In vitro</i> Kultur von Knochenmarkzellen und Th17 Zellen	39
2.2.13	RNA-Präparation aus sortierten Zellen nach Macherey Nagel	39
2.2.14	Herstellung von cDNA und PCR	40
2.2.15	ELISA	42
2.2.16	BrdU Markierung von Zellen aus dem Fuß	42
2.2.17	Zelltransferversuche	42
2.2.18	Induktion einer EAE.....	43
2.2.19	Chronisch subordinierte Koloniehaltung	44
2.2.20	Analyse von peripheren Lymphknoten von CSC Mäusen	44
2.2.21	Statistik.....	45
3.	Ergebnisse.....	46
3.1	Phänotypisierung von CCR6-positiven Th Zellen während der Immunreaktion.....	46
3.1.1	Analyse CCR6-positiver Th Zellen während der Homöostase.....	46
3.1.1.1	Aktivierungsstatus CCR6-positiver und CCR6-negativer Th Zellen.....	46
3.1.1.2	Zytokinproduktion CCR6-positiver und CCR6-negativer Th Zellen	48
3.1.1.3	Weitergehende Phänotypisierung von Th17 Zellen	49

3.1.1.4	Expression von TLRs auf Th17 Zellen.....	53
3.1.2	CCR6 positive Th17 Zellen während der Immunantwort.....	54
3.1.2.1	Festlegung einer Impfstrategie	54
3.1.2.2	Anteil der Th17 Zellen im Lymphknoten während der Immunantwort.....	55
3.1.2.3	Aktivierungsstatus von CCR6-positiven und CCR6-negativen Th Zellen während der Immunantwort.....	56
3.1.2.4	Zytokinproduktion der unterschiedlichen Th Zell-Subpopulationen während der Immunantwort.....	58
3.1.3	Proliferationsfähigkeit von Th17 Zellen	62
3.2	<i>In vitro</i> und <i>in vivo</i> Untersuchungen zur Antigen-spezifität von aktivierungsinduzierten CCR6-positiven Th17 Zellen	64
3.2.1	<i>In vitro</i> Untersuchungen.....	64
3.2.1.1	Antigen-spezifische Proliferation von CCR6-positiven Th17 und CCR6-negativen Th Zellen	64
3.2.1.2	Antigen-spezifische Zytokinproduktion von Th17 Zellen	67
3.2.2	<i>In vivo</i> Untersuchungen.....	68
3.2.2.1	Vorversuche.....	68
3.2.2.2	Stabilität von Th17 Zellen im Lymphknoten	71
3.2.2.3	Differenzierung von Th17 Zellen.....	73
3.3	Die Rolle von CCR6-positiven Th17 Zellen bei der Entstehung von chronisch-entzündlichen Erkrankungen	74
3.3.1	Modell der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis.....	74
3.3.2	CCR6-positive Th17 Zellen bei Rankkämpfen männlicher Mäuse	79
3.3.3	Th17 Zellantwort in der Stressreaktion	80
3.4	Wirkweise von Th17 Zellen	84
3.4.1	Zytokinantwort von myeloiden Zellen auf aktivierte Th17 Zellen	84
3.4.2	Auswirkungen auf die Immunantwort des Rezipienten durch den Transfer von Th17 Zellen	86
3.4.2.1	Einfluss von Th17 Zellen auf die zelluläre Immunantwort im Lymphknoten	86
3.4.2.2	Einfluss von Th17 Zellen auf die Rekrutierung von Immunzellen in periphere Entzündungsherde.....	88
4.	Diskussion	90
4.1	Analyse der CCR6-positiven Th17 Zellpopulation während der Immunantwort.....	90
4.2	Charakterisierung von Th17 Zellen.....	92
4.2.1	Phänotyp der Th17 Zellen	92
4.2.2	Proliferationsfähigkeit von <i>in vivo</i> generierten Th17 Zellen <i>in vitro</i>	93

4.2.3	Stabilität von Th17 Zellen <i>in vivo</i>	94
4.2.4	Wirkweise von Th17 Zellen.....	95
4.3	Antigenspezifität von Th17 Zellen.....	96
4.4	Die Rolle von CCR6-positiven Th Zellen in der at-EAE.....	98
4.5	Die Wirkung von Glucocorticoiden auf Th17 und Th1 Zellen in den peripheren Lymphknoten von gestressten Tieren.....	100
5.	Zusammenfassung	103
6.	Anhang	105
6.1	Abkürzungen.....	105
6.2	Publikationen.....	108
7.	Danksagung.....	109
8.	Literaturverzeichnis.....	110
9.	Lebenslauf	121

1. Einleitung

1.1 Regulation der Immunantwort – ein Überblick

Das Immunsystem besteht aus zwei funktionellen Einheiten: dem angeborenen und dem adaptiven Immunsystem. Beim Eindringen von Pathogenen in den Organismus hinterlassen diese eine „Spur“, die durch Rezeptoren an der Oberfläche von Zellen des angeborenen Immunsystems oder löslichen Molekülen erkannt werden. Es kommt zur Aktivierung des angeborenen Immunsystems, das den Erreger einerseits sofort bekämpft und andererseits Effektorzellen des erworbenen Immunsystems aktivieren kann. Daraufhin tritt die starke Expansion der T- und B-Zellen ein. Das koordinierte Zusammenarbeiten der Zellen und Moleküle des adaptiven und angeborenen Immunsystems bewirkt im Verlauf der Immunreaktion letztlich die Eliminierung des Erregers. Nach erfolgreicher Bekämpfung des Fremdkörpers verhindern regulatorische Zellen ein „Überschießen“ der Immunantwort, indem sie hemmend auf die aktivierten Immunzellen wirken (Suri-Payer et al., 1998). Defekte im Immunsystem führen zu einer mangelhaften Kontrolle der Immunreaktion und haben multiple Auswirkungen auf den Organismus. Zum einen können durch eine fehlerhafte oder verlangsamte Aktivierung des Immunsystems Pathogene den Organismus schwer schädigen. Zum anderen sind die Zellen des Immunsystems selbst eine Gefahr für den Organismus, falls dessen Hemmung nach Bekämpfung des Erregers ausbleibt. Bei einer Vielzahl von Autoimmunerkrankungen sind v.a. Zellen des adaptiven Immunsystems ständig aktiviert oder erkennen eigene Moleküle als fremd. Es folgt eine andauernde Entzündungsreaktion und eine Hemmung der Immunantwort durch regulatorische Zellen ist nicht mehr möglich. Beim Menschen sind die multiple Sklerose oder Arthritis prominente Beispiele für Autoimmunerkrankungen, die von permanent aktivierten T-Zellen verursacht werden (Kebir et al., 2007).

1.2 T Helfer-Zell-Differenzierung

1.2.1 T Helfer-Zell-Subpopulationen

T Helfer-Zellen (Th) gehören dem adaptiven Immunsystem an und werden hauptsächlich von Zellen des angeborenen Immunsystems aktiviert, nachdem diese ein fremdes Antigen entdeckt haben. Im Gegensatz zu den zytotoxischen T-Zellen, die infizierte Zellen direkt eliminieren können, ist die Hauptaufgabe der Th Zellen die Aktivierung von weiteren Leukozyten, wie Makrophagen und zytotoxischen T-Zellen (zelluläre Immunantwort) oder B-Zellen (humorale Immunantwort). Es gibt somit verschiedene Subklassen von Th Zellen, deren Einteilung in den späten 1980er Jahren begann (Mosmann et al., 1989). Naive Th Zellen werden durch Antigen-präsentierende Zellen (APCs) durch Bindung von Antigen/MHC II Komplex am T-Zell-Rezeptor-Komplex aktiviert. Durch das Zytokine IL-12 differenzieren naive Th Zellen zu Th1 Zellen, die IFN- γ produzieren und die zelluläre Immunantwort fördern. Die Entwicklung zu Th2 Zellen, die IL-4, IL-5 und IL-13 produzieren und so B Zellen aktivieren, wird in Gegenwart von IL-4 gefördert. Die zelluläre Immunantwort ist vor allem wichtig für die Bekämpfung intrazellulärer Erreger (z.B. Viren). Die humorale Immunantwort spielt bei der Bekämpfung extrazellulärer Organismen eine entscheidende Rolle (Abb. 1). Etwa 15 Jahre später etablierte sich eine weitere T-Zell-Subpopulation: die regulatorischen T-Zellen (Levings et al., 2005; Suri-Payer et al., 1998). Diese Zellen werden in Gegenwart von TGF- β generiert und können die Proliferation von Leukozyten durch Sezernieren von anti-inflammatorischen Zytokinen (IL-10, TGF- β) inhibieren. So verhindern sie ein Überschießen der Immunantwort. Charakteristisch ist die Expression von CD25 an der Oberfläche der Tregs und von FoxP3, einem intrazellulären Transkriptionsfaktor. Man unterscheidet natürliche Tregs, die man von Geburt an hat, von den induzierbaren Tregs, die direkt infolge einer Entzündungsreaktion gebildet und wieder abgebaut werden (Faria et al., 2006; Shevach, 2006; Wan et al., 2006). Weitere immunregulatorische Th Subpopulationen sind Th3 Zellen, die TGF- β produzieren und Tr1 Zellen, die IL-10 sezernieren können und so die Proliferation von T-Zellen inhibieren (Abb. 1). Durch diese Einteilung konnte die Bekämpfung einer Vielzahl von Erregern erklärt werden. Die Entstehung von Autoimmunkrankheiten oder die Bekämpfung einiger

extrazellulärer Bakterien und Pilze forderte das Vorhandensein weiterer Th Zell-Subpopulationen. Im Laufe der Zeit zeigten Studien eine bedeutsame Rolle von IL-23 bei der Entstehung von Autoimmunerkrankungen sowie der Bekämpfung von Infektionen (Cua et al., 2003; Happel et al., 2003; Khader et al., 2005; Murphy et al., 2003). Diesem Zytokin wurde daher für die Differenzierung einer neuen Th Zell-Subpopulation eine entscheidende Rolle zugewiesen (Langrish et al., 2005). Dieser neue Typus von Th Zellen zeichnet sich durch die Produktion von IL-17, einem proinflammatorischen Zytokin, aus und wurde demnach Th17 Zelle genannt (Harrington et al., 2005). Th17 Zellen sind im Fokus aktueller Forschung, da sie bei der Entstehung von Autoimmunerkrankungen eine zentrale Rolle spielen. Ein Beweis dafür wurde im Modell der autoimmunen Enzephalitis gezeigt. Hier wurden IL-17 produzierende Th Gedächtniszellen in gesunde Mäuse transferiert. Der Transfer führte zur Auslösung der Autoimmunerkrankung in den Empfängertieren (Langrish et al., 2005).

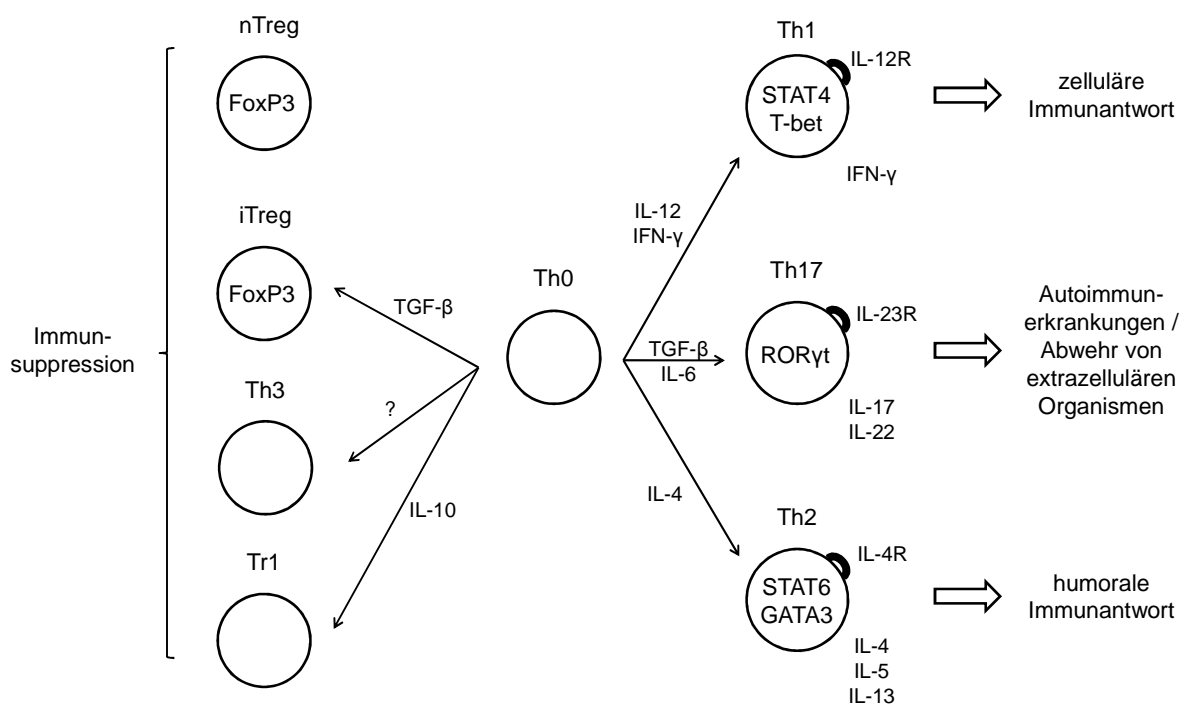


Abbildung 1: Übersicht über die verschiedenen Th Zell-Subpopulationen, modifiziert aus Bettelli et al., Nature 2007.

1.2.2 Th17 Zellen – eine neue Subpopulation von Th Zellen

Zunächst ging man davon aus, dass IL-23 maßgeblich an der Entstehung von Th17 Zellen beteiligt ist (Aggarwal et al., 2003), doch konnte gezeigt werden, dass IL-23 eine wichtige Funktion bei der Expansion von Th17 Zellen hat. Zudem exprimieren Th17 Zellen den IL-23 Rezeptor nur nach ihrer Differenzierung (Veldhoen et al., 2006). Es ließ sich nachweisen, dass die Generierung von Th17 Zellen in Mäusen vielmehr von den proinflammatorischen Zytokinen TGF- β , IL-6 und IL-21 abhängig ist (Bettelli et al., 2006; Nurieva et al., 2007; Veldhoen et al., 2006). Diese Zytokine werden von Effektor-Zellen des angeborenen Immunsystems in der frühen Phase der Immunantwort produziert (Abdollahi-Roodsaz et al., 2008; van Beelen et al., 2007). Beim Menschen sind im Gegensatz zur Maus die Zytokine IL-23 und IL-1 entscheidend für die Entwicklung von Th17 Zellen (Abb. 2). Die Rolle von TGF- β dabei scheint noch nicht geklärt, da angenommen wurde, dass beim Menschen die Entwicklung von Th17 Zellen weitgehend unabhängig von TGF- β sei. Vor Kurzem stellte sich allerdings heraus, dass TGF- β eine wichtige Funktion bei der Generierung humaner Th17 Zellen besitzt (O'Garra et al., 2008).

Zytokine spielen in der Th Zell-Differenzierung somit eine zentrale Rolle. Differenzierte Th Zellen produzieren Zytokine, die die Entwicklung anderer Th Zell-Subpopulationen regulieren (Bogdan et al., 1996; Harrington et al., 2005). Es konnte deutlich gemacht werden, dass Th1 und Th2 spezifische Transkriptionsfaktoren (STAT4, T-bet und STAT6, GATA3) die Entwicklung von Th17 Zellen inhibieren (Harrington et al., 2005; Park et al., 2005). Später konnte ROR γ t als der spezifische Transkriptionsfaktor für Th17 Zellen in Maus und Mensch nachgewiesen werden (Ivanov et al., 2006; Wilson et al., 2007).

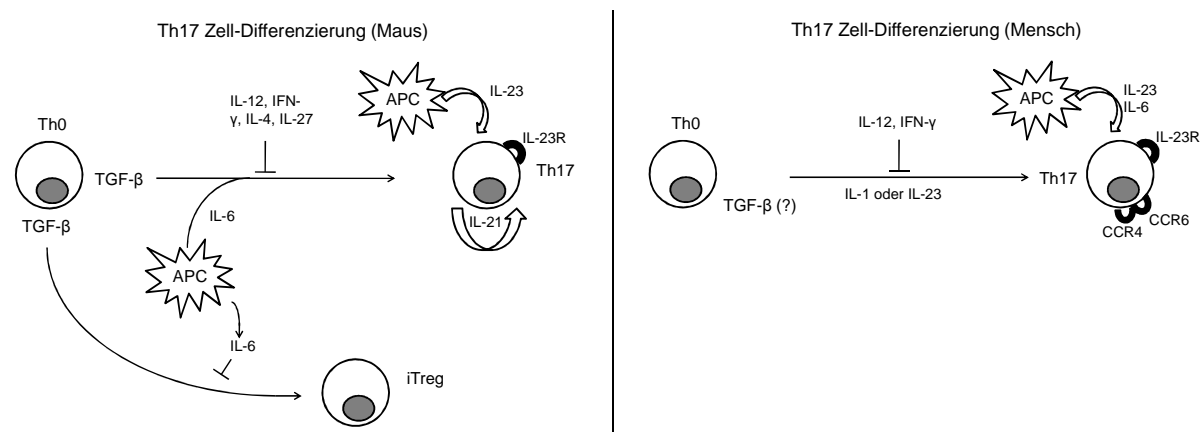


Abbildung 2: Th17 Zell-Differenzierung in Maus und Mensch, aus McGeachy *et al.*, Immunity 2008.

1.3 Migration von T-Zellen

Naive T-Zellen zirkulieren im Körper durch das Blut über das hohe Endothel der lymphatischen Gefäße in die Lymphknoten (Girard *et al.*, 1995). Um dorthin zu gelangen, benötigen die Zellen spezielle Oberflächenmoleküle. Einige der wichtigsten Moleküle für die Migration von naiven T-Lymphozyten in den Lymphknoten sind das Adhäsionsmolekül CD62L und der Chemokinrezeptor CCR7 (Forster *et al.*, 1999; Warnock *et al.*, 1998). Dort kommt es zur Aktivierung und Proliferation von T-Zellen durch Antigen-präsentierende Zellen, die das Antigen von der Peripherie über die afferente Lymphe zum Lymphknoten transportieren. Aktivierte Zellen verlassen den Lymphknoten durch die efferenten Lymphgefäße, zirkulieren im Blut und migrieren in die Peripherie. Dazu müssen die Zellen durch das Endothel auswandern. Dieser Prozess der transendothelialen Migration ist ein mehrstufiger Vorgang (Springer, 1994): Zunächst erfolgt das Selektin-vermittelte Abbremsen der Zellen im Blutstrom, das sog. *rolling*. Dabei verringern die Leukozyten ihre Geschwindigkeit und lösen über die Wechselwirkung von Chemokinrezeptoren mit chemo-attraktiven Molekülen an der Oberfläche des Endothels die Aktivierung von Integrinen aus. Es schließt sich die feste Bindung der Leukozyten an das Endothel an und ermöglicht die transendotheliale Migration entlang von Chemokingradienten in die Peripherie, wo sie ihre Effektor-Funktionen ausüben. Die Migration von Leukozyten an den richtigen Ort ist somit stark von der

Chemokin-Chemokinrezeptor Wechselwirkung abhängig, während Selektine und Integrine eine wichtigere Rolle bei der Einleitung der transendothelialen Migration spielen (Mackay, 2008). Die α_4 Integrine sind auf fast allen T-Zell-Subpopulationen zu finden, werden aber erst durch Chemokinrezeptor-Signale aktiviert (Kinashi, 2007; Kolanus et al., 1997). Die Selektivität der Migration wird durch die richtige Kombination von Integrinen und Chemokinen gesteuert. Das erklärt, warum naive T-Zellen, Effektor- und Gedächtniszellen, aber auch Th Zell-Subpopulationen unterschiedliche Adhäsionsmoleküle tragen und verschiedene Chemokinrezeptoren exprimieren müssen. Somit können unterschiedliche Th Zell-Subpopulationen anhand ihres Expressionsprofils von Chemokinrezeptoren differenziert werden (siehe 1.4.2.3).

1.4 Chemokine und ihre Rezeptoren

1.4.1 Chemokine

1.4.1.1 Funktion und Aufbau von Chemokinen

Chemokine sind basische, chemotaktische Zytokine mit einem Molekulargewicht von 8-14 kDa. Sie steuern die Migration von Leukozyten durch den Organismus. Weiter spielen sie bei der Differenzierung von hämatopoetischen Zellen, Organogenese und Angiogenese eine zentrale Rolle (Baggiolini, 1998; Rollins, 1997; Zou et al., 1998). Sie werden einerseits akut während der Immunantwort von aktivierten Leukozyten und andererseits konstitutiv von Gewebszellen produziert. Dabei binden die Chemokine an Heparan-Sulfat Proteoglykane auf Endothelzellen und vermitteln die Rezirkulation der Leukozyten. Beim Menschen wurden bisher ca. 50 und bei der Maus 30 Chemokine identifiziert (Zlotnik et al., 2000). Sie werden aufgrund N-terminaler, konservierter Cystein-Reste in insgesamt vier Klassen unterteilt. Dabei bilden die CC- und CXC-Chemokine die zwei Hauptklassen. Befinden sich zwei Cysteine in direkter Nachbarschaft, spricht man von CC-Chemokinen. CXC-Chemokine haben in

ihrer Aminosäuresequenz eine, CX₃C-Chemokine drei beliebige Aminosäuren zwischen den beiden Cysteinen. Eine weitere Gruppe bilden die Chemokine, die nur einen N-terminalen Cystein-Rest besitzen, die CX-Chemokine. Chemokine wirken durch die Bindung an Chemokinrezeptoren (siehe 1.4.2). Dabei kann in den meisten Fällen ein Chemokin an verschiedene Rezeptoren bzw. ein Rezeptor verschiedene Chemokine binden (Baggiolini, 1998).

1.4.1.2 Das Chemokin CCL20

Das Chemokin CCL20 zeigt ein besonderes Merkmal, da es selektiv an den Chemokinrezeptor CCR6 bindet und umgekehrt CCR6 ausschließlich CCL20 als Ligand besitzt (Baba et al., 1997; Varona et al., 1998). Weitere mögliche Bindungspartner für CCR6 sind β -Defensine, bei denen zwar keine direkte Bindung, aber eine chemotaktische Wirkung an CCR6-exprimierenden Zellen nachgewiesen werden konnte (Yang et al., 1999). Die Monospezifität von CCL20/CCR6 wurde durch eine NMR Studie aufgeklärt (Perez-Canadillas et al., 2001). CCL20 besteht aus drei β -Faltblättern und einer α -Helix; ein Motiv, das allen Chemokinen gemeinsam ist. Die Selektivität von CCL20 kann mit der starren Konformation des N-terminalen DCCL Motivs und der Fuge zwischen dem N-terminalen *loop* und der β_2 - β_3 Haarnadel-schleife, die hier viel enger zusammenliegt als bei anderen Chemokinen, erklärt werden. Das humane β -Defensin 2 zeigt eine sehr ähnliche Struktur und diese Ähnlichkeit könnte die Wirkung an CCR6 erklären.

CCL20 kann induziert sezerniert oder konstitutiv gebildet werden und spielt bei der Rezirkulation von Leukozyten in sekundär lymphatische Organe und nicht-lymphatische Gewebe eine wichtige Rolle. Besonders konnte CCL20 bei diversen Autoimmunerkrankungen in erhöhtem Maß nachgewiesen werden. So detektierte man in den Läsionen von Psoriasis-Patienten oder bei Patienten, die von der atopischen Dermatitis betroffen sind, einen erhöhten Plasmaspiegel an CCL20. Die erhöhte Menge an CCL20 korrelierte mit der Einwanderung von autoreaktiven T-Zellen, Makrophagen und dendritischen Zellen in die Epidermis (Homey et al., 2000; Nakayama et al., 2001).

1.4.2 Chemokinrezeptoren

1.4.2.1 Aufbau und Signaltransduktion von Chemokinrezeptoren

Chemokinrezeptoren lassen sich, analog zu den Chemokinen, in CC-, CXC- und CX₃C-Chemokinrezeptoren einteilen (siehe 1.4.1.1). Sie gehören zur Klasse der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, die strukturell zu den Sieben-Transmembran-Domänen-Rezeptoren zählen. Bislang konnten 18 verschiedene Chemokinrezeptoren identifiziert werden (Murphy et al., 2000). Nach Bindung von Chemokinen auf der Rezeptoroberfläche der Leukozyten erfolgt die intrazelluläre Signaltransduktion durch GTP-bindende (G) Proteine (Mackay, 2001). Die Weiterleitung des Signals erfolgt über Phospholipase C- β (PLC β), die Phosphoinositoldiphosphat (PIP₂) zu den sog. *second messenger* Molekülen Inositoltriphosphat (IP₃) und Diacetylglycerol (DAG) spaltet. IP₃ veranlasst die Freisetzung von Ca²⁺ aus dem endoplasmatischen Reticulum (ER) und DAG aktiviert die Proteinkinase C. Beide Moleküle wirken auf Proteine, die für Überleben, Differenzierung, Proliferation oder Apoptose der Zelle verantwortlich sind (Curnock et al., 2002). Die Signaltransduktion von G_{oi}-Protein-gekoppelter Rezeptoren und somit auch von Chemokinrezeptoren ist durch Pertussus Toxin (Ptx) inhibierbar, da die Kopplung von G_{oi} an G _{$\beta\gamma$} verhindert wird (Bargatze et al., 1993).

1.4.2.2 Der Chemokinrezeptor CCR6

Beim Menschen und bei der Maus bindet CCR6 selektiv das Chemokin CCL20 und kann von keinem anderen Chemokin aktiviert werden (siehe 1.4.1.2). Weiter auffallend ist die genetische Lokation von CCR6 auf Chromosom 6q27 im Gegensatz zu den Chemokinrezeptoren CCR1-5 und CCR8 auf Chromosom 3p21 (Liao et al., 1997). CCL20 befindet sich ebenfalls nicht im Gen-*Cluster* der CC-Chemokine und zeigt nur 20 - 28 % Aminosäuresequenz-Identität mit den anderen Chemokinen (Hieshima et al., 1997). Somit könnte die Selektivität der CCR6/CCL20 Interaktion nach molekularbiologischen Gesichtspunkten begründet werden.

CCR6 konnte zunächst an der Oberfläche von B-Zellen und hauptsächlich unreifen, dendritischen Zellen sowie T-Zellen detektiert werden (Dieu et al., 1998; Iwasaki et al., 2000; Nakayama et al., 2001). Zunächst nahm man an, dass B-Zellen keine Chemotaxis nach Zugabe von CCL20 zeigen (Liao et al., 1999), doch konnte später die chemotaktische Migration von B-Zellen zu CCL20 bewiesen werden (Meissner et al., 2003). Weiter konnte der Nachweis geliefert werden, dass CCR6 durch Bindung von CCL20 maßgeblich bei der Migration von dendritischen Zellen zu den Entzündungsherden beteiligt ist, da bei CCR6^{-/-} Mäusen ein Defekt bei der Migration von dendritischen Zellen in die Darm-Mukosa und bei DTH Reaktionen festgestellt wurde (Cook et al., 2000; Varona et al., 2001). Später wurde die Expression von CCR6 auch auf spezialisierten T-Zellen gefunden, die phänotypisch und funktionell der Klasse der Effektor-Gedächtnis-T-Zellen zuzuordnen sind. CCR6-positive T-Zellen zeigen ebenfalls nach Zugabe von CCL20 Chemotaxis. Die Expression von CCR6 nach Aktivierung dieser Zellen wurde allerdings verschieden interpretiert. So konnte nachgewiesen werden, dass CCR6 nach Bindung von CCL20 oder nach Aktivierung des T-Zell-Rezeptors bzw. nach Zugabe von IL-2 nicht vermehrt auf der Oberfläche der Zellen exprimiert wurde (Greaves et al., 1997; Liao et al., 1999). Im Gegensatz dazu zeigten Ebert et al. eine verstärkte Expression von CCR6 an der Oberfläche von T Helfer Zellen nach Aktivierung (Ebert et al., 2002). CCR6 reguliert somit die Migration von Leukozyten in die Peripherie. Die Regulation der CCR6 Expression nach der Aktivierung von T-Zellen ist momentan noch umstritten und Bedarf weiterer Untersuchungen.

1.4.2.3 Die Einteilung von Th Zellpopulationen mittels Chemokinrezeptoren

Th Zellen können anhand ihres Zytokinprofils in verschiedene Subpopulationen aufgeteilt werden. So produzieren Th1 Zellen hauptsächlich IFN- γ und aktivieren die zelluläre Immunantwort, während Th2 Zellen vornehmlich IL-4, IL-5 bzw. IL-13 sezernieren und so die humorale Immunantwort fördern. Dabei dominieren zwei Parameter: die Stimulation des T-Zell-Rezeptors und das vorherrschende Zytokin-Milieu (Hsieh et al., 1993; Seder et al., 1992). Zur näheren Charakterisierung der Th Zell-Subpopulationen siehe 1.2.

Die Differenzierung der naiven Th Zellen erfolgt im Lymphknoten. Um dorthin zu gelangen, benötigen die Leukozyten die Oberflächenmoleküle CD62L und CCR7. Nach der Differenzierung der Th0 Zelle zu den verschiedenen Th Zell-Subpopulationen muss diese in der Lage sein, an ihren Bestimmungsort migrieren zu können. Für die Migration von T-Zellen sind außer den Adhäsionsmolekülen, wie CD62L, zusätzlich die Chemokinrezeptor/Ligand Interaktionen entscheidend. So konnte gezeigt werden, dass der humane Chemokinrezeptor CCR3, der Rezeptor für Eotaxin, hauptsächlich auf Th2 Zellen zu finden ist (Sallusto et al., 1997). Weitere Th1 und Th2 spezifische Chemokinrezeptoren konnten identifiziert werden (Acosta-Rodriguez et al., 2007; Bonecchi et al., 1998; Sallusto et al., 1997; Sallusto et al., 1998; Siveke et al., 1998) und sind in Tab.1 zusammengefasst.

Chemokinrezeptoren eignen sich somit als Marker zur Klassifizierung der verschiedenen Th Zell-Subpopulationen. Dies ermöglicht den Einsatz von durchflusszytometrischen Methoden zur Identifizierung und Sortierung verschiedener Th Zellen und erlaubt so eine bessere Untersuchung der Lokalisation und Funktion dieser Zellen.

Tabelle 1: Chemokinrezeptor-Expression verschiedener Th Zell-Subpopulationen.

	Th Zell-Subpopulation			
	Th0 (Mensch und Maus)	Th1 (Mensch und Maus)	Th2 (Mensch und Maus)	Th17 (Mensch)
Chemokinrezeptoren	CXCR4	CXCR3	CCR3	CCR4
	CCR7	CCR1	CCR4	CCR6
		CCR5	CCR8	

1.5 Die Multiple Sklerose und ihr Mausmodell Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis

1.5.1 Prävalenz und Ätiologie von Multipler Sklerose

Die Multiple Sklerose (MS) ist eine chronische Erkrankung des Zentralen Nervensystems (ZNS) beim Menschen und zeichnet sich durch die Entzündung des ZNS und Demyelinisierung der Neuronen aus. Weltweit sind etwa 2,5 Mio Menschen davon betroffen, dabei über 125 000 in Deutschland. Die Erkrankung tritt im Alter von 20 - 40 Jahren zu über 65 % bei Frauen auf und die Prävalenz ist weltweit in den Industrienationen, mit Ausnahme von Japan, am höchsten (Noseworthy et al., 2000). Die Ätiologie von MS ist noch nicht geklärt, doch scheinen Umwelt- und genetische Faktoren eine wichtige Rolle zu spielen (Kurtzke, 2000; Olerup et al., 1991).

1.5.2 Kurze Zusammenfassung der Immunologie von MS

Bisher ist nicht genau bekannt, was zur Auslösung der Erkrankung führt. Man geht davon aus, dass in den zervikalen und paraspinalen Lymphknoten das auslösende Antigen von dendritischen Zellen präsentiert wird und so autoreaktive Th Zellen aktiviert. Aktivierte Th Zellen exprimieren die Adhäsionsmoleküle VLA-4 und LFA-1 und überwinden so die Blut-Hirn-Schranke. Im ZNS aktivieren die eingewanderten Th Zellen Mikrogliazellen, zytotoxische T-Zellen und B-Zellen. Während Mikrogliazellen und CTLs direkt die Neuronen zerstören, sezernieren Plasma-B-Zellen autoreaktive Antikörper, die das Komplementsystem aktivieren, das so gegen den eigenen Organismus gerichtet ist. Th Zellen können ebenfalls Neuronen durch TRAIL/TRAIL-Rezeptor Interaktion töten und tragen direkt zur Zerstörung der Nerven bei. Diese inflammatorische Situation begünstigt die Sezernierung von proinflammatorischen Zytokinen (z.B. TNF, IFN- γ , IL-17), Chemokinen und Matrix-Metallo-Proteinasen, die wiederum die Auflösung der Blut-Hirn-Schranke und die Einwanderung von neuen, autoreaktiven Zellen fördern (Holmoy et al., 2008). Als

Initiator dieser Erkrankung werden momentan Th17 Zellen diskutiert, da in MS Patienten (Vaknin-Dembinsky et al., 2006), ebenso wie in Patienten mit anderen chronisch-entzündlichen Erkrankungen, erhöhte Mengen an IL-17 im Serum und in entzündeten Geweben gefunden wurde (Hemmer et al., 2006; McFarland et al., 2007; Pene et al., 2008). Weiter konnte gezeigt werden, dass Th17 Zellen in einem Modell die Blut-Hirn-Schranke effektiv passieren und im ZNS Neuronen zerstören (Kebir et al., 2007).

1.5.3 Die Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis als Modellerkrankung für MS

Die Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis (EAE) ist eine der MS ähnliche Entzündung im ZNS bei Mäusen und Ratten. Im Folgenden wird die EAE bei Mäusen näher beschrieben. Mausstamm-abhängig injiziert man in C57BL/6 Mäuse Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein (MOG) und in SJL/J Mäuse Proteolipid-Protein (PLP) zusammen mit Adjuvantien, um die Krankheit auszulösen. Beide Proteine sind Bestandteil des im ZNS der Tiere vorkommenden Myelins. Transferiert man Th Zellen aus PLP oder MOG immunisierten Mäusen in gesunde Rezipienten und löst so eine EAE aus, spricht man von einer Transfer-EAE oder *adoptive transfer EAE* (at-EAE). Nach dem Beginn der Erkrankung attackieren zytotoxische T-Zellen die myelinisierten Bereiche des ZNS der Maus und starten die Gewebszerstörung (Zamvil et al., 1990). Zunächst ging man davon aus, dass Th1 Zellen die krankheitsauslösende Th Zellpopulation ist (Ando et al., 1989; Khoruts et al., 1995) und dass zytotoxische T-Zellen nur unter speziellen Umständen eine wichtige Rolle bei der Entstehung der EAE spielen (Huseby et al., 2001). Da Th1 Zellen hauptsächlich IFN- γ produzieren, lag die Vermutung nahe, dass die Blockade von IFN- γ durch Antikörper eine Abschwächung der EAE hervorruft. Tatsächlich verschlimmerte sich dadurch allerdings die Erkrankung massiv und im Gegenzug hatte die Verabreichung von IFN- γ Protein eine schützende Wirkung (Billiau et al., 1988; Ferber et al., 1996). Verabreicht man außerdem in der frühen Phase einer EAE IL-12 und induziert so eine IFN- γ Produktion durch Th1 Zellen, tritt die EAE in abgeschwächter Form auf (Gran et al., 2004).

Gescheiterte Th1 gerichtete Therapieversuche und die Entdeckung der Th17 Zellen schwächten das Dogma einer ausschließlich Th1 Zell-vermittelten Auslösung einer EAE deutlich ab (Steinman, 2007). Th17 Zellen produzieren IL-17, induzieren die Expression weiterer proinflammatorischer Zytokine und sind entscheidend an der Entstehung und Entwicklung der Autoimmunerkrankung beteiligt. Durch IL-17 neutralisierende Antikörper oder durch Generierung einer IL-17^{-/-} Maus konnte in beiden Fällen die Schwere der EAE Erkrankung deutlich abgeschwächt werden (Hofstetter et al., 2005; Komiyama et al., 2006). Die weitere Charakterisierung von Th17 Zellen ist somit eine Möglichkeit, neue Therapien gegen Autoimmunerkrankungen zu entwickeln. Bisher gibt es keine suffizienten Oberflächenmoleküle auf Th Zellen in immun-kompetenten Mäusen, die funktionelle Th17 Zellen im Verlauf einer Autoimmunerkrankung oder Infektion definieren.

1.6 Chronischer Stress als Ursache und Verstärker von chronischen Erkrankungen

1.6.1 Terminologie und Arten von Stress

Die Definition des Stresses gestaltet sich schwierig, da dieser Begriff zum einen dafür verwendet wird, um äußere Einflüsse auf den Organismus zu beschreiben, und zum anderen versteht man darunter die Reaktion des Körpers auf einen dieser Einflüsse. Um Verwechslungen vorzubeugen wurden 1997 folgende Definitionen vorgenommen (Dhabhar et al., 1997):

Stressor	:	auf den Organismus einwirkende Stimulierung
Stressperzeption	:	Wahrnehmung des Gehirns auf Stressor
Stressantwort:	:	Reaktion des Organismus auf Stressperzeption

Stress lässt sich in zwei Kategorien aufteilen: in akuten Stress, der auch positive Auswirkungen hat, und in chronischen Stress, der mit der Auslösung von Krankheiten assoziiert ist. Man unterscheidet prinzipiell drei Arten von Stressoren:

physische Stressoren (Beispiele: elektrische und chemische Einflüsse, Operationen), psychologische Stressoren (Beispiel: *forced swimming*) und soziale Stressoren, die von „Artgenossen“ verursacht werden.

1.6.2 Akuter Stress

Bei akutem Stress werden Neurotransmitter und Hormone freigesetzt, die eine rasche Energiefreisetzung initiieren, damit der Organismus schnell auf seinen Stressor reagieren kann (Dhabhar et al., 1996). Dabei besitzt Noradrenalin eine Doppelfunktion: Zum einen kann es direkt zwischen Neuronen als Neurotransmitter parakrin wirken. Zum anderen veranlasst der Sympathikus nach einem Stresssignal die Ausschüttung von Noradrenalin aus der Nebennierenrinde und versetzt den Körper in „Alarmbereitschaft“. Somit zeigt Noradrenalin auch endokrine Wirkung als Hormon. Dieses Ereignis hat im Laufe der Evolution das Überleben einer Vielzahl von Lebewesen gesichert. Dabei wird auch das Immunsystem kurzfristig aktiviert. Die absolute Anzahl an T-, B- und NK-Zellen im Blut sinkt signifikant nach akutem Stress schnell ab und steigt später wieder auf den Ausgangswert (Dhabhar et al., 1994). Man geht davon aus, dass die Zellen des Immunsystems schnell an ihre Bestimmungsorte, z.B. die Lymphknoten, das Knochenmark oder extra-lymphatische Organe geleitet werden, um dort ihre Effektorfunktionen auszuüben. Tatsächlich konnte der Nachweis erbracht werden, dass akuter Stress bei Mäusen einen direkten Einfluss auf die antigenspezifische Immunantwort hat und bei DTH-Reaktionen in der Haut für eine deutlich stärkere Akkumulation von Zellen des Immunsystems sorgt als bei nicht gestressten Tieren (Dhabhar et al., 1997; Dhabhar et al., 1999). An den Orten der Antigenverabreichung konnte ebenfalls eine erhöhte Menge an proinflammatorischen Zytokinen und eine gesteigerte Migration von DCs von der Haut in die Lymphknoten detektiert werden. In den Lymphknoten gestresster Tiere war die Anzahl an aktivierten Makrophagen und T-Zellen ebenfalls deutlich erhöht (Viswanathan et al., 2005). Somit ist der Organismus schneller in der Lage, Verletzungen und Infektionen abzuwehren. Akuter Stress kann so auch die Generierung von Gedächtniszellen während der Erst-Infektion begünstigen und die Entwicklung eines immunologischen Gedächtnisses fördern. Neben den

stimulierenden Hormonen wird aufgrund von akutem Stress die Ausschüttung von Glucocorticoiden gefördert, die immunmodulatorisch wirken und ein Überschießen der Immunantwort verhindern können (Elenkov et al., 2002).

1.6.3 Chronischer Stress

Ist ein Organismus für längere Zeit einem Stressor ausgesetzt, sodass sich das physiologische Gleichgewicht nicht mehr einstellen kann, spricht man von chronischem Stress. Der Körper wird somit überbeansprucht und die positiven Effekte des akuten Stresses kehren sich in negative um. Die Auswirkungen sind sehr mannigfaltig, da chronischer Stress einerseits das Immunsystem supprimieren und andererseits für eine langanhaltende Entzündung oder psychologische Schäden sorgen kann. Beim Menschen verschlimmert lang anhaltender Stress chronische Entzündungskrankheiten, wie Psoriasis, Asthma oder Arthritis (Mei-Tal et al., 1970; SOLOMON et al., 1964; Thomason et al., 1992). Desweiteren sind chronisch gestresste Personen anfälliger für Schlafstörungen, Angsterkrankungen und Depressionen (Charmandari et al., 2003). Die immunsuppressive Wirkung von Stress konnte in Tiermodellen vor allem durch die erhöhte Empfänglichkeit von gestressten Tieren gegenüber Infektionen und Tumoren nachgewiesen werden (Ben Eliyahu et al., 1991; Glaser et al., 1994). Sozialer Stress ist eine Art des chronischen Stresses und vor allem bei Tieren, die in Sozialverbänden leben, eine schwere Belastung. Dies begünstigt bei Mäusen die Entwicklung langanhaltender Entzündungen, wie z.B. chronisch-entzündliche Darmerkrankungen (Reber et al., 2006; Reber et al., 2007). Chronischer Stress und Autoimmunerkrankung sind beides langanhaltende Beeinträchtigungen des Körpers und somit auch des Immunsystems. Bisher konnte nicht geklärt werden, inwiefern chronischer Stress auf zellulärer Ebene die Entwicklung von autoreaktiven T-Zellen beeinflusst und zur Verschlimmerung von Autoimmunerkrankungen führt. Es bleibt auch weiterhin unklar, inwiefern chronischer Stress die bestehenden Therapiemöglichkeiten bei Autoimmunerkrankungen beeinflusst.

1.7 Zielsetzung der Arbeit

Während der Immunreaktion unterliegt die Expression von Chemokinrezeptoren auf T-Lymphozyten einer hochgradigen Regulation. Die Chemokinrezeptor-Expressionsprofile können daher für eine Unterscheidung verschiedener Th Zell-Subpopulationen herangezogen werden (Sallusto et al., 1998). Bisher ist wenig darüber bekannt, inwieweit die Aktivierung von Chemokinrezeptoren auf Leukozyten während der Effektorphase einer Immunreaktion eine Funktion bei der Differenzierung der beteiligten Zellen hat.

In dieser Arbeit wird besonderer Wert auf die Charakterisierung des Chemokinrezeptors (CCR) 6 bei der Aktivierung von T-Lymphozyten gelegt. *In vitro* Experimente zeigen, dass die Regulation des Rezeptors direkt mit der Aktivierung und der Expansion der T-Zellen verbunden ist. Daher kann angenommen werden, dass Signale, die durch CCR6 vermittelt werden, die Differenzierung der naiven T-Zellen direkt beeinflussen. Zur Überprüfung dieser Hypothese phänotypisierten wir zunächst CCR6-positive Th Zellen mittels Durchflusszytometrie und analysierten ihre Rolle bei der Immunreaktion anhand des OVA-Immunisierungsmodells *in vivo* und *in vitro*. Wir überprüften ebenfalls die Stabilität von CCR6-positiven Th Zellen und die Ausbildung von Gedächtnis-Th Zellen im Verlauf der Immunantwort. Weiter wurde die Wirkweise von CCR6-positiven Zellen auf andere Zellen des Immunsystems durch Zelltransfer-Experimente und *in vitro* Kokulturen mit myeloiden Vorläuferzellen aus dem Knochenmark untersucht. Abschließend wurde die Funktion von CCR6-positiven Th Zellen im Modell der at-EAE nachgewiesen und die Auswirkungen von chronischem Stress auf CCR6-positive Th Zellen analysiert.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Versuchstiere

Allen Versuchstieren standen Wasser und Futter *ad libitum* zur Verfügung. Für die Versuche wurden Mäuse im Alter zwischen 8 und 16 Wochen verwendet. Alle Versuche wurden nach den FELASA-Richtlinien durchgeführt und waren von den lokalen Behörden genehmigt.

C57BL/6: Die Mäuse wurden von den Firmen Charles River (Sulzfeld) und Janvier (Le Genest, Frankreich) bezogen. Die Mäuse wurden unter SPF (*specific pathogen free*) Bedingungen gehalten.

OT-II (OVA TCR transgen): Der Mausstamm ist transgen für Ovalbumin spezifischen T-Zell Rezeptor und wurde aus Eigenzucht (AG Lechner) bezogen. Die Mäuse wurden unter SPF Bedingungen gehalten.

SJL/J: Die Mäuse wurden von Harlan Winkelmann (Borchen, Deutschland) bezogen und unter konventionellen Bedingungen gehalten.

CD45.1: Ein kongener Mausstamm zu C57BL/6. Die Mäuse wurden unter SPF Bedingungen gehalten.

2.1.2 Chemikalien und Reagenzien

Die verwendeten Chemikalien wurden von *pro analysi* Qualität verwendet.

2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, München
Agarose	GIBCO/Invitrogen, Karlsruhe
Alum Imject	PIERCE, Rockford, USA
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich
Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester (CFSE)	Invitrogen, Karlsruhe
5xcDNA-Synthese Puffer	Promega, Mannheim
Concanavalin A (ConA)	Sigma-Aldrich
CpG ODN 1668	Operon, Köln
dNTP-Mix	Promega
EDTA	Invitrogen
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich
Fötale Kälberserum (FKS)	Sigma-Aldrich
Fortecutin Injekt (Dexamethason)	Merck, Darmstadt
HANKS Puffer	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
HEPES	Sigma-Aldrich
Incomplete Freund's Adjuvans(IFA)	Sigma-Aldrich
Ovalbumin (OVA)	Sigma-Aldrich

Penicillin/ Streptomycin	Invitrogen
Percoll	Amersham, Uppsala, Schweden
Phosphat gepufferte Salinelösung (PBS)	PAA
Propidiumjodid	Sigma-Aldrich
RPMI 1640	PAA
Tissue-Tek	Sakura Finetek, Zoeterwoude, Niederlande
Trypanblau	Sigma-Aldrich

2.1.3 Puffer und Lösungen

Medium zur Kurzzeitkultur von primären Lymphozyten aus Lymphknoten und Milz sowie von primären Knochenmarkzellen

RPMI 1640, 10 % (V/V) FKS, 50 µM Mercaptoethanol, 100 U/ml Penicillin, 100 U/ml Streptomycin

Medium zur Kultivierung von Knochenmarkzellen

RPMI 1640, 10 % (V/V) FKS, 50 µM Mercaptoethanol, 100 U/ml Penicillin, 100 U/ml Streptomycin, 10 % GM-CSF

MACS Puffer

PBS, 0,5 % BSA, 2 mM EDTA

Puffer zur Aufnahme von Mausszellen für durchflusszyometrische Untersuchung (Waschpuffer, FACS-Puffer)

PBS, 2 % FKS, 2 mM EDTA

Erythrozyten-Lysepuffer

0,17 M NH₄Cl, 20 mM Hepes

2.1.4 Kits

Bender Multiplex Kit (Th1/Th2 10plex)	Bender Medsystems, Wien, Österreich
Cytofix/Cytoperm	BD Biosciences, Heidelberg
ELISA: mouse IFN- γ	R&D Systems, Wiesbaden
mouse IL-17	R&D Systems
mouse IL-4	R&D Systems
Nucleo Spin RNA II	Macherey Nagel, Düren
BrdUFlow Kit	BD Biosciences

2.1.5 Enzyme

Go-Taq	Promega
Collagenase D	Roche, Penzberg
M-MLV Punktmutation Reverse Transkriptase	Promega
RNasin	Promega

2.1.6 Antikörper / Konjugate

Verwendung	Spezifität	Konjugat	Klon	Hersteller
Durchflusszytometrie	Ratte anti-Maus B220	PerCP	RA3-6B2	BD Biosciencess
Durchflusszytometrie	Ratte anti-Maus CD4	Pacific Blue	RM4-5	BD Biosciencess
Durchflusszytometrie	Ratte anti-Maus CD44	APC	IM7	BD Biosciencess
Durchflusszytometrie	Ratte anti-Maus CD62L	PE	MEL-14	BD Biosciencess
Durchflusszytometrie	Ratte anti-Maus CD69	PE-Cy7	H1.2F3	BD Biosciencess
Durchflusszytometrie	Ratte anti-Maus IFN- γ	APC	XMG1.2	BD Biosciencess
Durchflusszytometrie	Ratte anti-Maus IL-17	PE	TC11-18H10.1	BD Biosciencess
Durchflusszytometrie	Maus anti-BrdU	FITC	B44	BD Biosciencess
Durchflusszytometrie	Ratte anti-Maus CCR6	-	140706	R&D Systems
Durchflusszytometrie	Ratte anti-Maus CD8a	PerCP	53-6.7	BD Biosciencess
Durchflusszytometrie	Streptavidin	PerCP	-	BD Biosciencess
Durchflusszytometrie	Ziege anti-Ratte 488	Alexa 488	-	Molecular Probes
Durchflusszytometrie	Ziege anti-Ratte 647	Alexa 647	-	Molecular Probes
Stimulation	Hamster anti-maus CD28	-	37.51	BD Biosciencess
Stimulation	Hamster anti-Maus CD3 ϵ	-	145.2C11	Aus Hybridom-Zell Überstand

2.1.7 Oligonukleotide

Oligonukleotid	Sequenz
mIL-17 <i>forward</i>	5'- gttaagcttGCAGCAGCGATCATCCC -3'
mIL-17 <i>reverse</i>	5'- caactcgagTTcGGCTGCCTGGCGGAC -3'
β -Aktin <i>forward</i>	5'- AGAGGGAAATCGTGCGTGAC -3'
β -Aktin <i>reverse</i>	5'- AGGCCGCTTTATGTTGAAACC-3'
Oligo-dT	5'- TTTTTTTTTTTTTTTTTT -3'
CpG ODN 1668	5'- T*C*C*A*T*G*A*C*G*T*T*C*C*T*G*A*T*G*C*T -3' * Phosphorothioation

2.1.8 Verbrauchsmaterialien und Geräte

ARIA Durchflusszytometer	BD Biosciences
Biorad 200/2,0 Constant Voltage	Biorad, München
ELISA Reader	MWG Biotech, Ebersberg
Eppendorfcups	Eppendorf, Hamburg
FACS Röhrchen	Sarstedt, Nümbrecht
Inkubatoren	Heraeus, Hanau
Kanülen	BD Biosciences
Laminair Flow HB 2448-Sterilbank	Heraeus
LSR II Durchflusszytometer	BD Biosciences
MACS Separation Columns	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Mikroskop	Olympus, Hamburg

Neubauer Zählkammer	Brand, Gießen
Pipetten, steril	Sarstedt
Spritzen	BD Biosciences
Sterilfilter 0,45 µm	PALL, Ann Arbor, USA
Zellkultur-Einsätze 0,4 µm	Greiner Bio-One, Solingen
UNITIPS (10 µl, 200 µl, 1000 µl)	Abimed, Langenfeld
Waagen: Sartorius R16OP & Sartorius L2200S	Sartorius, Göttingen
Zentrifugen: Eppendorf 5810R	Eppendorf
Eppendorf 5417R	Eppendorf
Zentrifugenröhrchen	BD Biosciences
Zellsiebe	BD Biosciences

2.2 Methoden

2.2.1 Immunisierungen

Allen verwendeten Versuchstieren wurde 100 µg Ovalbumin (OVA) zusammen mit angegeben Adjuvantien in einem Volumen von 50 µL subkutan (s.c.) in die hintere Pfote gespritzt.

Adjuvans	Applikation
CpG ODN 1668	8 nmol
Alum	Mischverhältnis 1:2 mit OVA
IFA	Mischverhältnis 1:2 mit OVA

2.2.2 Isolation von primären Lymphozyten

Die Mäuse wurden mittels zervikaler Dislokation getötet, mit Ethanol (70 %) desinfiziert und geöffnet. Der ableitende, popliteale Lymphknoten wurde entfernt, in 1 mL PBS, 2 % FKS gegeben und auf Eis gestellt.

Methode 1: mechanische Präparation

Mit zwei Pinzetten wurde das Organ in einer Petrischale zerrissen und über ein Zellsieb (Maschenweite 40 µM) in ein 50 mL Röhrchen überführt. Das Zellsieb wurde mehrmals mit Waschpuffer gespült, um möglichst viele Zellen in das Röhrchen zu überführen und die Organhülle zurückbleibt. Die Zellen werden in PBS / 2 % FKS aufgenommen und gezählt.

Methode 2: enzymatische Präparation

Das präparierte Organ wurde in 500 µL HANKS Puffer aufgenommen und mithilfe von Collagenase D (1 mg/mL) bei 37 °C verdaut. Nach 30 min wurde die Reaktion mit EDTA ($c_{\text{END}} = 5 \text{ mM}$) abgestoppt, mit 8 mL Waschpuffer aufgefüllt und für 10 min bei 250 x g und 4 °C zentrifugiert. Danach wurde nochmals mit 8 mL Waschpuffer gewaschen. Die Zellen wurden in PBS / 2 % FKS aufgenommen und gezählt.

2.2.3 Isolation von Milzzellen

Die Mäuse wurden wie in 2.2.2 getötet und geöffnet. Die Milz wurde durch ein Zellsieb ausgestrichen und die Zellsuspension in ein 50 mL Röhrchen überführt. Danach wurden die Zellen zentrifugiert (10 min, 250 x g, 4 °C) und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde mit 5 mL Erylysepuffer resuspendiert und für 10 min bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss daran wurde 40 mL Waschpuffer zugegeben und 10 min (4°C, 250 x g) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und der Waschschrift wiederholt. Die Zellen wurden in PBS / 2 % FKS aufgenommen und gezählt.

2.2.4 Isolation von Knochenmarkzellen

Die Mäuse wurden wie in 2.2.2 getötet und geöffnet. Die Oberschenkelknochen wurden mit einem Skalpel vom umgebenden Muskel befreit und durch Abtrennen der Sehnen an Fuß und Knie präpariert. Der Knochen wurde 2 min in Isopropanol eingelegt, danach mit PBS gewaschen und an beiden Enden mit einer Schere geöffnet. Mit eiskaltem PBS wurde der Knochen mit einer Spritze mehrmals gespült. Die so erhaltenen Knochenmarkzellen wurden zentrifugiert, in PBS / 2 % FKS aufgenommen und gezählt.

2.2.5 Isolation von Zellen aus dem Fuß

Die Füße wurden abgetrennt, die Zehen entfernt. Die Füße wurden mit einem Skalpel in kleine Stücke geteilt und in 1 ml HANKS Puffer aufgenommen. Die Fußstücke wurden danach zum Verdau mit 1 mg/ml Collagenase D versetzt und 30 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von EDTA (Endkonzentration: 5 mM) gestoppt. Die „Fuß-Masse“ wurde durch Zerreiben über ein Stahlsieb weiter homogenisiert und die erhaltene Zellsuspension wurde für weitere Analysen verwendet.

2.2.6 Bestimmung der Lebend-Zellzahl

Die Zahl lebender Zellen aus den verschiedenen Organen wurde mit Trypanblau und der Neubauer-Zählkammer mikroskopisch bestimmt. Lebende Zellen nehmen Trypanblau nicht auf, tote Zellen erscheinen blau. Die Zählkammer besteht aus 4 x 16 Quadraten. Nicht blaue Zellen in den 16-Quadraten-Blocks werden gezählt und die 4 erhalten Zellzahlen der jeweiligen Blöcke werden gemittelt. Die Zellzahl kann mit folgender Formel (ohne Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors) berechnet werden:

$$\text{Mittelwert der Zellzahl der 4 Blöcke} = \text{Zellzahl} \times 10^4 / \text{mL}$$

2.2.7 Durchflusszytometrie

Für die durchflusszytometrischen Analysen von Zellen wurde das LSR II Durchflusszytometer von BD Biosciences benutzt. Die verwendete Analysensoftware war DIVA. Lebende und tote Zellen konnten durch 2 Parameter unterschieden werden, den sog. *Forward Scatter* und *Side Scatter*. Dabei wird die Größe und Granularität der Zellen bestimmt. Beide Parameter werden in linearer, alle Fluoreszenz-Parameter in logarithmischer Darstellung ausgewertet. Die

fluoreszenzmarkierten Zellen wurden bei konstanter Fließgeschwindigkeit gemessen.

Für die Markierung der verschiedenen Antigene an der Oberfläche der Zellen wurden monoklonale Antikörper verwendet, die ein Fluorochrom gebunden haben. Es wurden je 1×10^6 Zellen in 50 μL PBS, 2 % FCS gelöst und die Antikörper in der jeweiligen Verdünnung zugegeben. Nach 20 minütiger Inkubation bei 4 °C wurde zum Ansatz 2 mL FACS-Puffer gegeben, zentrifugiert (7 min, 250 x g, 4 °C) und das Pellet in 300 μL FACS-Puffer pro 1×10^6 Zellen gelöst.

Für Färbungen von Zellen mit nicht-markierten Antikörpern wurde ein fluoreszenzmarkierter Sekundär-Antikörper gegen das Epitop des Erst-Antikörpers benutzt. Danach wurden die noch freien F_{ab} Teile des Sekundär-Antikörpers mit Serum aus dem Tier des Sekundär-Antikörpers geblockt. Nachfolgende Antikörper konnten so nicht mehr durch den Sekundär-Antikörper gebunden werden und falsch positive Signale wurden verhindert.

2.2.8 Intrazelluläre Markierung mit Antikörpern

Frisch isolierte oder *in vitro* reaktivierte Mauszellen wurden für 4 h mit PMA (80 ng/mL) und Ionomycin (1 μM) zusammen mit GolgiStop (nach Herstellerangaben) bei 37 °C in Kulturmedium inkubiert. Dabei induziert PMA eine Aktivierung der Proteinkinase C und Ionomycin führt zur Freisetzung von Ca^{2+} Ionen. Beides führt zur Stimulation der Zelle und ahmt die T-Zell-Rezeptor-Aktivierung nach. Das im GolgiStop enthaltene Monensin stoppt den Golgi-Transport, sodass intrazellulär gebildete Zytokine die Zelle nicht mehr verlassen können.

Zur intrazellulären Färbung wurde der *Cytofix/Cytoperm Kit* nach Angaben des Herstellers verwendet. Dabei wird durch eine saponinhaltige Lösung die Membran der Zellen durchlässig für die fluoreszenzmarkierten Antikörper, die gegen unterschiedliche Zytokine gerichtet sind. So kann mittels Durchflusszytometrie der Anteil an Zellen ermittelt werden, der spezifische Zytokine produziert.

2.2.9 Zellseparation

Zellseparation mit MACS

Einzelne T-Zell-Subpopulationen können mit dem MACS-Separationsverfahren voneinander getrennt werden. Dazu werden an spezifische Antikörper paramagnetische Teilchen gebunden. Die modifizierten Antikörper binden das Antigen an der Oberfläche der Zellen. Im magnetischen Feld werden so markierte Zellen auf einer Säule zurückgehalten, während nicht markierte Zellen durch die Säule fließen. Entfernt man die Säule aus dem magnetischen Feld können die zurückgehaltenen Zellen eluiert werden.

Primäre Mauszellen aus Milz und Lymphknoten wurden in einer Konzentration von 1×10^7 in 90 μL MACS-Puffer gelöst. Zu jedem 90 μL Ansatz wurden 10 μL MACS-beads gegeben und für 15 min bei 4 $^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Danach wurden die Zellen mit dem 10 – 20fachen Volumen mit MACS-Puffer gewaschen. Das Zellpellet wurde in einer Konzentration von 1×10^8 Zellen pro 500 μL MACS-Puffer gelöst. In der Zwischenzeit wurde die MACS-Säule (Größe: LS) in das Magnetfeld gebracht und mit 3 mL MACS-Puffer äquilibriert. Die Zellen wurden auf die Säule gegeben und es wurde dreimal mit je 3 mL MACS-Puffer gewaschen. Der Durchlauf enthielt die nicht markierten Zellen. Die Säule wurde aus dem Magnetfeld genommen und mit 5 mL MACS-Puffer wurden die markierten Zellen eluiert. Die Ausbeute einer MACS-Separation lag bei über 94 % positiver Zellen.

Zellseparation mit FACSAria

Als ein weiteres Verfahren der Zellsortierung wurde die Durchflusszytometrie angewendet. Aufgrund der Expression von Oberflächenmolekülen wurden die Zellen in verschiedene Zellpopulationen sortiert. Markierte Zellen werden bei diesem Verfahren zunächst analysiert und dann in Tröpfchen von Laufpuffer-Flüssigkeit verpackt, die eine spezifische elektrische Ladung erhalten. Anschließend werden sie innerhalb eines elektrischen Feldes in Auffangröhrchen gelenkt, die mit FKS gefüllt sind. Maximal können vier unterschiedliche Populationen sortiert werden.

Zum Sortier-Vorgang wurden die pelletierten Zellen in einer Dichte von 1×10^7 Zellen in 100 μL PBS resuspendiert.

Die Zellen wurden mit folgenden Antikörpern markiert:

CCR6 + anti-Ratte Alexa488
CD4 Pacific Blue
CD44 APC
CD62L PE

Es wurde in folgende Populationen sortiert:

CD4⁺ CD44^{int} CD62L⁺
CD4⁺ CD62L⁻ CD44^{high} CCR6⁺
CD4⁺ CD62L⁻ CD44^{high} CCR6⁻
CD4⁺ CD62L⁻ CD44^{int} CCR6⁻

Die Reinheit des Sort-Vorgangs lag bei mehr als 98 %.

2.2.10 Polyklonale und antigenspezifische Stimulation von primären Mauszellen

Isolierte, primäre Zellen aus Milz und Lymphknoten wurden in einer Konzentration von $0,5 \times 10^6$ Zellen pro 200 μ L Kulturmedium in einer 96-Loch Platte gebracht. Zur polyklonalen Stimulation wurden die Platten vorher mit anti-CD3 ($c = 5 \mu\text{g/mL}$) in einem Volumen von 50 μ L Tris/HCL (50 mM; pH 8,8) beschichtet und bei 37 °C inkubiert. Nach 2 h wurden die Platten mit 250 μ L Kulturmedium zweimal gewaschen. Bei antigenspezifischer Stimulation wurden zu den Zellen OVA in einer Konzentration von 100 $\mu\text{g} / \text{mL}$ gegeben.

2.2.11 CFSE-Markierung von Zellen

Die Proliferation von Zellen *in vitro* und *in vivo* kann mit CFSE (Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester) nachgewiesen werden. CFSE bindet an Aminogruppen intrazellulärer Proteine und kann nicht mehr aus der Zelle austreten. Aufgrund der

fluoreszierenden Eigenschaft von CFSE kann die Proliferation von Zellen gemessen werden. Mit jeder Teilung halbiert sich die Intensität des Signals.

Primäre Zellen aus sekundär-lymphatischen Organen wurden in einer Konzentration von 1×10^7 Zellen pro 1 mL PBS resuspendiert und mit CFSE ($c = 1,25 \mu\text{M}$) versetzt. Nach 10 min Inkubation bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ wurde das 10fache Volumen PBS / 2 % FKS zugegeben und die Zellen zentrifugiert (10 min, $4 \text{ }^\circ\text{C}$, $250 \times g$). Der Schritt wurde wiederholt und die Zellen in Kulturmedium resuspendiert.

2.2.12 *In vitro* Kultur von Knochenmarkzellen und Th17 Zellen

Der Oberschenkelknochen wurde, wie in 2.2.4 erläutert, entnommen. Die erhaltene Zellsuspension wird zentrifugiert (10 min, $4 \text{ }^\circ\text{C}$, $250 \times g$) und in Kulturmedium aufgenommen. Für die Versuche wurde das Medium mit $\text{CD4}^+\text{CCR6}^-$ oder $\text{CD4}^+\text{CCR6}^+$ Zellen versetzt. Die sortierten Zellen befanden sich in einem mit anti-CD3 beschichteten Zellsieb (Durchmesser: $0,4 \mu\text{m}$), um den Zell-Zell Kontakt zwischen Knochenmark und sortierten Zellen zu verhindern, aber den Austausch von löslichen Stoffen zuzulassen. Sechs bzw. acht Tage nach Ansatz der Kultur wurden Überstände abgenommen und die darin enthaltenen Zytokine mittels ELISA und Bender Multiplex Kit (Th1/Th2 10plex) nach Angaben des Herstellers analysiert. Letzteres System hat den analytischen Vorteil, aus einem Volumen von nur $25 \mu\text{L}$ zehn verschiedene Zytokine gleichzeitig messen zu können.

2.2.13 RNA-Präparation aus sortierten Zellen nach Macherey Nagel

Sortierte Zellen (siehe 2.2.7) wurden zentrifugiert (10 min, $4 \text{ }^\circ\text{C}$, $250 \times g$) und in $350 \mu\text{L}$ RA1 Puffer + $3,5 \mu\text{L}$ β -Mercaptoethanol aufgenommen. Die RNA-Isolation erfolgte nach Anweisung des Herstellers. Dabei wurden die Nukleinsäuren der Zelle mit Ethanol stabil an die Filtermembran gebunden, um bei den Reinigungsschritten nicht verloren zu gehen. Durch einen 15 min DNase Schritt wurde die DNA verdaut, um reine RNA zu gewinnen. Restliche genomische DNA führt zu unerwünschten

PCR-Produkten und verfälscht das Ergebnis. Die erhaltene RNA wurde in 50 μL RNase freiem Wasser bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt und ist so einige Wochen haltbar.

2.2.14 Herstellung von cDNA und PCR

Die aus 2.2.11 gewonnene RNA wurde in cDNA umgeschrieben. Zur Synthese der cDNA wurde folgender Ansatz verwendet:

Ansatz 1	
Template vorbehandeln	1-fach [μL]
Oligo-dT (50 μM)	1
RNA (200 ng – 1 μg)	3
Wasser	6
Gesamt	10

Mastermix	1-fach [μL]
RNasin 40 units/ μL	0,5
5xcDNA-Synthese Puffer	4
Wasser	3,5
dNTP-Mix (10 mM)	2
M-MLV Punktmutation rt (200 U/ μL)	0,5
Gesamt	10

Durchführung:

Ansatz 1 wurde zum denaturieren 5 min bei $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert und anschließend auf Eis gestellt. 10 μL Template wurden zu 10 μL Mastermix gegeben und für 5 min bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Die reverse Transkription erfolgte bei $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ innerhalb einer Stunde. Danach wurde die Temperatur für 10 min auf $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ erhöht, um die reverse Transkriptase zu denaturieren. Das Einsatz-Volumen für die anschließende PCR betrug 1-2 μL .

PCR:

Es wurden β -Aktin und IL-17 Primer verwendet. Zur Vervielfältigung der cDNA wurde folgender PCR-Ansatz verwendet:

Mastermix	1-fach [μL]
GoTaq MM	20
DEPC-Wasser	16,4
Ansatz	36,4
Primer Sense (200 μ M)	0,8
Primer Antisense (200 μ M)	0,8
Zwischensumme	38
cDNA	2
Gesamt	40

Die PCR beinhaltet folgende Schritte:

Denaturieren: 2 min 94 °C (hot-start)
35x 94 °C 30''
58 °C 30''
72 °C 30''

10 μ L des Gesamt-Ansatzes wurden in ein 1,5 %iges Agarose Gel (inkl. Ethidiumbromid) aufgetragen (80 V, ca. 90 min). Anschließend wurde das Gel unter einer UV-Lichtquelle fotografiert.

2.2.15 ELISA

Die Bestimmung von löslichem IL-17 und IFN- γ erfolgte nach Angaben des Herstellers (R&D Duo ELISA Kit).

2.2.16 BrdU Markierung von Zellen aus dem Fuß

Das Trinkwasser der Mäuse wurde mit 5-Bromo-2-deoxyuridine (BrdU: 800 mg/ml) versetzt. BrdU wird anstelle von Thymidin in die DNA proliferierender Zellen eingebaut. Nach drei Tagen wurden die Mäuse getötet und die Isolation der Zellen aus dem Fuß erfolgte wie in 2.2.5 beschrieben. Danach wurden die Oberflächenmoleküle mit fluoreszierenden Antikörpern markiert. Die Markierung des intrazellulär eingebauten BrdU erfolgte mittels *BrdU Flow Kit* (BD Biosciences) nach Anweisung des Herstellers. Zur Detektion des BrdU wurde anti-BrdU FITC verwendet. BrdU positive Zellen zeigten den Anteil an sich teilenden Zellen innerhalb des Fütterungszeitraums.

2.2.17 Zelltransferversuche

Für Zelltransferversuche wurden kongene Mäuse verwendet, d.h. sie zeigen phänotypisch nur einen Unterschied. Leukozyten aus Mäusen mit C57BL/6 Hintergrund tragen auf der Oberfläche CD45.2 (wt) oder CD45.1. Transferiert man Zellen von einer Maus in die andere, werden diese Zellen nicht als fremd erkannt, können aber mit den Markern CD45.1 bzw. CD45.2 unterschieden werden.

Die zu transferierenden Zellen wurden mit Antikörpern markiert, sortiert und in gewünschter Konzentration in PBS aufgenommen. Der Transfer erfolgte in die Schwanzvene in einem Volumen von 250 μ L. Die Empfängermause wurden wenige Minuten einer Wärmebestrahlung (Rotlicht) ausgesetzt, um die Venen zu erweitern.

2.2.18 Induktion einer EAE

SJL/J Mäuse wurden durch subkutane Injektion von 200 µg PLP (Aminosäuren 139-151) zusammen mit Kompletten Freund'schen Adjuvant immunisiert. Nach zehn Tagen wurden die ableitenden Lymphknoten entnommen und daraus eine Zellsuspension gewonnen. Die Lymphozyten wurden mit fluoreszierenden Antikörpern markiert und in folgende Fraktionen aufgeteilt:

$$CD4^{-} \quad / \quad CD4^{+}CCR6^{-} \quad / \quad CD4^{+}CCR6^{+}$$

Nach dem Sortiervorgang wurden die verschiedenen Fraktionen wieder zu den Ausgangsanteilen zusammengesetzt, mit der Unterscheidung, dass eine Fraktion $CD4^{+}CCR6^{+}$ Zellen enthielt, die andere nicht. So wurden alle Zellen gleich beansprucht und Effekte des Sortiervorgangs waren bei allen Zellfraktionen identisch. Die Fraktion, die alle Zellen des Lymphknotens enthielt (Fraktion 1) und die Fraktion, bei denen die $CD4^{+}CCR6^{+}$ Fraktion depletiert worden war (Fraktion 2), wurden *in vitro* mit 5 µg/ml PLP restimuliert. Nach 72 h war die Expansionsphase der autoreaktiven Zellen abgeschlossen und die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden $3,5 \times 10^6$ Zellen von Fraktion 1 oder von Fraktion 2 in SJL/J Empfängermäuse i.p. transferiert. Das Gewicht und der Verlauf der Erkrankung wurden dokumentiert. Dabei wurde folgendes klinisches Bewertungssystem erhoben:

0	≐	keine klinischen EAE Symptome
0,5	≐	partielle Schwanzlähmung
1,0	≐	komplette Schwanzlähmung
1,5	≐	leichte Hinterbeinschwäche
2,0	≐	fortgeschrittene Hinterbeinschwäche, Ataxie
2,5	≐	Parese der Hinterbeine
3,0	≐	Plegie der Hinterbeine
3,5	≐	Plegie der Hinterbeine mit Parese der Vorderbeine
4,0	≐	Tetraplegie
4,5	≐	moribund
5,0	≐	Tod

2.2.19 Chronisch subordinierte Koloniehaltung

Als Versuchstiere wurden ausschließlich männliche C57BL/6N Mäuse im Alter zwischen 36 und 45 Tagen und einem Gewicht von ca. 20 g verwendet. Vor dem Start der Experimente wurden alle Tiere für mindestens sieben Tage einzeln gehalten. Die Auswahl der dominanten C57BL/6N Mäuse (Resident), die zwischen 30-35 g schwer waren, erfolgte nach dem Aggressivitäts-Test. Dabei müssen die Tiere zwar dominant gegenüber anderen Mäusen sein, dürfen diese allerdings nicht durch Bisse verletzen.

Zum Versuchsbeginn wurden alle Mäuse gewogen und in zwei Gruppen zu je vier Mäusen mit gleichem mittlerem Gewicht aufgeteilt. Bei der Kontrollgruppe wurden die Tiere während des gesamten Versuchs einzeln in Käfigen gehalten (*Single Housed Controls* = SHC). Der chronisch-psychoziale Stress wurde durch das sog. *Chronic Subordinate Colony Housing* (CSC) verursacht. Dabei wurde zunächst ein dominantes Männchen für zwei Stunden in den Versuchskäfig gesetzt, damit es sich zusätzlich zu seinem Aggressivitäts- und Gewichts-Vorteil einen territorialen Bonus verschaffen konnte. Danach wurden 4 subordinierte Versuchstiere zu dem dominanten Männchen gesetzt. Nach 8 und 15 Tagen wurde das dominante Männchen gegen ein neues ausgetauscht, um Gewöhnungseffekte zu minimieren. Nach insgesamt 20 Tagen wird davon ausgegangen, dass die Tiere einem chronischen Stress ausgesetzt waren. Für weitere Untersuchungen, v. a. des Immunstatus, wurden die Tiere getötet.

2.2.20 Analyse von peripheren Lymphknoten von CSC Mäusen

Die inguinalen und axialen Lymphknoten wurden entnommen und eine Zellsuspension wurde hergestellt. Eine intrazelluläre Markierung von IL-17 und IFN- γ wurde wie in 2.2.7 beschrieben mit einem Teil der Zellen durchgeführt.

Der andere Teil der Zellen wurde in 96 Loch Platten in einer Konzentration von 1×10^6 Zellen pro mL zu je 200 μ L pro well ausgesät. Die Platte war zuvor mit anti-CD3 (c = 5 μ g/mL) beschichtet worden. Zu einem Teil der Zellen wurde Dexamethason

(c = 1 μ M) gegeben, der andere Teil blieb ohne weitere Zusätze. Nach 24 h wurde eine intrazellulär Markierung von IL-17 und IFN- γ durchgeführt.

2.2.21 Statistik

Die Fehlerbalken repräsentieren SD. Zur statistischen Analyse wurde der unpaarige, zwei-schwänzige *Student's t test* verwendet, falls nicht anders gekennzeichnet. Alle Werte für $p < 0,05$ wurden als signifikant erachtet. Bei den EAE Experimenten wurde der *Mann-Whitney U test* verwendet. Auch hier wurden Werte von $p < 0,05$ als signifikant bestimmt.

3. Ergebnisse

Chemokinrezeptoren, wie z.B. CCR5 und CCR7, spielen bei der Aktivierung von naiven T-Zellen eine wichtige Rolle (Bromley et al., 2000; Campbell et al., 1999; Oppermann, 2004; Randolph et al., 1999). Es konnte gezeigt werden, dass CCR6 exklusiv auf Gedächtnis-T-Zellen zu finden ist und nach Aktivierung von T-Zellen verstärkt exprimiert wird (Ebert et al., 2002; Sallusto et al., 2000). Wir postulieren daher, dass CCR6 für die Entwicklung und Funktion von Gedächtniszellen eine wichtige Rolle spielt. Im Folgenden wollen wir anhand verschiedener Mausmodelle die Funktion von CCR6 auf Th Zellen aufklären.

3.1 Phänotypisierung von CCR6-positiven Th Zellen während der Immunreaktion

3.1.1 Analyse CCR6-positiver Th Zellen während der Homöostase

3.1.1.1 Aktivierungsstatus CCR6-positiver und CCR6-negativer Th Zellen

Zunächst wurden verschiedene Kompartimente unbehandelter Mäuse nach CCR6-positive T-Zellen mittels Durchflusszytometrie analysiert. Es wurden Zellen aus Blut, Lymphknoten und Milz isoliert und mit anti-CD4, anti-CD8 und anti-CCR6 markiert. $6,2 \pm 1,5$ % der $CD4^+$ T-Zellen in den peripheren Lymphknoten zeigten CCR6 Expression, während nur $1,7 \pm 0,3$ % der $CD8^+$ T-Zellen CCR6 auf ihrer Oberfläche exprimierten (Abb.3 A,B). In der Milz exprimierten $2,4 \pm 0,5$ % und im Blut $2,0 \pm 0,8$ % der $CD4^+$ Zellen CCR6 auf ihrer Oberfläche (Abb. 3B). Somit sind $CD4^+$ Zellen die dominante CCR6 exprimierende T-Zell-Population und der prozentuale Anteil der $CD4^+CCR6^+$ Zellen ist in den peripheren Lymphknoten signifikant höher als in Milz und Blut.

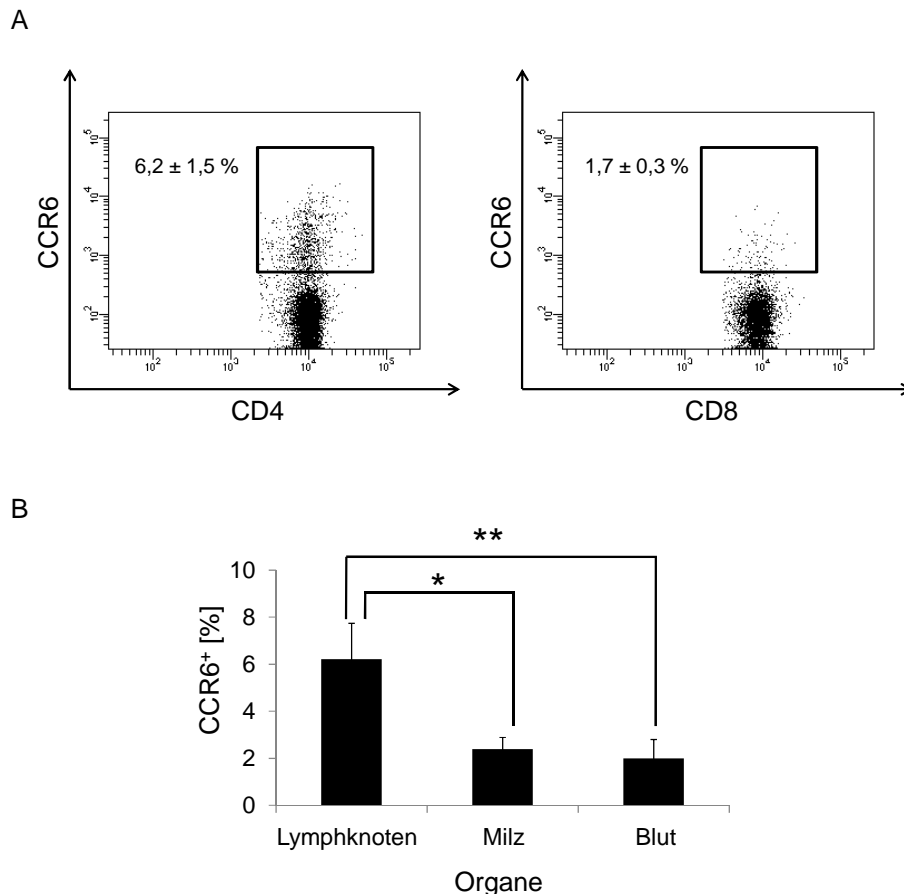


Abb. 3: Die Expression von CCR6 auf T-Zellen in sekundär lymphatischen Organen und im Blut. Zellen aus dem Blut, den inguinalen und poplitealen Lymphknoten und der Milz von naiven C57BL/6 Mäusen ($n = 3$) wurden durchflusszytometrisch untersucht. (A) Gezeigt ist der prozentuale Anteil (\pm SD) CCR6 positiver $CD4^+$ und $CD8^+$ Zellen in den Lymphknoten. (B) Der prozentuale Anteil an CCR6⁺ Zellen innerhalb der $CD4^+$ Zellfraktion in den Lymphknoten, der Milz und im Blut ist gezeigt. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Zur weiteren Charakterisierung von CCR6-positiven Th Zellen wurden Zellen aus den Lymphknoten isoliert und der Aktivierungsstatus von $CD4^+CCR6^+$ Zellen in naiven Mäusen analysiert. Dazu wurde die Expression von CD62L (L-Selektin), CD45RB, CD69 und CD44 auf $CD4^+CCR6^+$ Zellen untersucht. Während CD62L und CD45RB auf aktivierten Zellen wenig oder nicht exprimiert wird, ist auf aktivierten Zellen CD69 verstärkt zu finden. Der Rezeptor CD44 ist auf allen Zellen zu finden, doch weisen nicht aktivierte Zellen eine niedrigere CD44 Expression auf, als aktivierte Zellen. Deswegen teilt man die Expression in $CD44^{int}$ (*intermediate*) und $CD44^{high}$ ein. Abbildung 4 zeigt die erhöhte Expression von CD69 und CD44 und eine verminderte Expression von CD62L und CD45RB auf $CCR6^+$ Th Zellen.

CD4⁺CCR6⁺ Zellen unbehandelter Tiere zeigen somit einen aktivierten Phänotyp ohne Applikation einer Impfung oder Infektion.

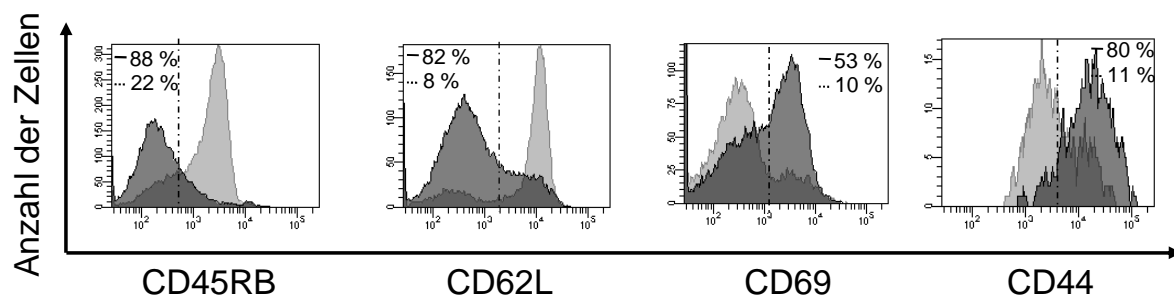


Abb. 4: Aktivierungsstatus CCR6⁺ Th Zellen. Aus Lymphknoten unbehandelter C57BL/6 Mäuse wurden Zellen isoliert, mit fluoreszierenden Antikörpern markiert und durchflusszytometrisch analysiert. Gezeigt ist die Expression der jeweiligen Aktivierungsmarker auf CD4⁺CCR6⁺ (schwarze Linie) und CD4⁺CCR6⁻ (graue Linie) Zellen. Die Abbildung ist repräsentativ für 3 unabhängige Experimente mit jeweils 3 Tieren.

3.1.1.2 Zytokinproduktion CCR6-positiver und CCR6-negativer Th Zellen

Aus 3.1.1 wurde ein aktivierter Phänotyp der CCR6-positiven Th Zellen festgestellt. Um die Funktion dieser Th Zellen zu testen wurde im Folgenden untersucht, ob CD4⁺CCR6⁺ Zellen Zytokine produzieren können und welche. Wir testeten die Produktion von IFN- γ (Th1), IL-4 (Th2), IL-10 (Treg) und IL-17 (Th17). Alle IL-17 produzierenden Zellen lagen innerhalb der CCR6 positiven Th Zellfraktion, wobei $16,1 \pm 4,7$ % der CD4⁺CCR6⁺ Zellen IL-17 produzierten. CCR6-negative Th Zellen wiesen im Gegensatz dazu keine IL-17 Produktion auf, doch waren alle IFN- γ Produzenten innerhalb der CD4⁺CCR6⁻ Fraktion (Abb. 5). CD4⁺CCR6⁺ Zellen zeigten keine IFN- γ Produktion, sezernierten weder IL-4 noch IL-10 (Daten nicht gezeigt) und waren so eindeutig den Th17 Zellen zuzuordnen.

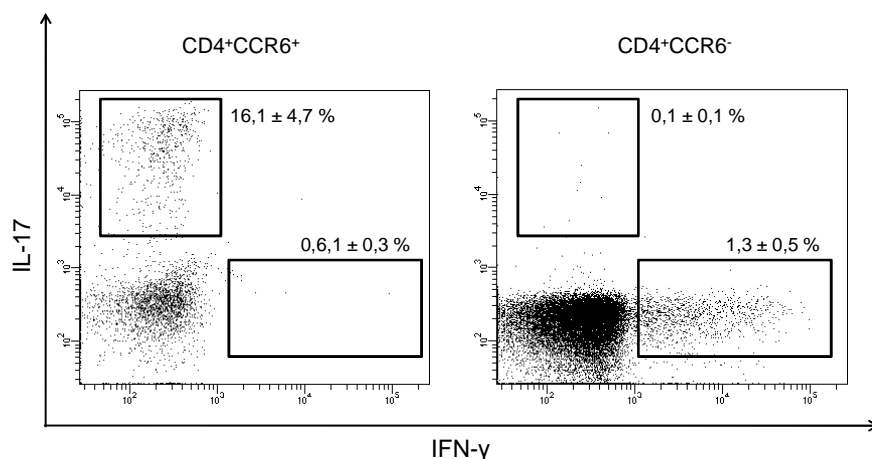


Abb. 5: Zytokinproduktion CCR6-positiver und CCR6-negativer Th Zellen. Lymphknotenzellen aus naiven C57BL/6 Mäusen wurden isoliert und Lymphozyten wurden durchflusszytometrisch analysiert. Gezeigt sind CD4⁺CCR6⁺ (linke Abbildung) und CD4⁺CCR6⁻ (rechte Abbildung) Zellen. Der Prozentsatz an IL-17 und IFN-γ positiven Th Zellen ist dargestellt. Die Prozentzahlen ergeben sich aus dem Mittelwert (± SD) von 3 unabhängigen Experimenten mit jeweils 3 Mäusen.

3.1.1.3 Weitergehende Phänotypisierung von Th17 Zellen

Abbildung 5 zeigte, dass etwa 16 % der CD4⁺CCR6⁺ Zellen IL-17 produzierten. Zur genaueren Eingrenzung von Th17 Zellen sind somit weitere spezifische Oberflächenmoleküle nötig. Mittels Durchflusszytometrie ist es möglich, mehrere Oberflächenmoleküle auf einer Zelle gleichzeitig zu detektieren. CCR6-positive Th Zellen zeigen während der Homöostase einen Phänotyp, der den von aktivierten Zellen entspricht: Sie zeigen eine hohe CD44 und niedrige CD62L Expression auf ihrer Oberfläche. Die Produktion von IL-17 korrelierte ebenfalls mit der Expression von CD44. Wie bei dem Th17 Zellmarker CCR6 waren alle Th17 Zellen innerhalb der CD4⁺CD44^{high} Population. Allerdings enthielt diese Population auch andere, nicht-IL17-produzierende Zellen; 11,75 ± 1,45 % der CD4⁺CD44^{high} Zellfraktion sezerniert IL-17 (Abb. 6). Die Kombination aus CCR6 und CD44 erhöhte den prozentualen Anteil an IL-17-positiven Zellen erheblich. 31,3 ± 3,2 % der CD4⁺CCR6⁺CD44^{high} Zellen produzierten IL-17. Somit kann die Fraktion der Th17 Zellen mit CCR6 und CD44 besser eingegrenzt werden.

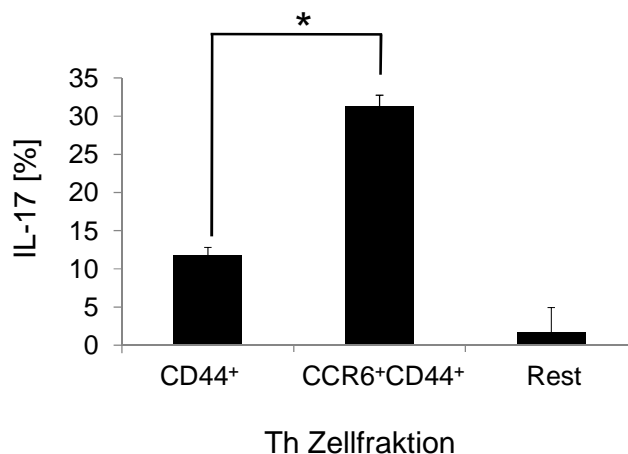


Abb. 6: CCR6 und CD44 charakterisieren Th17 Zellen. Die peripheren Lymphknoten von naiven C57BL/6 Mäusen wurden entnommen. Die daraus gewonnenen Zellen wurden zusammengefügt. Die Markierung von Oberflächenmolekülen und intrazellulären IL-17 wurde sofort *ex vivo* durchgeführt. Gezeigt ist der prozentuale Anteil (\pm SD) an IL-17⁺ Zellen innerhalb der verschiedenen Th Zellfraktionen. Die Daten stammen aus 2 unabhängigen Experimenten mit jeweils 3 Mäusen. * $p < 0,05$.

Wir stellten bereits fest, dass CD4⁺CCR6⁺ Zellen neben der erhöhten Expression von CD44 außerdem eine niedrige CD62L Expression zeigen. Somit könnten diese Marker die Population der Th17 Zellen noch besser eingrenzen. Da nach T-Zell-Aktivierung die CD62L-Oberflächenexpression stark abnimmt, was zum größten Teil auf *shedding* beruht, ist aus technischen Gründen der gleichzeitige Zytokin-Nachweis mit CD62L nicht möglich (siehe Material und Methoden). Deswegen modifizierten wir die Nachweismethode und verwendeten Zellen aus den Lymphknoten von naiven Mäusen, ohne diese Zellen zu stimulieren. Wir markierten CD4-positive Zellen zusätzlich mit anti-CD62L, anti-CD44 und anti-CCR6 und sortierten die Th Zellen in verschiedene Subpopulationen (Tab. 2). Aufgrund ihrer Expression der verschiedenen Oberflächenmoleküle teilten wir die Zellen in Th17, Effektor Th (T_{eff}), aktivierte und naive T-Zellen ein. Zur Bestimmung der IL-17 Sekretion wurden die verschiedenen Fraktionen *in vitro* polyklonal 3 Tage stimuliert und aus den Überständen IL-17 Protein ermittelt (Abb. 7). 1510 pg/ml von 1756 pg/ml, also mehr als 85 % des produzierten IL-17 Proteins, stammte aus der CD4⁺CD62L⁻CD44^{high}CCR6⁺ Zellfraktion. Alle anderen Th Zellfraktionen waren nicht oder nur sehr eingeschränkt in der Lage, IL-17 zu produzieren.

Tabelle 2: Sortier-Schema

Fraktionen	Sortierung	Bezeichnung
1	CD4 ⁺ CD62L ⁻ CD44 ^{high} CCR6 ⁺	Th17 Zellen
2	CD4 ⁺ CD62L ⁻ CD44 ^{high} CCR6 ⁻	Effektor-Th Zellen (T _{eff})
3	CD4 ⁺ CD62L ⁻ CD44 ^{int}	aktivierte Th Zellen
4	CD4 ⁺ CD62L ⁺ CD44 ^{int}	naive Th Zellen

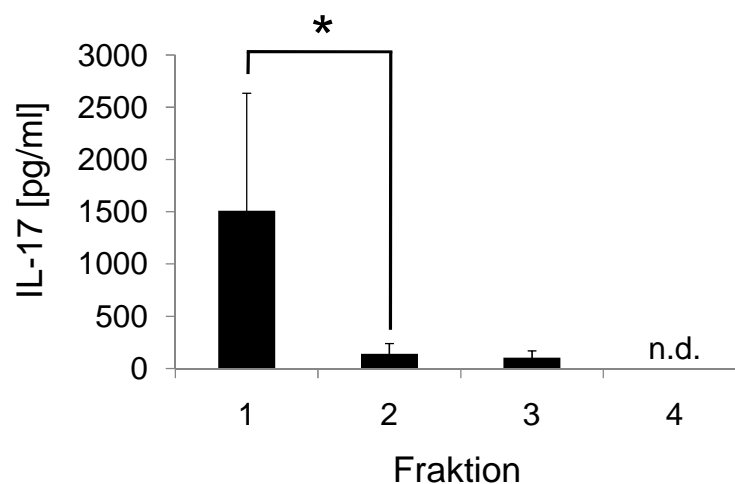


Abb. 7: CD4⁺CD62L⁻CD44^{high}CCR6⁺ Zellen sind der Hauptproduzent von IL-17. Periphere Lymphknoten aus naiven Tieren (n = 3) wurden entnommen. Lymphknotenzellen wurden in Fraktion 1-4 sortiert (siehe Tab. 2) und mit plattengebundenen anti-CD3 (c = 5 µg/ml) stimuliert. Nach 72 h wurden die Überstände abgenommen und die Menge an IL-17 Protein bestimmt. ELISA wurde in Duplikaten angefertigt. n.d. = nicht detektierbar. Die Daten stammen aus 2 unabhängigen Experimenten; * p < 0,05.

Bisher konnten wir mittels durchflusszytometrischen Methoden und ELISA die IL-17 Produktion den CCR6-positiven Th Zellen zuordnen. Die Expression von IL-17 auf molekularer Ebene konnte bisher nicht gezeigt werden. Daher wurde aus sortierten Zellen RNA isoliert, mit rt-PCR cDNA hergestellt und via PCR vervielfältigt (siehe

Material und Methoden). Die Expression von IL-17 mRNA war eindeutig der $CD4^+CD62L^-CD44^+CCR6^{high}$ Fraktion zuzuordnen; in keiner der anderen Fraktionen wurde IL-17 mRNA nachgewiesen (Abb. 8). Die geringe Intensität der Bande ist auf die geringe Anzahl der eingesetzten Zellen (ca. 10 000) zurückzuführen, da die Population weniger als 0,1 % der gesamten Lymphozytenpopulation des Lymphknotens darstellt. Die Banden im unteren Abschnitt des Gels sind Primer-Dimere. Als Positivkontrolle wurde die Expression von β -Aktin bestimmt. Die Negativkontrolle enthielt Wasser anstelle von cDNA.

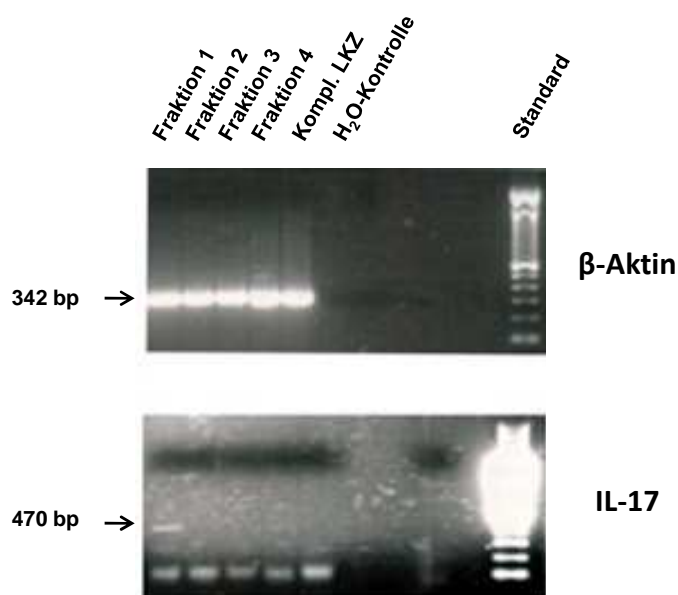


Abb. 8: Expression von IL-17 mRNA sortierter Zellen. Lymphknotenzellen aus unbehandelten Tieren wurden mittels durchflusszytometrischer Methoden sortiert. Aus den verschiedenen Th Zellfraktionen (1-4, siehe Tab. 2) wurde RNA isoliert, mittels rt-PCR cDNA generiert und mit PCR amplifiziert. Es wurden jeweils Vorwärts- und Rückwärtsprimer für IL-17 (oberes Bild) und β -Aktin (unteres Bild) verwendet. Als Standard wurde ein 100 Basenpaar Standard verwendet. Das Experiment wurde insgesamt dreimal angefertigt; gezeigt ist ein repräsentatives Agarosegel. LKZ = Lymphknotenzellen.

Die ersten phänotypischen Untersuchungen zeigten, dass durch die Verwendung der Oberflächenmoleküle CD62L und CD44 zusammen mit CCR6 Th17 Zellen gut eingegrenzt werden konnten. Die Identifikation und Analyse von Th17 Zellen gelang bisher nur durch die intrazelluläre Markierung von IL-17, was den Tod der Zelle bedingt. Die Charakterisierung von Th17 Zellen mittels Oberflächenmolekülen erlaubt weitere Untersuchungen dieser Zellen *in vitro* und *in vivo*, da nur so lebende Zellen isoliert werden können.

3.1.1.4 Expression von TLRs auf Th17 Zellen

Zellen des angeborenen Immunsystems sind die erste Verteidigungslinie beim Kampf gegen Pathogene. Ihnen gemeinsam ist die Expression von *Toll-like*-Rezeptoren (TLRs), mit denen sie molekulare Strukturen von Erregern erkennen. Die Rolle von Th17 Zellen bei der Abwehr von Infektionen ist noch nicht geklärt. Es konnte gezeigt werden, dass IL-17 in der frühen Phase der Immunantwort bei der Rekrutierung von Zellen des angeborenen Immunsystems eine wichtige Rolle spielt (Laan et al., 1999; Witowski et al., 2000). Th17 Zellen übernehmen so Aufgaben bei der Infekt-Abwehr, die klassischerweise den Zellen des angeborenen Immunsystems obliegen und werden als Bindeglied zwischen angeborenen und adaptiven Immunsystems angesehen (Stockinger et al., 2007). Wir testeten daher die Expression von TLR1-7 und TLR9 auf sortierten Th Zellen (siehe Tab. 2). In drei unabhängigen Experimenten konnte die exklusive Expression von TLR6 auf CD4⁺CD62L⁻CD44^{high}CCR6⁺ (= Th17) Zellen nachgewiesen werden (Tab. 3). TLR6 bildet, wie TLR1, Heterodimere mit TLR2. Diese Rezeptoren sind für die Erkennung von gram (+) und (-) sowie von Pilzen wichtig (Hajjar et al., 2001; Netea et al., 2008; Takeda et al., 2003), wobei TLR6 und TLR1 jeweils die Spezifität der Erkrankung regulieren. Die Bindungspartner von TLR1 und TLR6 sind Tri-Acyl- bzw. Di-Acyl-Lipopetide. Somit zeigen Th17 Zellen, die mit den oben angegebenen Oberflächenmarkern sortiert wurden, ähnliche Merkmale wie Zellen des angeborenen Immunsystems. Es konnte auf RNA Ebene keine TLR2 Expression nachgewiesen werden. Gründe dafür können eine niedrige Expressionsrate oder die fehlende Aktivierung der untersuchten Zellen sein.

Tabelle 3: Expression von TLRs auf sortierten Th Zellen

	TLR1	TLR2	TLR3	TLR4	TLR5	TLR6	TLR7	TLR9
Th17 Zellen (Fraktion 1)	+	-	-	-	-	+	-	-
T _{eff} Zellen (Fraktion 2)	+	-	-	-	-	-	-	-
naive Zellen (Fraktion 3)	+	+	-	+	-	-	-	+
aktivierte Zellen (Fraktion 4)	+	-	-	+	-	-	-	+

3.1.2 CCR6 positive Th17 Zellen während der Immunantwort

3.1.2.1 Festlegung einer Impfstrategie

Die Rolle von Th17 Zellen bei Infektionserkrankungen ist noch größtenteils unklar. Mit CCR6 konnten wir in den vorangegangenen Experimenten einen spezifischen Marker für Th17 Zellen definieren, der uns erlaubte, diese Zellpopulation im Verlauf einer Immunantwort zu untersuchen. Dazu immunisierten wir Mäuse mit Ovalbumin (OVA) und gaben CpG-Motive als Adjuvans. CpG-Oligodesoxynukleotide (ODN) binden an TLR9 auf Antigen-präsentierenden Zellen (*antigen presenting cell* = APC) und aktivieren sie (Takeda et al., 2003). APCs phagozytieren OVA, verdauen es im Phagolysosom und präsentieren die daraus entstehenden Peptide auf MHC II an ihrer Oberfläche und aktivieren so die Th Zellen (Kirschning et al., 2001). Um die Kinetik der Differenzierung von Th17 Zellen zu untersuchen, immunisierten wir C57BL/6 Mäuse mit OVA/CpG subkutan in die hintere Pfote und analysierten die Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Immunisierung.

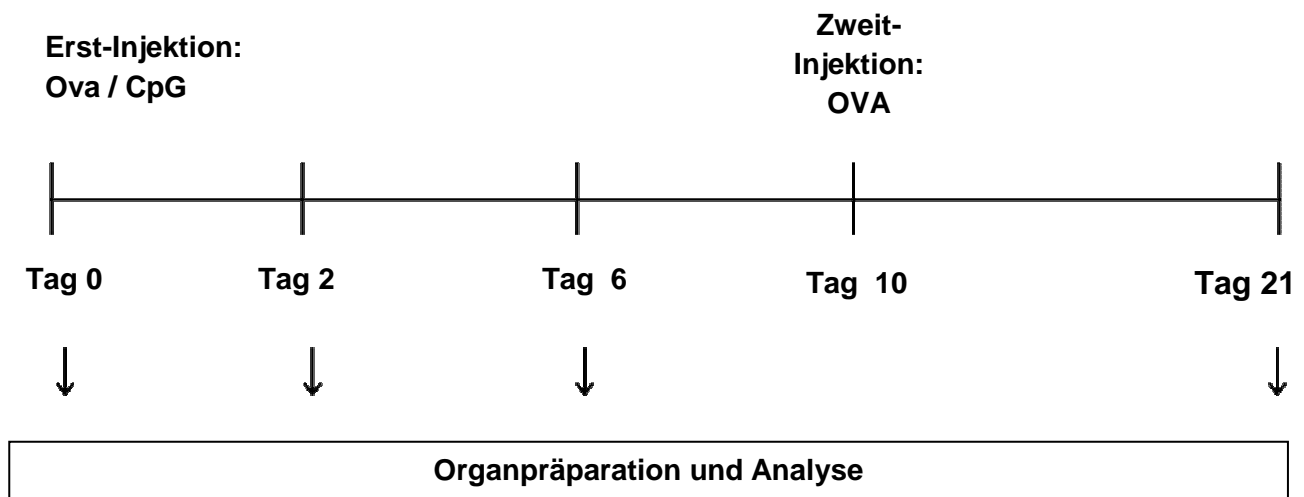


Abb. 9: Immunisierungs-Strategie. Zur Auslösung einer antigenspezifischen Immunantwort wurden 100 µg OVA / 8 nmol CpG subkutan in die hintere Pfote von C57BL/6 Mäusen appliziert. Nach 10 Tagen erfolgte die Expansion OVA-spezifischer T-Zellen durch eine weitere Injektion mit 100 µg OVA. Unbehandelten Mäusen sowie Mäusen 2, 6 oder 21 Tage nach der Erst-Immunsierung wurden die ableitenden Lymphknoten entnommen.

Die T-Zell-Immunreaktion wird während der ersten drei Tage initiiert (Jenkins et al., 2001; Reinhardt et al., 2001). Die Expansion der aktivierten T-Zellen ist bis Tag sieben nach der Impfung bzw. Infektion abgeschlossen und markiert die akute Phase der T-Zell-Immunantwort. Im Anschluss daran erfolgt eine Kontraktion der aktivierten Zellen und das Immunsystem muss nach der Bekämpfung der Erreger wieder in die Homöostase zurückkehren. Um die Funktion der Th17 Zellen in allen Phasen der Immunreaktion zu untersuchen, wurden Zellen an Tag zwei, sechs und 21 nach Applikation einer Impfung entnommen und analysiert. Zehn Tage nach der Erst-Immunisierung wurde den Tieren eine Zweit-Injektion von Antigen ohne Adjuvans gegeben. Dabei wird die Expansion von antigenspezifischen T-Zellen gefördert, ohne dabei eine erneute, intensive Immunantwort auszulösen (Abb. 9).

3.1.2.2 Anteil der Th17 Zellen im Lymphknoten während der Immunantwort

C57BL/6 Mäuse wurden, wie in 3.1.2.1 beschrieben, immunisiert. Es wurde untersucht, inwiefern Th17 Zellen im ableitenden Lymphknoten nach der Immunisierung expandieren. In der frühen Phase der Immunantwort (Tag 2) zeigte sich bereits eine prozentuale Verminderung der Th17 Zellen innerhalb der Lymphozytenpopulation. In der akuten Phase der Immunantwort (Tag 6) konnte eine signifikante Reduktion des Anteils an Th17 Zellen festgestellt werden. Der Anteil an CD4⁺CCR6⁺ Zellen im Lymphknoten sinkt von $0,89 \pm 0,16$ % auf $0,59 \pm 0,08$ % und reduziert sich somit um 33 %. In der späten Phase der Infektion steigt der Anteil an CD4⁺CCR6⁺ Zellen wieder auf $0,71 \pm 0,02$ % an (Abb.10). Der prozentuale Ausgangswert CCR6 positiver Th Zellen konnte zu diesem Zeitpunkt allerdings nicht oder noch nicht erreicht werden. Dabei könnte die Zweit-Immunisierung mit OVA zehn Tage nach der Erst-Immunisierung eine Rolle spielen, da hier antigenspezifische Th1 und Th2 Zellen oder auch zytotoxische T-Zellen und B-Zellen prozentual mehr expandiert haben könnten als CCR6-positive Th17 Zellen.

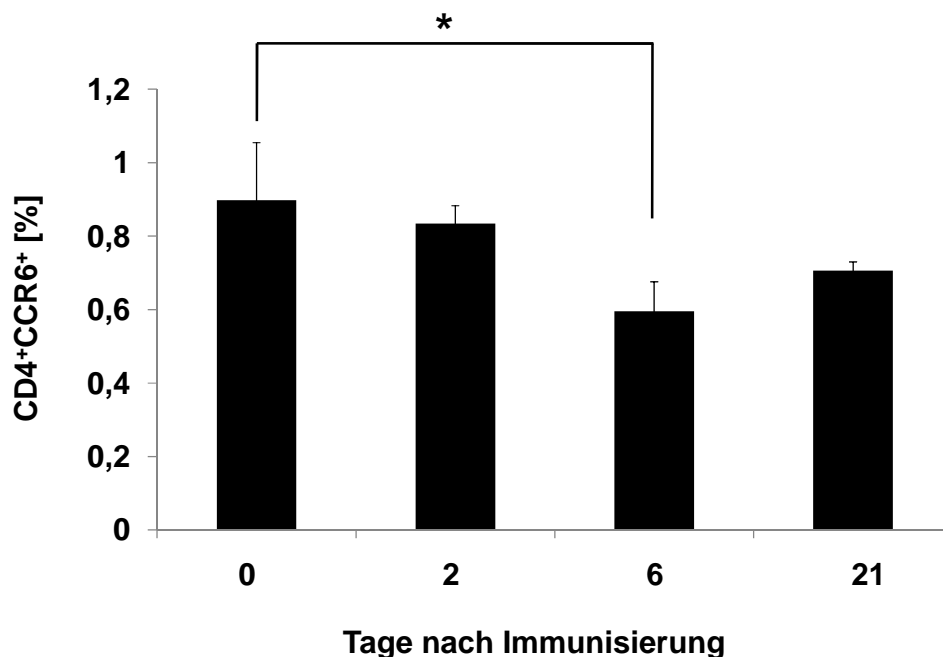


Abb. 10: Anteil CD4⁺CCR6⁺ Zellen im ableitenden Lymphknoten während der Immunantwort. Unbehandelten und immunisierten C57BL/6 Mäusen wurden zu den angezeigten Tagen nach Erst-Immunisierung die ableitenden Lymphknoten entfernt. Der prozentuale Mittelwert (\pm SD) an CD4⁺CCR6⁺ Zellen innerhalb der Lymphozytenpopulation wurde aufgetragen. Die Daten wurden aus 3 unabhängigen Experimenten mit jeweils 3 Tieren generiert; * $p < 0,05$.

3.1.2.3 Aktivierungsstatus von CCR6-positiven und CCR6-negativen Th Zellen während der Immunantwort

Da CCR6-positive Th Zellen bereits in naiven Mäusen einen aktivierten Phänotyp zeigten, war unklar, wie diese Th Zellfraktion auf eine äußere Stimulierung reagieren würden. Dazu immunisierten wir C57BL/6 Mäuse nach dem Schema aus Abb. 9. Nach erfolgreicher Immunisierung muss der Anteil an aktivierten Zellen ansteigen. Den immunisierten Tieren wurden die Lymphknoten entnommen und der Anteil an aktivierten Th Zellen ermittelt. Dazu wurden die Aktivierungsmarker CD62L, CD44, CD45RB und CD69 verwendet, wobei CD69 nur von kürzlich aktivierten Zellen produziert wird und nach zwei bis drei Tagen wieder verschwindet. Bei CD4⁺CCR6⁺ Zellen zeigte sich während der gesamten Immunreaktion keine signifikante Änderung der Expression der Aktivierungsmarker. Diese Zellen besaßen konstant einen aktivierten Phänotyp (Abb.11). CD4⁺CCR6⁻ Zellen ändern während der Immunantwort maßgeblich ihren Phänotyp. Der Anteil an CD62L-negativen Zellen

verdreifacht sich, der von CD69-positiven Zellen verdoppelt sich. Die Immunisierung mit OVA und CpG löst somit eine Immunreaktion aus. In der späten Phase der Immunreaktion (Tag 21) sinkt der Anteil an CD69 innerhalb der CCR6-negativen Th Zellfraktion wieder auf das Ausgangsniveau, der Anteil an CD4⁺CCR6⁻CD62L⁻ Zellen bleibt erhalten (Abb.11). Somit befinden sich in dieser Phase der Immunreaktion immer noch aktivierte Zellen im Organismus, die nicht zur Population der konstant aktivierten CCR6⁺ Th17 Zellen gehören.

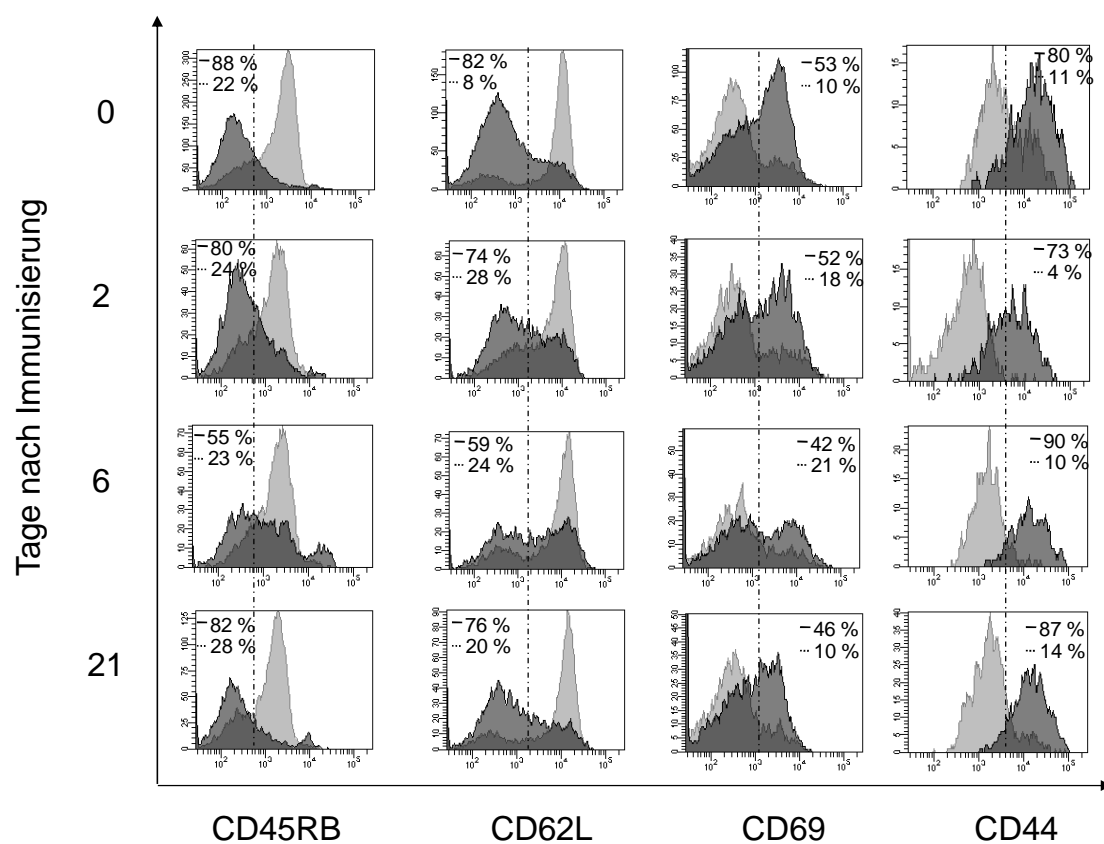


Abb. 11: Aktivierungsstatus von Th Zellen nach Immunisierung. Ableitende Lymphknoten aus C57BL/6 Mäusen wurden zu den angezeigten Zeitpunkten nach Erst-Immunisierung entnommen. Lymphozyten wurden isoliert, mit Antikörpern markiert und durchflusszytometrisch analysiert. Die Histogramme zeigen die Expression der angegebenen Oberflächenmoleküle innerhalb der CD4⁺CCR6⁺ (schwarze Linie) bzw. CD4⁺CCR6⁻ (graue Linie) Zellfraktion. Daten sind repräsentativ für 3 unabhängige Versuche mit jeweils 3 Tieren pro Experiment.

3.1.2.4 Zytokinproduktion der unterschiedlichen Th Zell-Subpopulationen während der Immunantwort

Die Produktion von IL-17 in unbehandelten Mäusen geht mit der Expression von CCR6 auf Th Zellen einher, CCR6-negative Zellen sezernieren IFN- γ (Abb. 5). Im Verlauf der Immunantwort ändert sich der prozentuale Anteil an CCR6-positiven Th Zellen (Abb. 10). Bis zu diesem Zeitpunkt war unklar, ob die Verminderung des Anteils an CD4⁺CCR6⁺ Zellen in der akuten Phase der Immunantwort mit einer verminderten Anzahl an Th17 Zellen korreliert. Dazu wurden die Lymphknoten von C57BL/6 Mäusen zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Immunisierung (Abb. 9) entnommen und eine Zellsuspension wurde hergestellt. Die Zellen wurden *ex vivo* mit PMA/Ionomycin stimuliert und intrazelluläres IL-17 wurde markiert. Es ließ sich eine deutliche Korrelation zwischen der Abnahme des Anteils an CCR6-positiven Th Zellen (Abb.10) und der Anzahl an IL-17-produzierenden Th Zellen während der Immunantwort nachweisen (Abb. 12). Während der Entzündungsreaktion war der Anteil an Th17 Zellen im Lymphknoten im Vergleich zu naiven Tiere vermindert, in der späten Phase der Immunantwort erreichte der Anteil an Th17 Zellen wieder das Ausgangsniveau. Die Anzahl an CD4⁺CCR6⁻ IFN- γ -produzierenden Th Zellen war an Tag 2 nach Immunisierung am höchsten und zu diesem Zeitpunkt stieg auch der Anteil an Th1 Zellen innerhalb der CD4⁺CCR6⁺ Th Zellfraktion. CCR6-negative Th Zellen zeigten zu keinem Zeitpunkt die Fähigkeit zur IL-17 Produktion. Die Korrelation zwischen der Expression von CCR6 auf Th Zellen und der Produktion von IL-17 bleibt während der Immunantwort erhalten. Der Chemokinrezeptor CCR6 kann somit als Marker für Th17 Zellen verwendet werden, unabhängig davon, ob Th Zellen aus unbehandelten oder immunisierten Mäusen isoliert werden.

Es bleibt die Frage offen, ob auch die produzierte Menge an IL-17 in der akuten Phase der Immunantwort weniger ist als in der frühen Phase und ob Th1 Zytokine im Gegenzug dazu verstärkt produziert werden. Wenige, effiziente Th17 Zellen könnten in der Lage sein, ebenfalls eine hohe Menge an IL-17 zu produzieren. Daher wurden bei den Mäusen die Lymphknoten nach zwei, sechs und 21 Tagen nach der Erst-Immunisierung entfernt, die Lymphknotenzellen restimuliert und die Menge an IL-17 und IFN- γ Protein bestimmt.

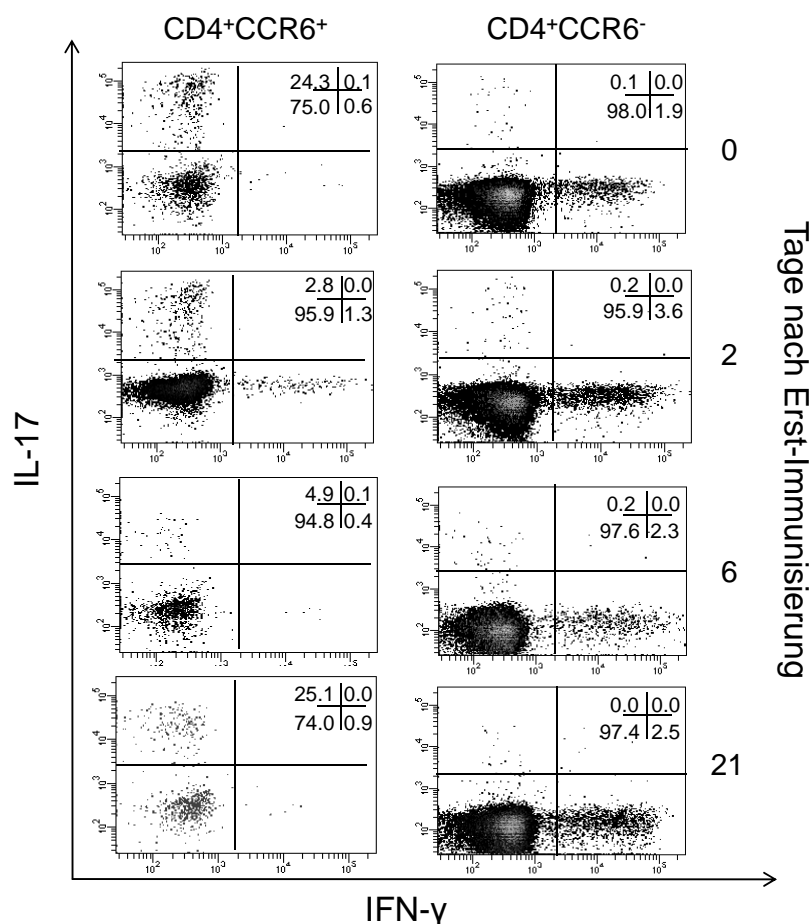


Abb. 12: Zytokinproduktion von Th Zellen während der Immunantwort. Tiere wurden immunisiert und Lymphknoten aus C57BL/6 Mäusen zu den angegebenen Zeitpunkten isoliert. Lymphozyten wurden intrazellulär markiert und durchflusszytometrisch analysiert. Die Produktion von IL-17 und IFN- γ von CD4⁺CCR6⁺ (linke Seite) und CD4⁺CCR6⁻ (rechte Seite) Zellen ist gezeigt. Die Daten sind repräsentativ für 3 unabhängige Experimente mit jeweils 3 Tieren.

In der akuten Phase der Immunreaktion (sechs Tage nach der Immunisierung) waren die Lymphknotenzellen nicht mehr in Lage, die gleiche Menge an IL-17 zu produzieren, wie die Zellen aus unbehandelten Mäusen (Abb. 13 oben). Zu diesem Zeitpunkt war hingegen die Menge an sezerniertem IFN- γ am höchsten. In dieser Phase ist die Differenzierung der Th Zellen in Richtung der Th1 Zellen bevorzugt, die Th17 Entwicklung ist benachteiligt. Während sich die Menge an IFN- γ in der späten Phase der Immunreaktion wieder auf das Ausgangsniveau senkte, erreichte die Menge an produzierten IL-17 ihren Ausgangswert im Beobachtungszeitraum von 21 Tagen nicht mehr, sondern blieb auf niedrigem Niveau (Abb. 13 unten).

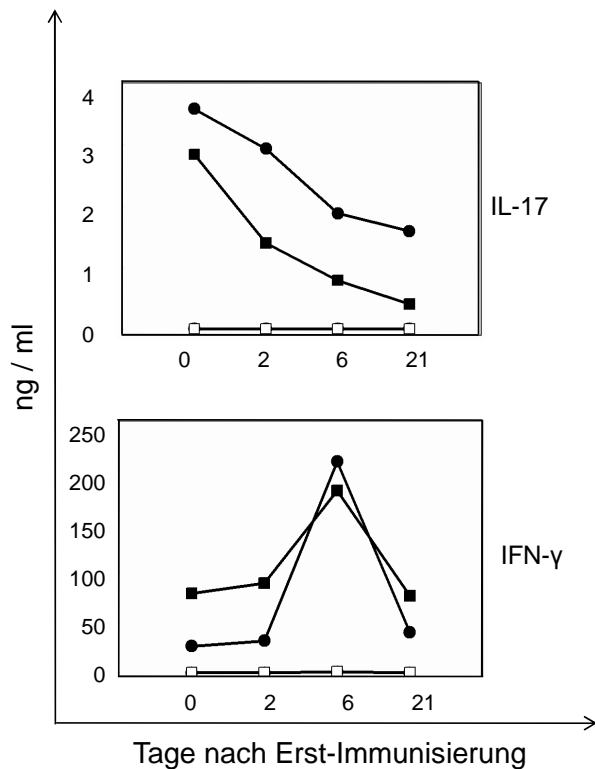


Abb. 13: IL-17 und IFN- γ Produktion von Lymphknoten-zellen nach Immunisierung. C57BL/6 Mäuse wurden immunisiert und zu den angegebenen Zeitpunkten getötet. Die ableitenden Lymphknoten wurden isoliert und deren Zellen wurden für 3 Tage *in vitro* mit anti-CD3 stimuliert (gefüllte Symbole) oder unstimuliert inkubiert (offene Symbole). Aus den Überständen wurde IL-17 und IFN- γ Protein mittels ELISA bestimmt. Gezeigt sind 2 unabhängige Experimente (Quadrate und Kreise), die aus einer Gruppe von je 3 Tieren gewonnen wurden.

Wenige CCR6-positive Th Zellen in der akuten Phase der Immunantwort bedeuten somit eine geringe Anzahl an Th17 Zellen und eine verminderte Menge an produzierten IL-17 Protein im Lymphknoten. In diesem Immunisierungsmodell reguliert die Th17 die Th1 und die Th1 die Th17 Antwort: Während zu Beginn der Immunreaktion Th17 Zellen eine wichtige Rolle spielen, ist in der akuten Phase die Differenzierung zu Th1 Zellen bevorzugt. Wir konnten mit unserem OVA/CpG Immunisierungsmodell zeigen, dass nicht nur *in vitro* (Bettelli et al., 2006; Steinman, 2007), sondern auch *in vivo* eine hohe Menge an IFN- γ im Lymphknoten eine verminderte Anzahl an Th17 Zellen bedingt und eine deutlich geringere Menge an IL-17 produziert wird. Die Frage, ob es sich hier um ein allgemeingültiges Prinzip handelt oder ob sich die Ergebnisse auf CpG-Motive zurückführen lassen, blieb zunächst unbeantwortet. Deswegen wurden C57BL/6 Mäuse mit OVA und Alum (fördert Th2 Antwort) bzw. inkomplettem Freund'schen Adjuvans (IFA, fördert Th1 Antwort) immunisiert und die Kinetik wiederholt. Bei beiden Immunisierungen wurden die vorherigen Ergebnisse bestätigt. Der prozentuale Anteil an Th17 Zellen innerhalb der Lymphozytenpopulation ist in der akuten Phase der Immunantwort am geringsten (Abb. 14A). Die IL-17-produzierenden Th Zellen befinden sich wieder in

der CCR6-positiven Th Zellfraktion (Abb. 14B). In unbehandelten Mäusen sind $1,1 \pm 0,17$ % aller Lymphozyten Th17 Zellen, während an Tag sechs nach Immunisierung in den Alum-immunisierten Mäusen nur noch $0,2 \pm 0,07$ % und in IFA-immunisierten Tieren $0,1 \pm 0,04$ % der Th Zellen IL-17 produzieren (Abb. 14B).

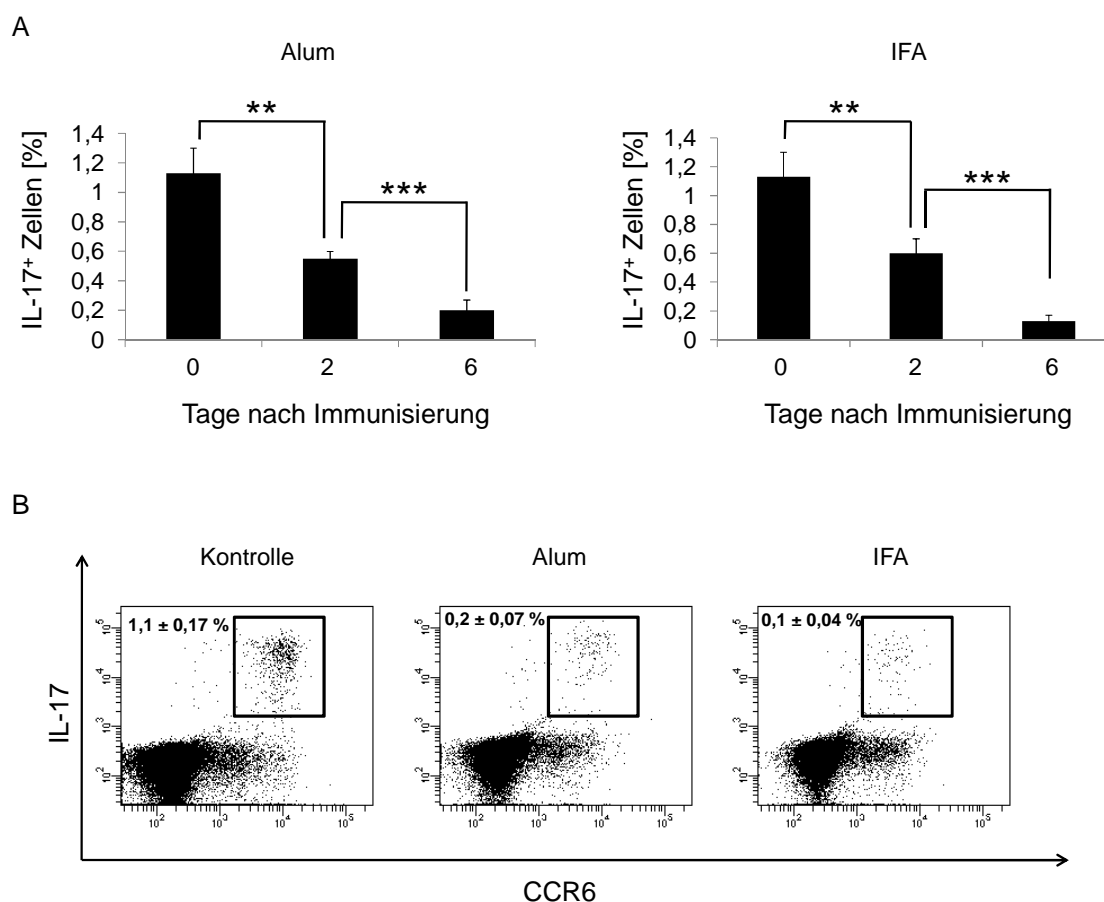


Abb.14: Th17 Zellen nach Immunisierung mit OVA-Alum bzw. OVA-IFA. C57BL/6 Mäuse wurden mit OVA-Alum bzw. OVA-IFA immunisiert. Kontrolltiere blieben unbehandelt. Die Daten stammen aus jeweils 4 individuellen Mäusen. **(A)** Lymphknoten wurden zu den angezeigten Tagen nach Immunisierung entnommen. Lymphknotenzellen wurden isoliert, mit PMA/Iono stimuliert und in Gegenwart von GolgiStop 4 h inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen intrazellulär mit anti-IL17 markiert. Der prozentuale Anteil (\pm SD) an CCR6⁺IL-17⁺ Th Zellen innerhalb aller CD4⁺ Zellen wurde durchflusszytometrisch ermittelt. **p < 0,01; *** p < 0,001. **(B)** Sechs Tage nach Immunisierung wurden Lymphknoten entnommen und wie in (A) behandelt. Gezeigt ist der Anteil CCR6⁺IL-17⁺ Zellen innerhalb der CD4⁺ T-Zell-Fraktion in Prozent \pm SD.

Weiterhin ist auch die Menge an produziertem IL-17 in beiden Fällen während der Immunantwort geringer als zu Beginn (Abb. 15). CD4⁺CCR6⁺ Zellen sind somit die IL-17-produzierende Th Zell-Subpopulation, unabhängig von der Art der Immunisierung, und sind in der akuten Phase der Immunantwort weniger prominent als Th1 oder Th2 Zellen.

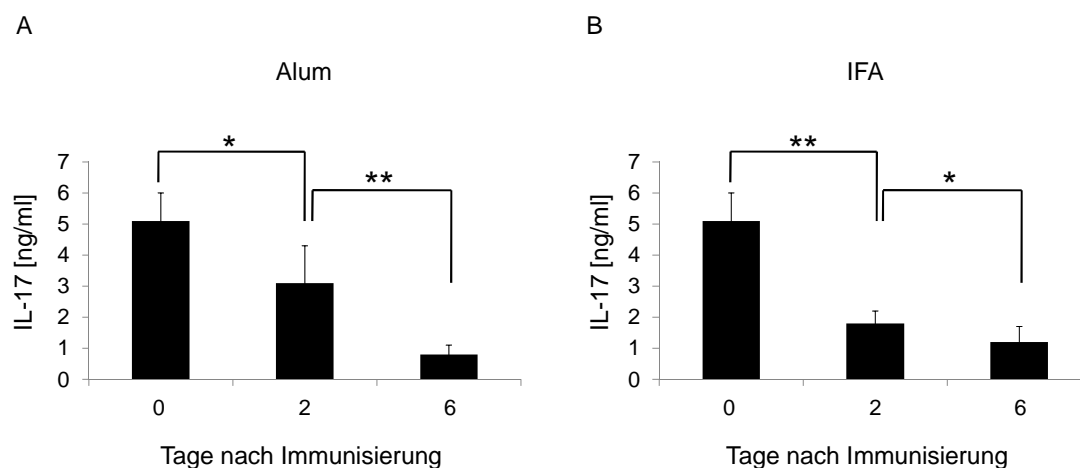


Abb. 15: Die Menge an IL-17 Protein im Verlauf der Immunantwort. C57BL/6 Mäuse wurden mit OVA-Alum (A) und OVA-IFA (B) immunisiert. Kontrolltiere blieben unbehandelt. Die ableitenden Lymphknoten der Tiere wurden zu den angegebenen Zeitpunkten isoliert. Die Zellen wurden *in vitro* für 72 h mit anti-CD3 stimuliert. Die Menge an IL-17 Protein im Überstand wurde mittels ELISA nachgewiesen. Die Daten stammen aus jeweils 4 individuellen Mäusen. * p < 0,05; ** p < 0,01.

3.1.3 Proliferationsfähigkeit von Th17 Zellen

Die prozentuale Abnahme der Th17 Zellpopulation in der akuten Phase der Immunantwort kann darauf beruhen, dass Th17 Zellen nach Aktivierung nicht im Stande sind zu proliferieren. So lässt sich erklären, dass nach der Immunisierung der Anteil der proliferationsfähigen Th1 Zellen zunimmt und der Anteil der Th17 Zellen abnimmt. Um die Fähigkeit von Th17 Zellen zur Proliferation nach T-Zellaktivierung zu testen, entwickelten wir einen *in vitro* Proliferations-Assay. Mit Hilfe von CFSE kann die Proliferation von Zellen gemessen werden. Kombiniert mit der intrazellulären Markierung von Zytokinen erlaubt der Test zusätzlich die Bestimmung von IL-17 und IFN- γ in proliferierenden Zellen. Zunächst wurden C57BL/6 Mäuse wieder mit OVA-CpG immunisiert (siehe Abb. 9).

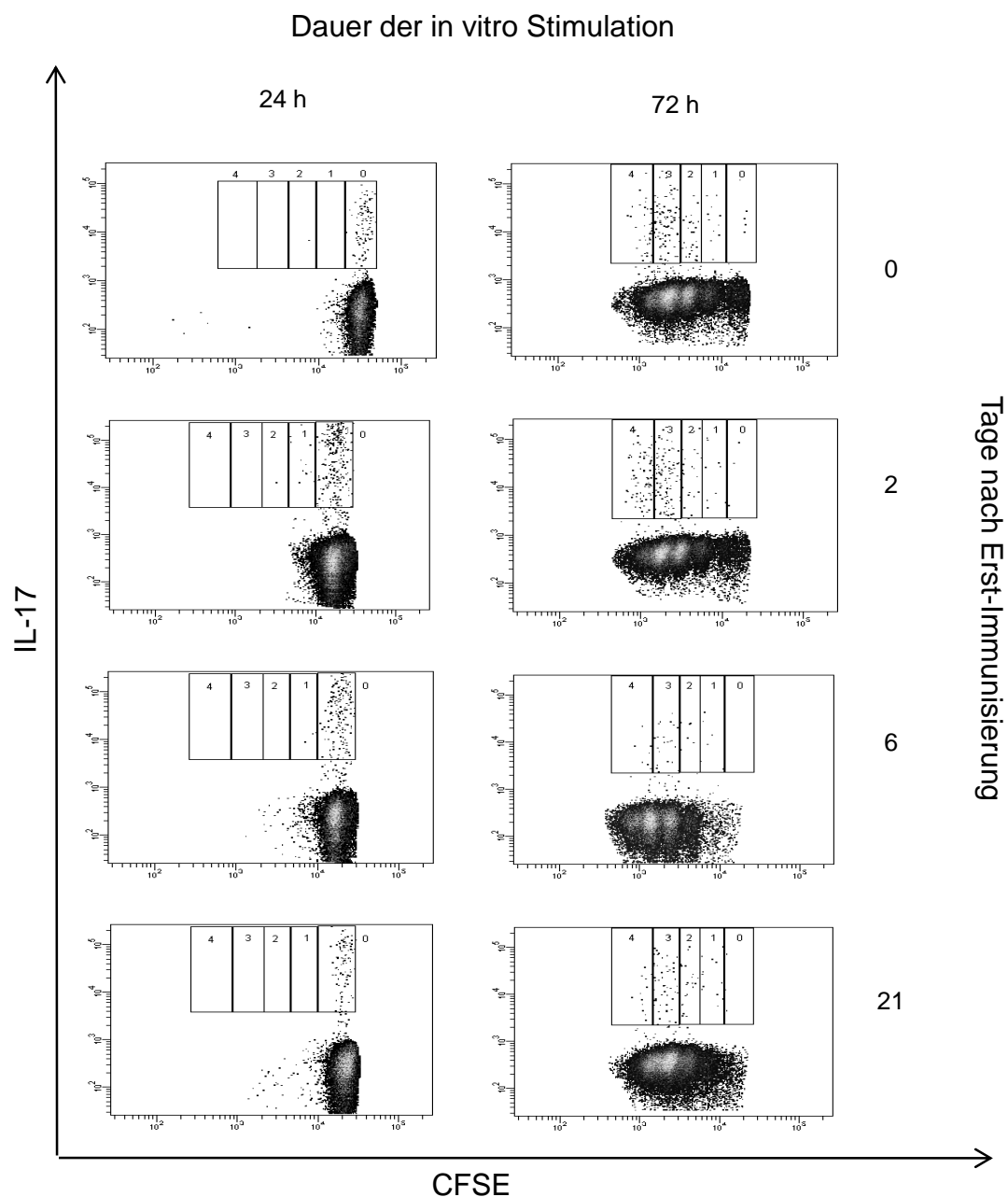


Abb.16: Proliferation von Th17 Zellen. C57BL/6 Mäuse wurden mit OVA-CpG immunisiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die ableitenden Lymphknoten entnommen und die Lymphozyten mit CFSE markiert. Die Zellen wurden *in vitro* mit anti-CD3 (5 µg/ml) stimuliert und nach 24 h bzw. 72 h intrazellulär markiert. Gezeigt ist die Anzahl an proliferierenden IL-17 produzierenden Zellen innerhalb der CD4⁺ T Zell Fraktion. Die Kästchen stehen für die Teilungszyklen der Th17 Zellen von 0 bis 4. Die Dotplots sind repräsentativ für 2 unabhängige Experimente mit je 3 Mäusen pro Versuch.

Die Lymphknotenzellen wurden isoliert, mit CFSE markiert und *in vitro* polyklonal stimuliert. 24 Stunden nach Stimulation mit anti-CD3 hatte sich zwar noch keine Zelle geteilt, doch konnten Th17 Zellen eindeutig nachgewiesen werden (Abb. 16). Nach 3 Tagen befanden sich über 90 % aller Zellen in Proliferation. Nach jedem Immunisierungszeitpunkt waren Th17 Zellen in der Lage zu proliferieren, doch zeigten sich Unterschiede in der Anzahl der sich teilenden Zellen. In der akuten Phase der Immunantwort (Tag sechs) proliferieren deutlich weniger Th17 Zellen als zu Beginn der Immunreaktion (Abb. 16). IFN- γ produzierende Th1 Zellen und CD8-positive zytotoxische T-Zellen sind ebenfalls in der Lage zu proliferieren und bilden die dominanten Zellpopulationen in der akuten Phase der Immunantwort (Daten nicht gezeigt).

3.2 *In vitro* und *in vivo* Untersuchungen zur Antigen-spezifität von aktivierungsinduzierten CCR6-positiven Th17 Zellen

3.2.1 *In vitro* Untersuchungen

3.2.1.1 Antigen-spezifische Proliferation von CCR6-positiven Th17 und CCR6-negativen Th Zellen

Wir haben bisher gezeigt, dass CCR6 ein spezifisches Kriterium für Th17 Zellen ist. CCR6-positive Th Zellen und Th17 Zellen sind in naiven Tieren am präsentesten. Während der akuten Phase der Immunreaktion ist ihr Anteil an Th Effektorzellen im Vergleich zu Th1/Th2 Zellen geringer. CCR6-positive Th17 Zellen können nach polyklonaler Stimulation *in vitro* aus naiven Th Zellen nachgewiesen werden. Allerdings ist noch unklar, ob Th17 Zellen, die in Folge der Impfung *in vivo* entstehen, auch antigen-spezifisch sind. Mit CCR6 als Marker für Th17 Zellen wurde die antigen-spezifische Proliferation von CD4⁺CCR6⁺ Zellen untersucht. Das Immunisierungsschema aus Abb. 9 ermöglicht die Generierung von OVA-spezifischen Effektor-T-Zellen bzw. T Gedächtnis-Zellen, also gegebenenfalls auch antigen-spezifische CCR6-positive Th17 Zellen. Durch Restimulation von *in vivo*-induzierten, antigen-spezifischen Th17 Zellen mit OVA können diese Th17 Zellen

nachgewiesen werden. Dazu verwendeten wir zwei Methoden: CFSE zur Analyse der antigenspezifischen Proliferation und ELISA zur Bestimmung von Th Zell-spezifischen Zytokinen.

Mittels Durchflusszytometrie konnte zunächst die Proliferation von CCR6-positiven und CCR6-negativen Th Zellen analysiert werden. Weniger als 2 % der $CD4^+CCR6^-$ Zellen zeigten Proliferation nach antigenspezifischer Stimulierung. Auch $CD4^+CCR6^+$ Zellen proliferierten, doch war unter diesen Zellen der Anteil an proliferierenden Zellen sehr viel höher und lag im Mittel bei 30 % (Abb. 17A). $CD4^+CCR6^+$ Zellen, die aus sechs Tage immunisierten Mäusen stammten, zeigten antigenspezifische Proliferation mit und ohne Zugabe von OVA. Da sich die Mäuse zu diesem Zeitpunkt in der akuten Phase der Immunantwort befanden, in der der ableitende Lymphknoten stark geschwollen und mit einer Vielzahl von Leukozyten infiltriert ist, sind auch APCs in großer Menge vorhanden. Diese Zellen tragen endogenen Antigen und können so T-Zellen aktivieren. Es zeigte sich, dass CCR6-positiv Th Zellen zu mehr als 30 % proliferierten, während sich CCR6-negative Th Zellen zu weniger als 2 % von endogen mitgeführtem Antigen aktivieren ließen. Die Zugabe von OVA war zu diesem Zeitpunkt somit nicht nötig (Abb.17). In der späten Phase der Immunantwort, an Tag 21 nach Immunisierung, sind keine oder nur noch sehr wenige OVA-präsentierende APCs im Lymphknoten. Ohne Zugabe von exogenem Antigen proliferieren weder $CD4^+CCR6^-$ noch $CD4^+CCR6^+$ Zellen. Nach Zugabe von exogenem OVA wird dies von APCs aufgenommen und den T-Zellen präsentiert. $CD4^+CCR6^+$ Zellen zeigten antigenspezifische Proliferation, während $CD4^+CCR6^-$ Zellen nach OVA-Stimulierung keine erhöhte Proliferation zeigten (Abb. 17A). Dies spricht für eine langlebige Th Effektor/Gedächtnis-Zellpopulation, die antigenspezifisch reagieren kann. Nach polyklonaler Stimulation proliferierten beide Zellfraktionen, CCR6-positiv und CCR6-negativ Th Zellen, gleich stark. Also können generell beide Populationen zur Proliferation gebracht werden (Abb. 17B). Somit proliferieren CCR6-positiv und negativ Th Zellen nach polyklonaler Stimulation in gleichem Maße, während nach antigenspezifischer Stimulation die Fraktion der CCR6-positiv Th Zellen zu einem deutlich höheren Anteil mit Proliferation reagiert als $CD4^+CCR6^-$ Zellen.

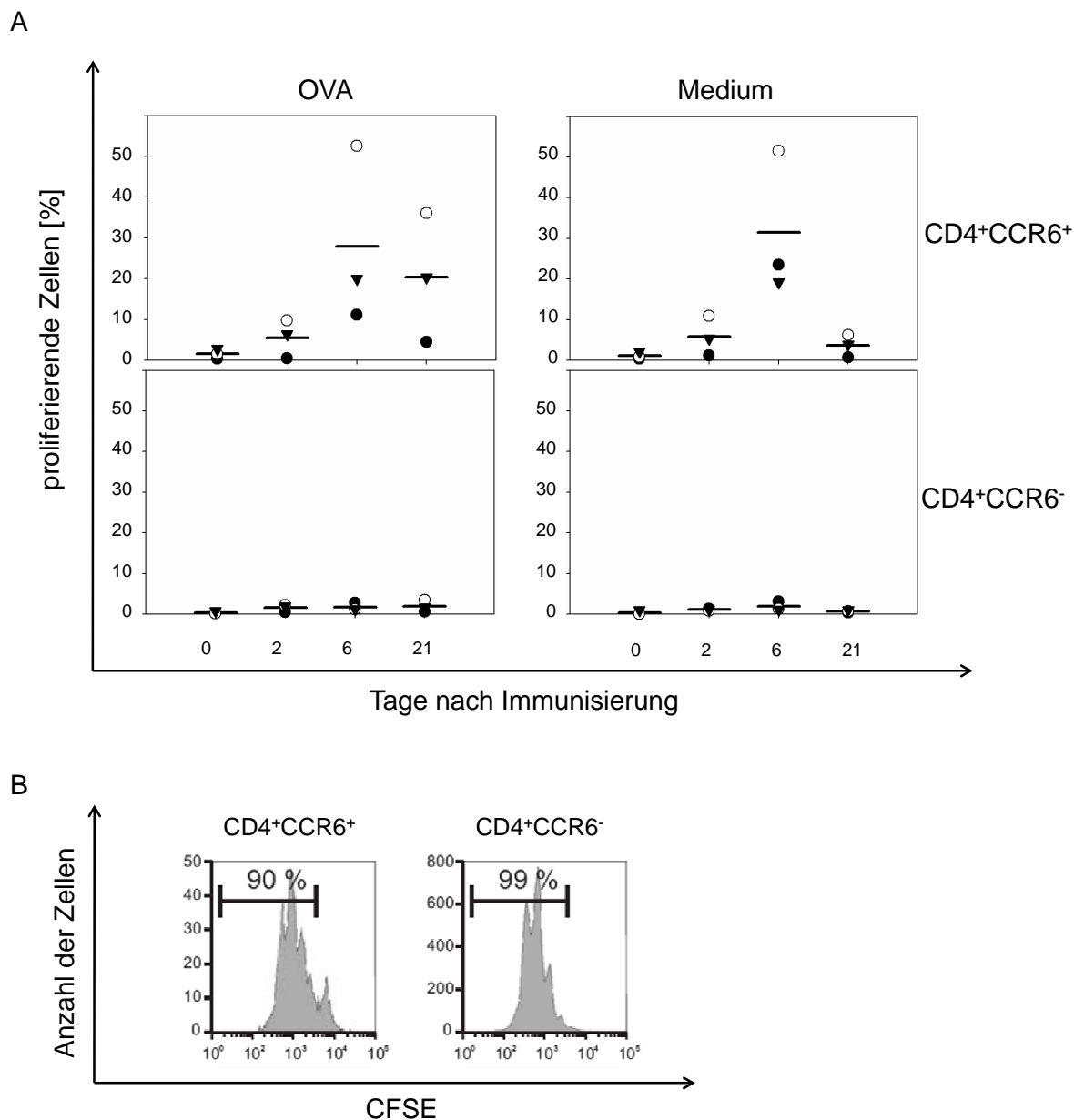


Abb. 17: Proliferation von Th Zellen nach antigenspezifischer und polyklonaler Restimulation. C57BL/6 Mäuse wurden mit OVA-CpG immunisiert. Lymphknoten wurden zu den angegebenen Zeitpunkten isoliert und Lymphozyten wurden mit CFSE markiert. Die Zellen wurden *in vitro* 96 h mit OVA (A) oder 72 h mit anti-CD3 (B) stimuliert. **(A)** Gezeigt ist der prozentuale Anteil der proliferierenden Zellen. Jeder Punkt symbolisiert ein Experiment mit einer Gesamtheit von 3 Mäusen. Gleiche Symbole gehören zu einem kompletten Immunisierungsversuch mit 4 Analysenzeitpunkten. Insgesamt wurden 3 unabhängige Immunisierungsversuche durchgeführt. An den Tagen 6 und 21 nach Immunisierung ist die Zunahme der proliferierenden CD4⁺CCR6⁺ nach OVA Stimulation signifikant. **(B)** 2 Tage nach Immunisierung wurden die Organe entnommen. Proliferierende CD4⁺CCR6⁺ und CD4⁺CCR6⁻ Zellen nach polyklonaler Stimulation wurden analysiert. Gezeigt ist ein für alle Immunisierungszeitpunkte repräsentatives Histogramm aus 3 unabhängigen Versuchen mit jeweils 3 Tieren.

3.2.1.2 Antigen-spezifische Zytokinproduktion von Th17 Zellen

Die Entstehung von antigen-spezifischen Th17 Zellen nach Immunisierung konnte bisher anhand proliferierender CCR6-positiver Th Zellen gezeigt werden. Als weiterer Nachweis der Funktionalität von *in vivo* entstandenen Th17 Zellen wurden Th Zell-spezifische Zytokine mittels ELISA bestimmt. Dazu wurden Th Zellen nach Immunisierung *in vitro* antigen-spezifisch stimuliert. Zellen aus naiven Mäusen und Zellen aus Mäusen, die zwei oder 21 Tage immunisiert waren, zeigten nach OVA Stimulierung keine IL-17 Produktion. Lymphozyten aus Mäusen, die sechs Tage immunisiert waren, sezernierten IL-17. Bei Zellen, die ausschließlich in Medium inkubiert wurden, konnte kein IL-17 Protein gemessen werden (Abb. 18A). Somit konnten nach Immunisierung OVA-spezifische Th17 Zellen im Lymphknoten nachgewiesen werden. Antigen-spezifische Th17 Zellen können demnach innerhalb der ersten Woche nach Immunisierung induziert werden. In der späten Phase der Immunantwort ist keine OVA-spezifische Antwort mehr auslösbar. Die OVA-Stimulierung könnte zu diesem Zeitpunkt nicht ausreichen, da 21 Tage nach der Immunisierung, im Vergleich zu Tag sechs, weniger antigen-spezifische Zellen im Lymphknoten vorhanden sind. Einige der antigen-spezifischen Zellen könnten aus dem Lymphknoten migriert oder gestorben sein. Aufgrund der *in vitro* Bedingungen ist die Rekrutierung von OVA-spezifischen Zellen aus anderen Kompartimenten des Körpers nicht möglich.

Im Gegensatz dazu konnten antigen-spezifische Th1 Zellen im gesamten Verlauf der Immunantwort nachgewiesen werden (Abb. 18B). Dies zeigt wieder, dass Th1 Zellen die Immunantwort dominieren. Sechs Tage nach der Immunisierung ist die Aktivität der Th1 Zellen im Lymphknoten sogar so hoch, dass eine *in vitro* Stimulation nicht notwendig ist, um eine deutliche IFN- γ Produktion nachzuweisen. Endogen mitgeführtes Antigen reicht aus, um eine antigen-spezifische Antwort auszulösen (Abb. 18B). Stimuliert man diese Zellen zusätzlich mit Antigen, wird eine massive IFN- γ Sezernierung ausgelöst. Dies deutet auf eine hohe Anzahl an aktivierten Th1, aber auch zytotoxischen T-Zellen und NK-Zellen im Lymphknoten hin. In der späten Phase der Immunreaktion konnten wir nach antigen-spezifischer Stimulation eindeutig die Produktion von IFN- γ nachweisen (Abb. 18B). Dies spricht für das Vorhandensein von langlebigen und im Lymphknoten residierenden, antigen-spezifischen Th1 Gedächtniszellen.

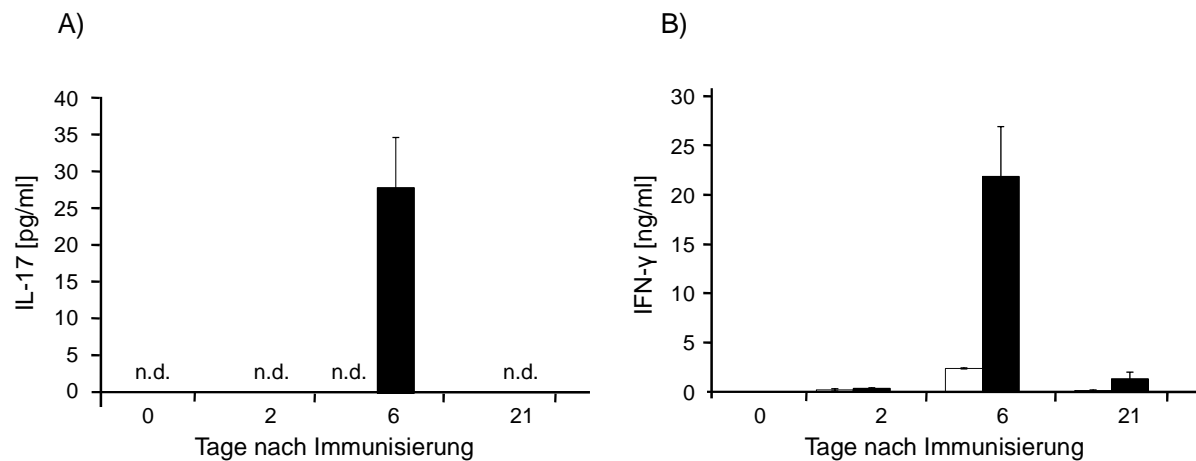


Abb.18: Antigen-spezifische Zytokinproduktion. C57BL/6 wurden nach dem Schema in Abb. 9 immunisiert. Die Lymphknotenzellen wurden isoliert und die Lymphozyten wurden *in vitro* 72 h mit OVA stimuliert (schwarze Balken) oder mit Medium inkubiert (weiße Balken). Die Menge an produziertem IL-17 (A) und IFN- γ (B) Protein wurde mittels ELISA bestimmt. Die Mittelwerte (\pm SD) aus 3 unabhängigen Experimenten sind dargestellt. Werte, die unter dem Detektionslimit lagen, wurden mit n.d. (nicht detektierbar) bezeichnet.

3.2.2 *In vivo* Untersuchungen

Da wir die Proliferationsfähigkeit und Antigen-spezifität von Th17 Zellen durch *in vitro* Restimulation zeigen konnten (siehe 3.2.1), wurde die Stabilität und Entwicklung von Th17 Zellen nach der Immunisierung *in vivo* getestet. Dazu wurden OVA-spezifische Zellen aus CD45.2 Mäusen in CD45.1 Tiere übertragen (siehe Material und Methoden). Durch den Transfer von OVA-spezifischen T-Zellen in CD45.1 Rezipienten kann die antigen-spezifische Immunantwort der Th17 Zellen *in vivo* untersucht werden.

3.2.2.1 Vorversuche

3.2.2.1.1 Phänotyp von Th Zellen aus OT-II Mäusen

Die Expression von CCR6 und die Produktion von IL-17 konnte bei C57BL/6 Mäusen gezeigt werden (Abb. 5). Die Lebend-Zell-Isolation von Th17 Zellen wird somit durch die Markierung von CCR6 an der Oberfläche von Th Zellen möglich. Bei OT-II Tieren konnte dieser Zusammenhang bisher nicht gezeigt werden. Deswegen isolierten wir Lymphozyten aus naiven OT-II Tieren und kombinierten die intrazelluläre Markierung

von Zytokinen mit der Markierung von Oberflächenmolekülen. Der Phänotyp der Th Zellen aus naiven OT-II Tieren war mit dem Phänotyp von naiven C57BL/6 Mäusen vergleichbar. $CD4^+CCR6^+$ Zellen aus unbehandelten Mäusen zeigten den Phänotyp aktivierter Zellen, während $CD4^+CCR6^-$ Zellen zu einem sehr viel geringeren Anteil die Aktivierungsmarker exprimierten (Abb. 19A). Weiter korrelierte die Expression von CCR6 auf Th Zellen mit der Produktion von IL-17 (Abb.19B). Somit sind auch in OT-II Mäusen die Th17 Zellen in der $CD4^+CCR6^+$ Zellfraktion zu finden.

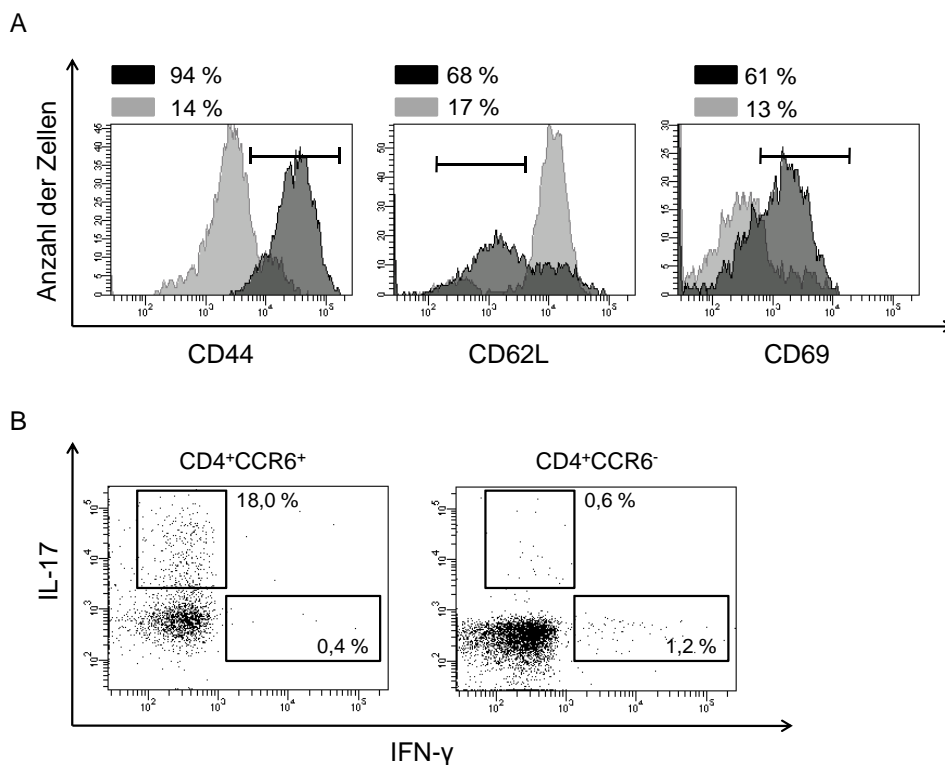


Abb. 19: Phänotyp von Th Zellen aus naiven OT-II Mäusen. Unbehandelten OT-II Mäusen wurden Lymphknoten entnommen. **(A)** Die Expression der Aktivierungsmerkmale auf $CD4^+CCR6^+$ (schwarze Linie) und $CD4^+CCR6^-$ (graue Linie) Zellen wurde mittels Durchflusszytometrie ermittelt. **(B)** Die Zellen wurden nach vierstündiger Stimulation mit PMA/Iono in Gegenwart von GolgiStop mit Antikörpern gegen intrazelluläre Zytokine markiert (siehe Material und Methoden). Gezeigt ist die Produktion von IL-17 und IFN- γ innerhalb der $CD4^+CCR6^+$ (linke Seite) und $CD4^+CCR6^-$ (rechte Seite) Zellfraktion.

3.2.2.1.2 Aktivierung transferierter Zellen *in vivo*

Lymphknotenzellen zirkulieren nach dem Transfer durch das Blut und siedeln sich vorrangig wieder in den sekundär lymphatischen Organen an. Zunächst wurde die Injektionsmethode getestet, d.h. ob der Transfer von Zellen über die Schwanzvene (i.v.) oder den Bauchraum (i.p.) erfolgen soll. Es konnte gezeigt werden, dass der Transfer von Zellen über die Schwanzvene zu einem deutlich höheren Anteil an transferierten Th Zellen im Empfänger-Lymphknoten führt als der Zelltransfer über den Bauchraum (Abb. 20).

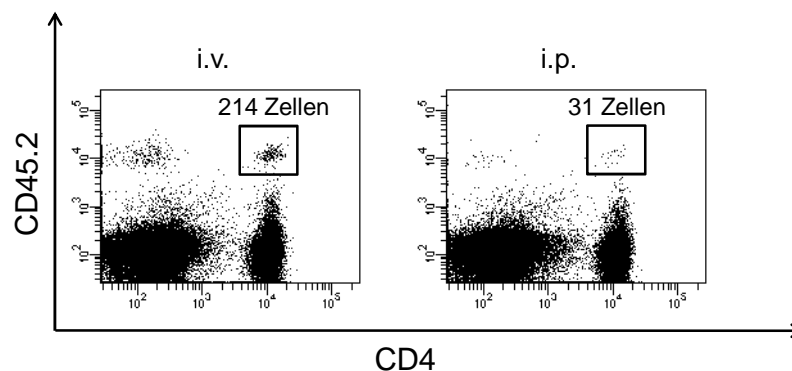


Abb. 20: Adoptiver Zelltransfer über die Schwanzvene (i.v.) und den Bauchraum (i.p.). 1×10^7 Lymphozyten aus CD45.2 Mäusen wurden i.v. (linke Seite) oder i.p. (rechte Seite) in CD45.1 Mäuse transferiert. Die Empfängertiere wurden mit OVA/CpG immunisiert und nach 72 h wurden die Lymphknoten entnommen. Gezeigt ist die Anzahl an CD4⁺CD45.2⁺ Zellen bezogen auf 100 000 Lymphozyten. Die Versuchsreihe wurde mit insgesamt 6 Tieren durchgeführt. Ein repräsentativer Dotplot ist gezeigt.

Daraufhin wurde untersucht, ob die transferierten Zellen in der Empfängermaus noch in der Lage sind, auf eine äußere Stimulierung zu reagieren. Die Immunisierung der Empfängermaus führte zu einer Aktivierung der eigenen sowie der transferierten Zellen. Bei unbehandelten Rezipienten zeigten die transferierten Zellen keine Expression des Aktivierungsmarkers CD69 (Abb. 21).

Zelltransfer via Schwanzvene erhöht somit die Anzahl an wiedergefundenen Zellen im Lymphknoten und transferierte Zellen können aktiviert werden.

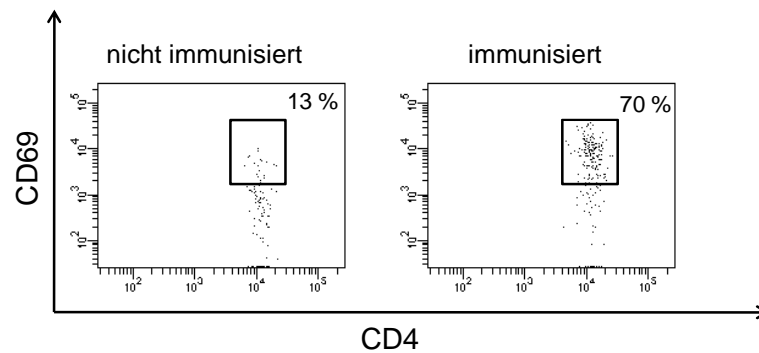


Abb. 21: Transferierte Zellen nach Impfung. 1×10^7 Lymphozyten unbehandelter C57BL/6 Mäuse wurden in CD45.1 Mäuse i.v transferiert. Die Rezipienten wurden mit OVA/CpG immunisiert. Nach 3 Tagen wurden die Lymphknoten entnommen. Gezeigt ist die Expression von CD69 auf CD45.2 Zellen aus Lymphknoten von nicht-immunisierten (linke Seite) und immunisierten (rechte Seite) Mäusen. Die Versuchsreihe wurde mit insgesamt 6 Tieren durchgeführt. Ein repräsentativer Dotplot ist gezeigt.

3.2.2.2 Stabilität von Th17 Zellen im Lymphknoten

Noch ist unklar, ob Th17 Zellen *in vivo* nach der Immunisierung aus Th0 Zellen hervorgehen, oder ob bereits differenzierte Th17 Zellen nach der Impfung bevorzugt expandieren. Deswegen verfolgten wir die antigenspezifische Immunantwort von sortierten Th17 Zellen *in vivo*. Dazu transferierten wir $CD4^+CCR6^+$ und $CD4^+CCR6^-$ Zellen aus $CD45.2^+$ OT-II Mäusen in $CD45.1^+$ Mäuse und immunisierten diese mit OVA/CpG. Die Analyse der Lymphknoten erfolgte sechs Tage nach Immunisierung, in der akuten Phase der Immunantwort. Ausgehend von der gleichen Anzahl transferierter Zellen expandierten die Spender-Zellen in den Lymphknoten der Rezipienten unterschiedlich. Es konnten viermal mehr transferierte $CD4^+CCR6^-$ als $CD4^+CCR6^+$ Zellen im Lymphknoten der Empfängertiere gefunden werden (Abb. 22). Wir konnten bereits zeigen, dass in der akuten Phase der Immunantwort CCR6-negative Th1 Zellen die dominante Th Zellpopulation ist und Th17 Zellen in den Hintergrund treten (Abb. 12 und Abb. 13). Auch in diesem Transfermodell expandierten transferierte, antigenspezifische $CD4^+CCR6^-$ Zellen sechs Tage nach dem Transfer mit anschließender Immunisierung besser als CCR6-positive Th17 Zellen.

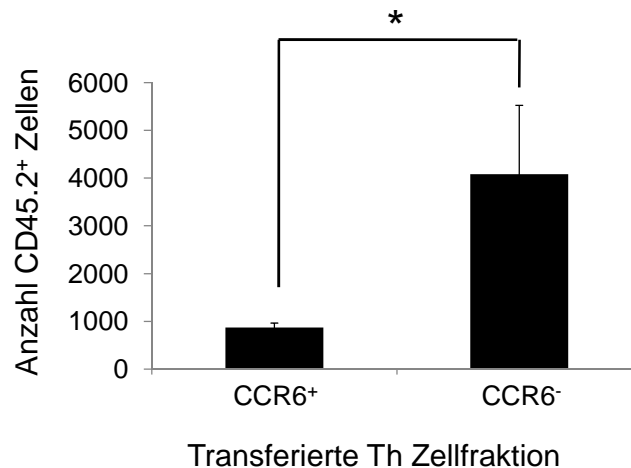


Abb.22: Expansion von transferierten CCR6⁺ und CCR6⁻ Th Zellen. Lymphozyten aus unbehandelten OT-II Mäusen wurden in CCR6⁺ und CCR6⁻ Th Zellen sortiert. Je $2,5 \times 10^5$ Zellen wurden i.v. in drei CD45.1 Mäuse transferiert. 24 h später wurden die Rezipienten mit OVA/CpG immunisiert. Nach 5 Tagen wurden die ableitenden Lymphknoten entnommen und die transferierten Zellen mittels CD45.2 markiert. Die Anzahl der CD45.2⁺ Donor-Zellen in den jeweiligen Rezipienten ist gezeigt; * $p < 0,05$.

Nach dem Zelltransfer analysierten wir die transferierten Zellfraktionen einzeln. Dabei konnten wir feststellen, dass CD4⁺CCR6⁻ Zellen *in vivo* wieder in der Lage waren, CCR6 zu exprimieren und CD4⁺CCR6⁺ Zellen CCR6 wieder verlieren können (Abb. 23). Die Expression von CCR6 bleibt demnach auf Th Zellen nicht über einen längeren Zeitraum vollständig erhalten und aus der CD4⁺CCR6⁻ Zellfraktion entstehen wieder CCR6-positive Th Zellen. CD4⁺CCR6⁺ und CD4⁺CCR6⁻ Zellen sind somit *in vivo* phänotypisch keine stabilen Th Zellpopulationen. Da das angewendete Analyseverfahren die Detektion der Proliferation der Zellen nicht erlaubt, konnten wir nicht unterscheiden, ob die analysierten Zellen aus der „ursprünglichen“ Zellfraktion der transferierten Zellen stammten, oder ob es sich um deren Tochterzellen handelte.

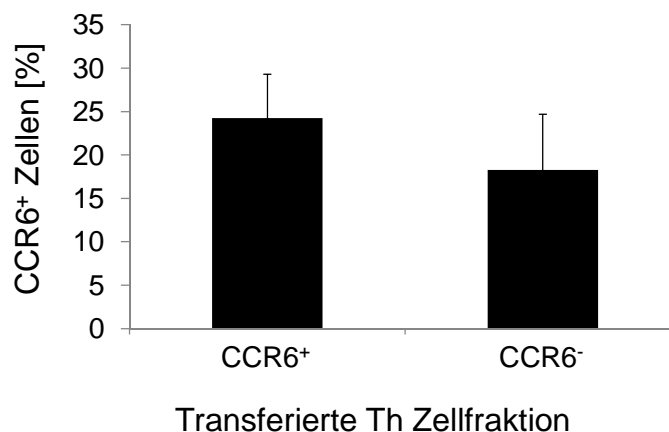


Abb.23: CCR6-Expression von transferierten CCR6⁻ und CCR6⁺ Th Zellen nach Immunisierung. Lymphozyten aus unbehandelten OT-II Mäusen wurden in CCR6⁺ und CCR6⁻ Th Zellen sortiert. Je $2,5 \times 10^5$ Zellen wurden i.v. in drei CD45.1 Mäuse transferiert. 24 h später wurden die Rezipienten mit OVA/CpG immunisiert. Nach 5 Tagen wurden die ableitenden Lymphknoten entnommen und die transferierten Zellen mittels CD45.2 markiert. Gezeigt ist der prozentuale Anteil CCR6 positiver Th Zellen (\pm SD) innerhalb der CD45.2⁺ Zellfraktion.

3.2.2.3 Differenzierung von Th17 Zellen

Wir konnten bereits nachweisen, dass CD4⁺CCR6⁺ und CD4⁺CCR6⁻ Zellen *in vivo* phänotypisch keine starren Zellpopulationen sind (siehe 3.2.2.2). Die Frage, ob diese Zellen während der Immunantwort auch ihre Funktion ändern können, blieb aber bislang unbeantwortet. Wir überprüften, welche Zytokine die transferierten Zellfraktionen im Rezipienten nach der Immunisierung produzieren können. Transferierte CCR6-positive Th Zellen zeigten zum einen die Fähigkeit zur IL-17 Produktion (Abb. 24). Zum anderen konnten wir hier allerdings auch die Produktion von IFN- γ nachweisen. Wir konnten bereits mehrfach demonstrieren, dass die Expression von CCR6 mit der Produktion von IL-17 korreliert und dass alle IFN- γ produzierenden Th Zellen CCR6-negativ sind. Das heißt, dass Zellen, die vor dem Zelltransfer durch die Expression von CCR6 den Th17 Zellen zugeordnet werden können, nach dem Transfer *in vivo* auch zu IFN- γ produzierenden Th1 Zellen re-differenzieren können. In diesem Modell sind Th17 Zellen somit eine plastische Th Zellpopulation, die in andere Th Zell-Subpopulationen differenzieren kann. Ebenso stellten wir fest, dass transferierte CCR6-negative Th Zellen sowohl IFN- γ als auch IL-17 produzieren konnten (Abb. 24). Daraus lässt sich ableiten, dass nicht nur Th17 zu Th1 Zellen, sondern auch aus Th1 zu Th17 Zellen differenzieren können.

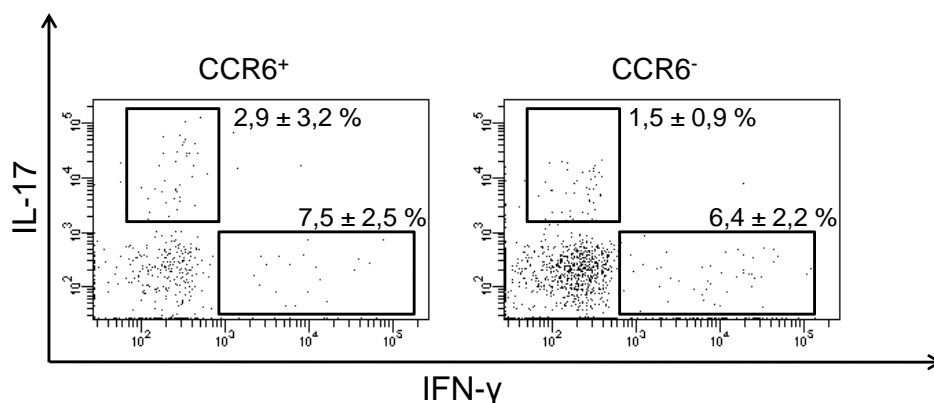


Abb.24: Zytokinprofil transferierter Zellfraktionen nach Immunisierung *in vivo*. Lymphozyten aus unbehandelten OT-II Mäusen wurden in CCR6⁺ und CCR6⁻ Th Zellen sortiert. Je $2,5 \times 10^5$ Zellen wurden i.v. in drei CD45.1 Mäuse transferiert. 24 h später wurden die Rezipienten mit OVA/CpG immunisiert. Nach 5 Tagen wurden die ableitenden Lymphknoten entnommen und die transferierten Zellen mittels CD45.1 markiert. Die transferierten Zellfraktionen (linke Seite: aus den CD4⁺CCR6⁺ und rechte Seite aus den CD4⁺CCR6⁻ Transfers) wurden mit CD45.2 markiert und der Anteil an IL-17 und IFN- γ Produzenten innerhalb der CD45.2⁺ Zellfraktion wurde ermittelt.

3.3 Die Rolle von CCR6-positiven Th17 Zellen bei der Entstehung von chronisch-entzündlichen Erkrankungen

3.3.1 Modell der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis

Um funktionell den Zusammenhang zwischen der IL-17 Produktion und der Expression von CCR6 bei Th Zellen zu zeigen, wurde die *adoptive transfer - experimental autoimmune encephalomyelitis* (at-EAE), ein Mausmodell der multiplen Sklerose beim Menschen, angewendet. Hierbei werden voraktivierte, myelin-spezifische Th Zellen aus den Lymphknoten von Donormäusen in Rezipienten überführt. Die transferierten Zellen passieren die Blut-Hirn-Schranke und aktivieren weitere, autoreaktive Zellen. Infolge dessen infiltrieren weitere inflammatorische Leukozyten das ZNS, was letztlich zum Ausbruch der Krankheit führt. Zehn Tage nach der Induktion einer EAE mit PLP in SJL/J Mäusen entnahmen wir die ableitenden Lymphknoten und sortierten die Zellen in CD4⁺CCR6⁻ und CD4⁺CCR6⁺ Zellen. Beide Fraktionen wurden polyklonal stimuliert und nach 72 h wurde aus den

Überständen die Menge an IL-17 Protein bestimmt. Die $CD4^+CCR6^-$ Zellen produzierten nur sehr wenig IL-17. Im Gegensatz dazu zeigten $CD4^+CCR6^+$ Zellen die deutliche IL-17 Produktionsfähigkeit (Abb.25).

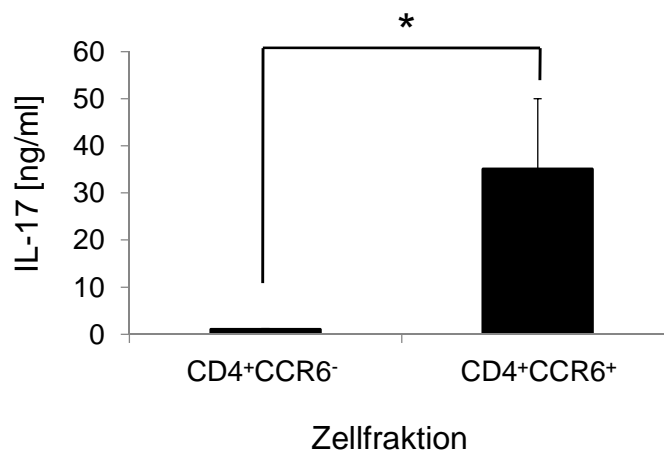


Abb. 25: IL-17 Produktion von $CD4^+CCR6^+$ Lymphknotenzellen nach PLP-Immunisierung. SJL/J Mäuse wurden mit PLP immunisiert und nach 10 Tagen getötet. Lymphknotenzellen wurden isoliert und in $CD4^+CCR6^-$ und $CD4^+CCR6^+$ Zellen sortiert. Die Zellen wurden für 72 h mit anti-CD3 stimuliert. Die Menge an IL-17 wurde mittels ELISA bestimmt. Gezeigt ist die mittlere Proteinmenge (\pm SD) aus 3 unabhängigen Versuchen. * $p < 0,05$.

Die Depletion der $CD4^+CCR6^+$ Zellen aus den Gesamt-Lymphozyten sollte nun die IL-17 Produktionsfähigkeit dieser Zellen stark eingeschränkt sein. Dazu sortierten wir Lymphknotenzellen aus PLP immunisierten SJL/J Mäusen in zwei Fraktionen: Eine Zellfraktion enthielt den kompletten Satz an Zellen aus dem Lymphknoten, der anderen Zellfraktion wurden die $CD4^+CCR6^+$ Zellen depletiert. Beide Fraktionen wurden antigenspezifisch mit PLP stimuliert. Nach 72 h wurde die Anzahl an IL-17 produzierenden Th Zellen ermittelt. Die Anzahl an Th17 Zellen bei $CD4^+CCR6^+$ -depletierten Zellen war deutlich geringer als bei Lymphknotenzellen, die CCR6-positive Th Zellen enthielten (Abb. 26). Somit ist die Expansion der Th17 Zellen massiv eingeschränkt, wenn $CD4^+CCR6^+$ Zellen fehlen.

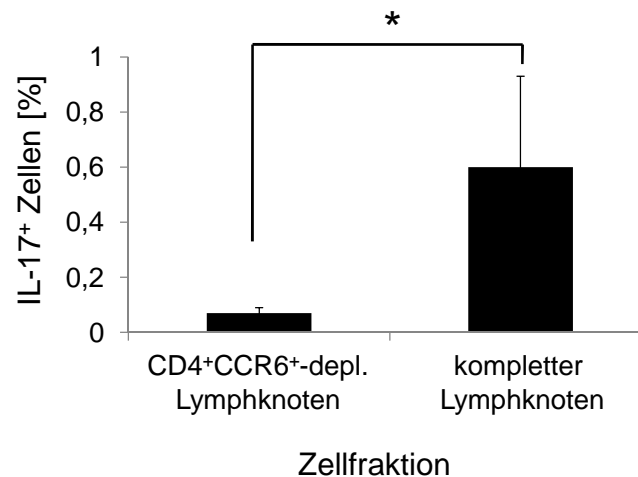
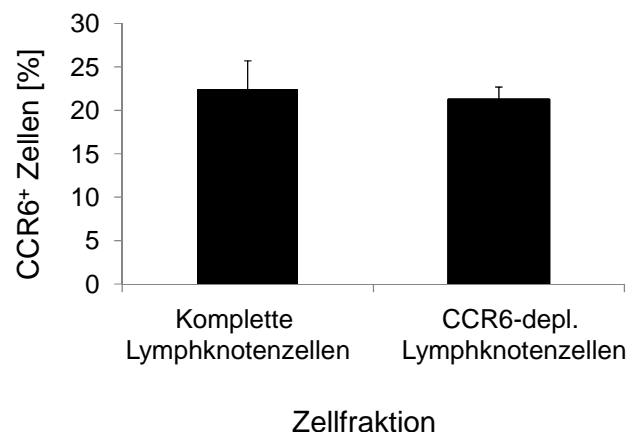


Abb. 26: Anteil der Th17 Zellen nach der Depletion von CD4⁺CCR6⁺ Zellen nach PLP Immunisierung. SJL/J Mäuse wurden, wie in Material und Methoden beschrieben, immunisiert. CD4⁺CCR6⁺-depletierte Zellen (schwarze Balken) oder komplette Lymphknotenzellen (weiße Balken) wurden für 72 h mit PLP stimuliert. Die Daten stammen aus 4 unabhängigen Experimenten, * p < 0,05. Intrazelluläre Markierung von Zytokinen wurde, wie in Material und Methoden beschrieben, durchgeführt. Gezeigt ist der prozentuale Anteil (± SD) IL-17 positiver Zellen innerhalb der CD4⁺ Fraktion.

Die Produktion von IL-17 korrelierte auch bei diesen Experimenten mit der Expression von CCR6 auf der Oberfläche von Th Zellen. Wir konnten bereits zeigen, dass sortierte CD4⁺CCR6⁻ Zellen *in vivo* nach Immunisierung wieder CCR6 exprimieren und dass CD4⁺CCR6⁺ Zellen CCR6 verlieren können (Abb. 23). In diesem Versuch depletierten wir aus den Lymphknotenzellen von PLP-immunisierten Mäusen die CD4⁺CCR6⁺ Zellfraktion und stimulierten diese Zellen *in vitro* mit Antigen für drei Tage. Auch hier detektierten wir nach der Stimulation wieder CD4⁺CCR6⁺ Zellen (Abb. 27). Allerdings waren diese Zellen im Hinblick auf die IL-17 Produktion nicht funktionell (Abb. 26). Welche Funktion sie tatsächlich erfüllen, konnte nicht gezeigt werden. Betrachtet man die Analyse von Lymphknotenzellen, die den vollständigen Satz an Th Zellen enthält, fällt auf, dass hier der Anteil an CD4⁺CCR6⁺ Zellen genauso hoch war wie bei den CD4⁺CCR6⁺ depletierten Lymphknotenzellen (Abb. 27). Bezüglich ihrer CCR6-Expression kann man somit die Th Zellen aus den beiden Zellfraktionen nach der *in vitro* Stimulation nicht unterscheiden, doch zeigen Lymphknotenzellen, bei denen CD4⁺CCR6⁺ Zellen depletiert wurden, eine sehr schwache IL-17 Produktion.

Abb. 27: CCR6-Expression nach Stimulation sortierter Zellen. SJL/J Mäuse wurden behandelt wie in Abb. 26. Der Anteil CCR6⁺ Zellen innerhalb der CD4⁺ Zellfraktion in Prozent (\pm SD) ist gezeigt.



In der Hauptsache verursachen IL-17 Produzenten die Entwicklung der EAE (Komiyama et al., 2006). In den vorangegangenen Experimenten konnten wir zeigen, dass die Menge an produzierten IL-17 und der Anteil der Th17 Zellen innerhalb der Th Zellpopulation durch die Depletion von CD4⁺CCR6⁺ Zellen erheblich vermindert war. Daher war zu erwarten, dass der Transfer von CD4⁺CCR6⁺-depletierten Lymphknotenzellen im Modell der at-EAE die Schwere der Erkrankung deutlich abschwächt. Der Transfer von Gesamt-Lymphknotenzellen aus vorimmunisierten Donoren löste nach fünf Tagen eine schwere EAE aus. Dagegen konnte bei Mäusen, denen CD4⁺CCR6⁺-depletierte Lymphknotenzellen transferiert wurden, ein deutlich abgeschwächter Verlauf der EAE beobachtet werden (Abb. 28), wenn auch der Ausbruch der Erkrankung durch die Depletion von CD4⁺CCR6⁺ Zellen nicht vollständig verhindert wurde. Während durch den Transfer von kompletten Lymphknotenzellen alle Tiere erkrankten und 3/5 davon starben, überlebten durch die Depletion von CD4⁺CCR6⁺ Zellen alle Mäuse. In einem Fall konnte der Ausbruch der EAE sogar vollständig verhindert werden (Tab. 4).

Somit konnte auch funktionell im Krankheitsmodell EAE gezeigt werden, dass CCR6 als Merkmal zur Isolation von Th17 Zellen während der Immunreaktion verwendet werden kann. Zudem beschreibt CCR6 auch antigenspezifisch induzierte Th17 Zellen.

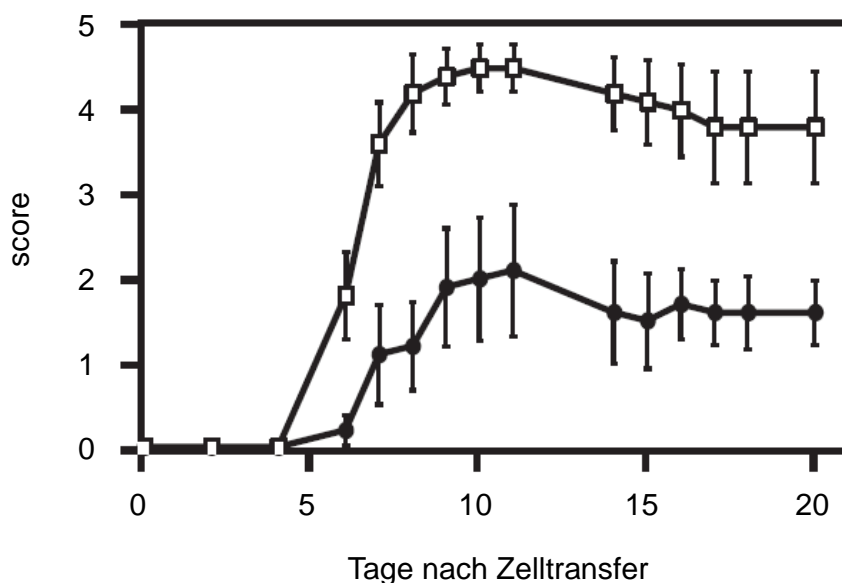


Abb. 28: Die Depletion von CD4⁺CCR6⁺ Zellen mildert die Schwere der Erkrankung in der Transfer-EAE. SJL/J Mäuse wurden, wie in Material und Methoden beschrieben, immunisiert. Nach 10 Tagen wurden die Lymphknoten entnommen. Komplette Lymphknotenzellen (weiße Symbole) oder CD4⁺CCR6⁺-depletierte Zellen (schwarze Symbole) wurden *in vitro* für 72 h mit PLP re-stimuliert und anschließend jeweils in gesunde Mäuse transferiert. Gezeigt sind die mittleren EAE scores der Rezipienten. Die Mausgruppen bestanden aus jeweils 5 Tieren; * p < 0,05 von Tag 6 bis Tag 17.

Tabelle 4. Die Depletion von CD4⁺CCR6⁺ Zellen mildert die Schwere der Erkrankung in der Transfer-EAE.

Transferierter Zelltyp	Auftreten ^a	Mortalität ^a	Tag des Beginns der Erkrankung	maximaler score	kumulativer score ^b
Komplette LKZ ^c	5 / 5	3 / 5	6 (± 0; n = 5)	4.5 (± 0.7; n = 5)	46.7 (± 14.1; n = 5)
CD4 ⁺ CCR6 ⁺ depletierte LKZ ^c	4 / 5	0 / 5	10 (± 4.6; n = 5) ^d	2.6 (± 1.6; n = 5) ^d	18.1 (± 13.9; n = 5) ^d

^a Klinischer Ausbruch der EAE von Mäusen, die entweder komplette Lymphknotenzellen oder CD4⁺CCR6⁺ depletierte Lymphozyten erhalten haben. Der Beobachtungszeitraum war 20 Tage.

^b Kumulativer score wurde durch Addition aller individueller scores berechnet.

^c LKZ, Lymphknotenzellen

^d p < 0.05 verglichen mit Kontroll-Mäusen; Mann-Whitney U Test.

3.3.2 CCR6-positive Th17 Zellen bei Rankämpfen männlicher Mäuse

Wir konnten bereits zeigen, dass CCR6-positive Th17 Zellen für die Entstehung von Autoimmunerkrankungen verantwortlich sind. Chronische Entzündungen und Autoimmunerkrankungen sind vom Verlauf ähnlich, da sie sich über einen längeren Zeitraum erstrecken wie akute Entzündungen. Männliche Mäuse zeigen Rankämpfe, bei denen ein Tier dominant ist und die anderen Tiere sich diesem Tier unterordnen. Dabei kommt es aufgrund von Beißattacken des dominanten Männchens auch zu Verletzungen des unterlegenen Tieres. Diese aggressiven Tiere werden nach ihrer Entdeckung sofort aus den Käfigen entfernt. Da die unterlegenen Mäuse neben dem psycho-sozialen Stress auch eine chronische Entzündung an den verletzten Stellen zeigen, untersuchten wir, ob diese Art der chronischen Belastung des Tieres eine Auswirkung auf ihre Th17 Zell-Immunantwort hat. Bei Untersuchung der unterlegenen Mäuse waren deren periphere Lymphknoten und die Milz stark vergrößert (Daten nicht gezeigt). Der prozentuale Anteil an aktivierten und CCR6-positiven Th Zellen in den inguinalen Lymphknoten und der Milz ist in der unterlegenen Maus deutlich erhöht (Abb. 29A). Während bei akuten Entzündungen Th1 Zellen die vorherrschende Th Zellpopulation sind, halten sich bei chronischen Entzündungen die Anzahl der Th17 und Th1 Zellen die Waage. In den inguinalen Lymphknoten ist die Anzahl an Th17 Zellen sogar deutlich höher als die der Th1 Zellen (Abb. 29B). Das Gleichgewicht zwischen Th1 und Th17 Zellen ist in den Lymphknoten von unterlegenen Mäusen ins Ungleichgewicht zugunsten der Th17 Zellen hin verschoben. Der Anteil an aktivierten Th1 und Th17 Zellen im Lymphknoten und der Milz war bei den dominanten Mäusen gegenüber den unterlegenen Mäusen sehr viel geringer.

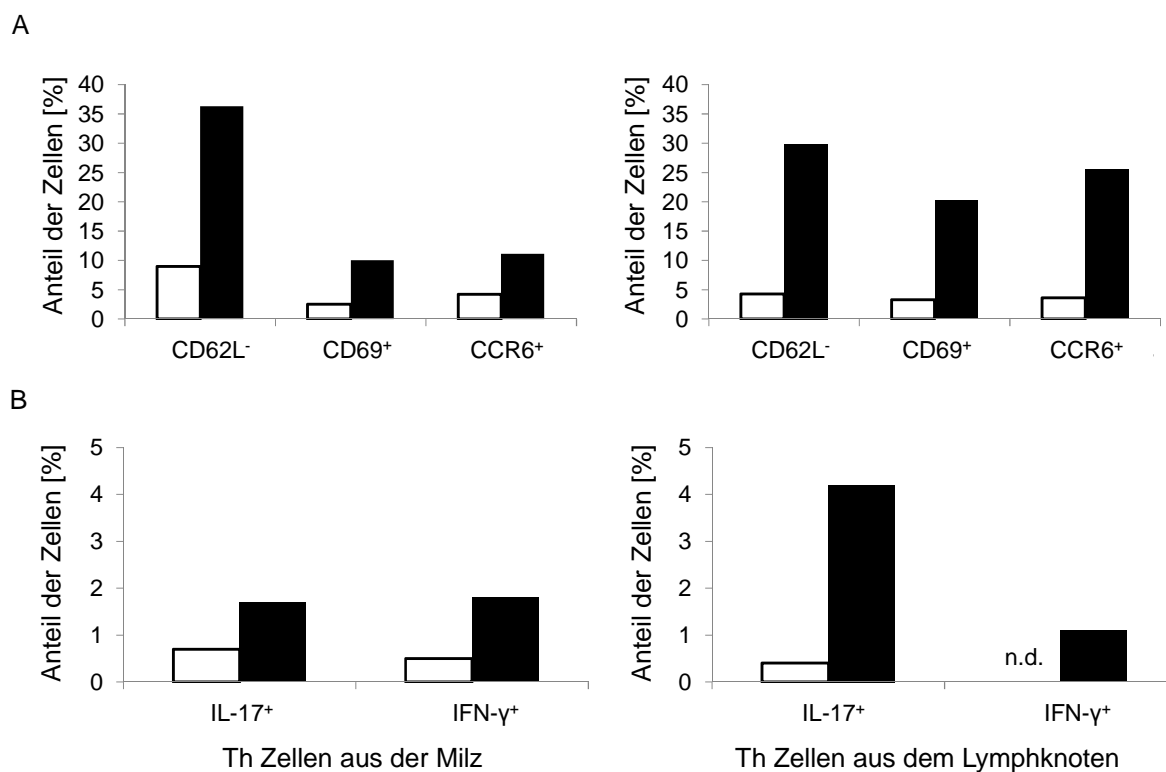


Abb. 29: Aktivierungsmarker und proinflammatorische Zytokine unterlegener Mäuse. Unterlegenen (schwarze Balken) und dominanten (weiße Balken) Mäusen wurden inguinale Lymphknoten (linke Seite) und die Milz (rechte Seite) entnommen. **(A)** Gezeigt ist der prozentuale Anteil an CD62L⁻, CD69⁺ und CCR6⁺ Zellen innerhalb der Th Zellfraktion. **(B)** Die intrazelluläre Zytokin-Markierung erfolgte, wie in Material und Methoden beschrieben, sofort *ex vivo*. Der Anteil an IL-17⁺ und IFN-γ⁺ Th Zellen innerhalb der Lymphozyten-Zellfraktion ist gezeigt; n.d. = nicht detektierbar. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment.

3.3.3 Th17 Zellantwort in der Stressreaktion

Autoimmunerkrankungen, wie die EAE, stellen eine Form der chronischen Entzündung dar. Infolge von chronischer Stressexposition konnte gezeigt werden, dass Tiere, die chronischem Stress ausgesetzt waren, empfänglicher für chronisch-entzündliche Darmerkrankungen sind. Weiter ist die Regenerationsfähigkeit des Organismus gestört (Reber et al., 2006; Reber et al., 2007). Daher haben wir die Th17 Zellantwort, die Th Zell-Population, die für die Auslösung von Autoimmunerkrankungen verantwortlich gemacht wird, in chronisch gestressten Mäusen untersucht. In Zusammenarbeit mit Frau Prof. Neumann und Herrn Dr. Reber (beide Lehrstuhl für Tierphysiologie/Neurobiologie der Universität Regensburg) wurden Mäuse einem chronischen Stress ausgesetzt (siehe Material

und Methoden). Obwohl bereits gezeigt werden konnte, dass chronischer Stress bei Mäusen den Gastro-Intestinal-Trakt schädigen kann, war noch unklar, ob die Stressexposition auch systemisch beeinflusst. Dazu wurden axiale und inguinale Lymphknoten von gestressten Mäusen entnommen. Auch nach Stress ist CCR6 wieder auf IL-17 produzierenden Th Zellen zu finden und IFN- γ Produzenten tragen kein CCR6 (Abb. 30). Diese Korrelation hat sich bei allen Versuchen gezeigt, die wir bisher durchgeführt haben und beweist erneut die Effektivität von CCR6 als Marker für Th17 Zellen.

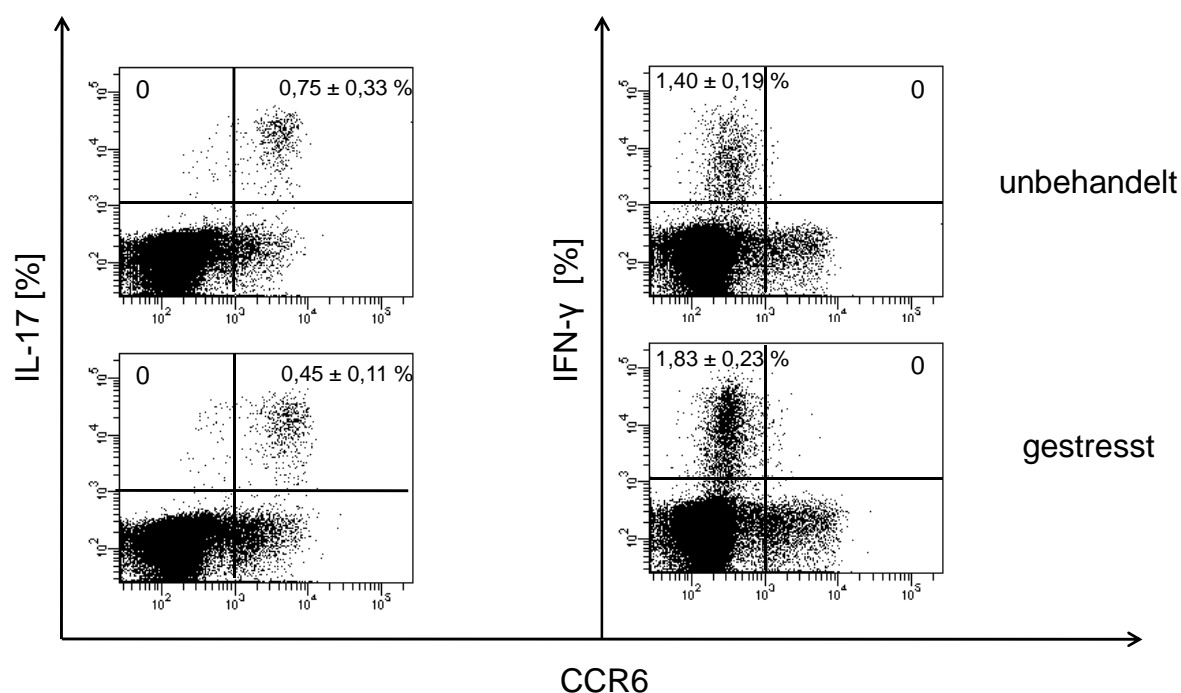


Abb. 30: CCR6-Expression bei Th17 und Th1 Zellen bei gestressten Mäusen. C57BL/6 Mäuse wurden, wie in Material und Methoden beschrieben, einem chronischen Stress ausgesetzt. Periphere Lymphknoten wurden entnommen und Lymphknotenzellen mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die Expression von CCR6 und IL-17 bzw. IFN- γ innerhalb der CD4⁺ Zellfraktion in unbehandelten (obere Spalte) und gestressten (untere Spalte) Tieren ist gezeigt. Die Dotplots sind repräsentativ für jeweils 4 Versuchstiere.

Weiter analysierten wir, ob der Anteil an proinflammatorischen Th Zellpopulationen im Lymphknoten gestresster Tiere erhöht ist. Die Lymphknotenzellen aus gestressten Mäusen zeigten gegenüber Kontroll-Tieren einen signifikant erhöhten Prozentsatz an Th1 Zellen. Der Anteil an CCR6-positiven Th17 Zellen im Lymphknoten gestresster Tiere war dagegen vermindert (Abb. 31). Die Th1 Antwort wird bei gestressten Tieren also gefördert. Dies lässt vermuten, dass auch eine hohe

Menge an IFN- γ im Lymphknoten dieser Tiere vorhanden ist. Wir konnten bereits zeigen, dass IFN- γ nicht nur *in vitro*, sondern auch *in vivo* die Entwicklung von Th17 Zellen hemmt. Stress zeigt somit auch eine systemische Auswirkung auf das Immunsystem; der Anteil an Th17 Zellen sinkt, der von Th1 Zellen steigt an.

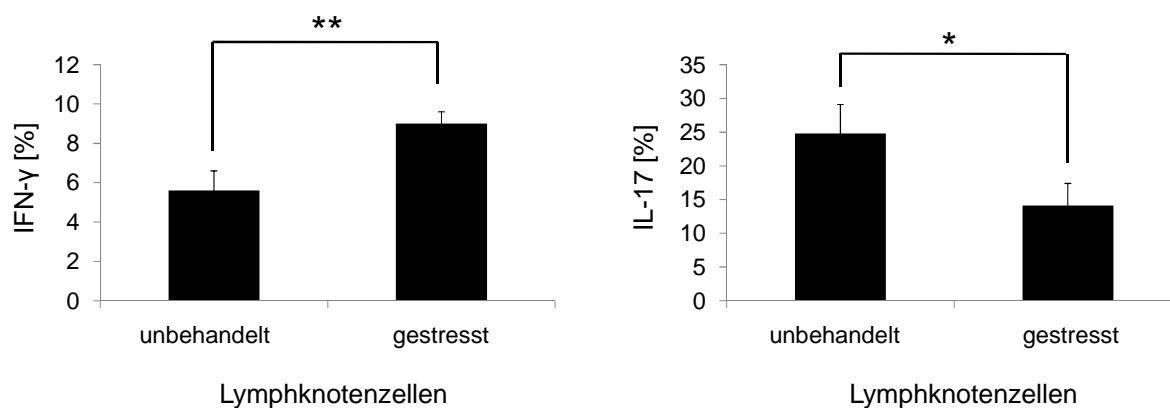


Abb. 31: Th1 und Th17 Zell-Anteil in den peripheren Lymphknoten gestresster Mäuse. C57BL/6 Mäuse wurden, wie in Material und Methoden beschrieben, einem chronischen Stress ausgesetzt. Periphere Lymphknoten wurden entnommen und Lymphknotenzellen wurden mit PMA/Iono in Gegenwart von GolgiStop für 4 h stimuliert. Der prozentuale Anteil (\pm SD) an IFN- γ Produzenten (linke Seite) innerhalb der CD4⁺CCR6⁻ Zellfraktion und IL-17 (rechte Seite) positiver Zellen innerhalb der CD4⁺CCR6⁺ Zellfraktion von unbehandelten Tieren und gestressten Tieren ist gezeigt. Die Daten stammen aus jeweils 4 Versuchstieren. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Bei akuten Schüben von Autoimmunerkrankungen verabreicht man den Patienten Immunsuppressiva, wie Glucocorticoide, die zwar kurzfristig die Beschwerden lindern, aber langfristig die Erkrankung nicht heilen können (Gayo et al., 1998). Bei akutem Stress verhindert die Ausschüttung von Glucocorticoiden ein „Überschießen“ der Immunreaktion. Es konnte bereits gezeigt werden, dass chronischer Stress zu einer verminderten Ausschüttung von Corticosteron bei Mäusen führt und den Verlauf von chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen verschlimmert (Reber et al., 2006). Wir fragten uns deshalb, ob Stress bei Th1 und Th17 Zellen die Wirkung von Glucocorticoiden beeinflusst. Wir inkubierten periphere Lymphknotenzellen von unbehandelten und gestressten Tieren mit Dexamethason *in vitro* unter Stimulation des T-Zell-Rezeptors. 24 h nach Dexamethason-Gabe konnten wir bereits eine nahezu vollständige Depletion des Th1 Zell-Anteils im Lymphknoten detektieren (Abb. 32A). Allerdings konnten wir nicht feststellen, dass Th1 Zellen in gestressten Tieren

unempfindlicher gegenüber Glucocorticoiden waren. Die gewählte Dexamethason-Konzentration von 1 μM führt hier zu einer generellen Suppression der Th1 Zellantwort, unabhängig davon, ob die Tiere gestresst waren oder nicht. Um die Effekte von Stress auf die Glucocorticoid-Wirkung auf Th1 Zellen zu analysieren, ist eine Titration der Verabreichungsmenge noch erforderlich.

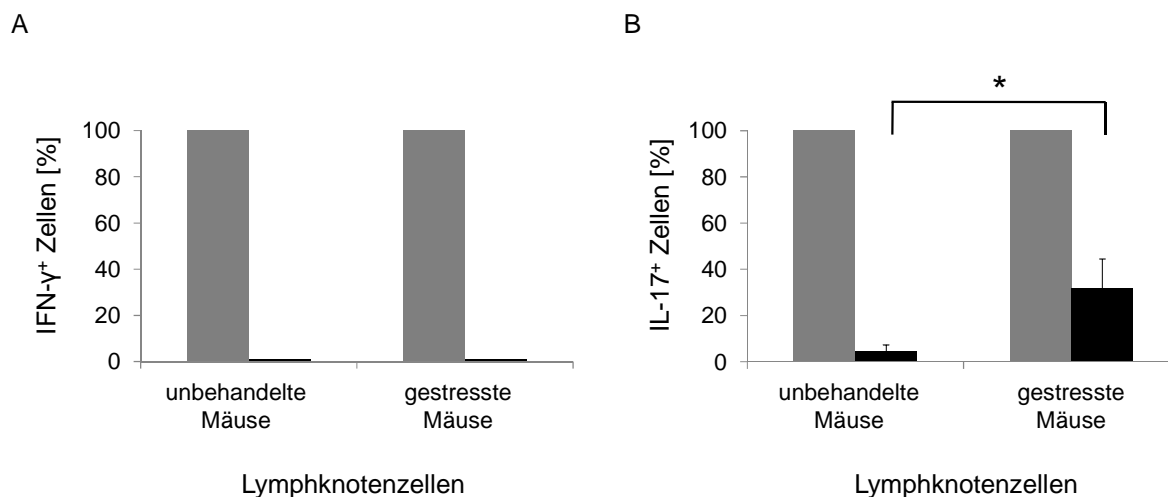


Abb. 32: Die Wirkung von Dexamethason in gestressten Tieren auf die Th Zellantwort. 4 C57BL/6 Mäuse wurden, wie in Material und Methoden beschrieben, chronischem Stress ausgesetzt. Die gleiche Anzahl an Kontroll-Tieren blieb unbehandelt. Nach 21 Tagen wurden die axialen und inguinalen Lymphknoten entnommen. Die Lymphknotenzellen wurden mit anti-CD3 stimuliert und im Medium alleine (graue Balken) oder in Gegenwart von Dexamethason ($c = 1 \mu\text{M}$, schwarze Balken) inkubiert. Nach 24 h wurde zu den Zellen für 4 h GolgiStop gegeben. Danach wurde intrazelluläres IFN- γ und IL-17 markiert. Der Anteil an Zytokin-positiven Zellen, die in Medium allein inkubiert wurden, wurde als 100 % betrachtet. Der prozentuale Anteil an Zytokin-positiven Zellen nach Dexamethason-Behandlung ergibt sich aus dem Quotienten: Dexamethason-behandelte Zellen / Medium inkubierte Zellen * 100 %. Gezeigt ist der Anteil von IFN- γ Produzenten innerhalb der CD4⁺CCR6⁻ Zellfraktion (A) und IL-17 positiver Zellen innerhalb der CD4⁺CCR6⁺ Zellfraktion (B) \pm SD aus unbehandelten und gestressten Mäusen. * $p < 0,05$.

Die Wirkung von Glucocorticoiden auf Th17 Zellen brachte allerdings ein überraschendes Ergebnis. Nach der Glucocorticoid-Behandlung der Lymphknotenzellen *in vitro* war die immunsuppressive Wirkung von Dexamethason gegenüber Th17 Zellen in gestressten Mäusen um das sechsfache geringer als in unbehandelten Tieren (Abb. 32B). Chronischer Stress bedingt somit bei den Th17 Zellen den Aufbau einer Glucocorticoid-Resistenz, bei Th1 Zellen konnten wir in

unseren Versuchen diese Entwicklung nicht beobachten. Bei Autoimmunerkrankungen, die Th17 Zell-vermittelt sind, kann Stress somit Therapien, die auf der immunsuppressiven Glucocorticoid-Wirkung aufbauen, maßgeblich negativ beeinflussen.

3.4 Wirkweise von Th17 Zellen

In den vorangegangenen Kapiteln haben wir CCR6 als validen Marker für funktionelle und antigenspezifische Th17 Zellen identifiziert. Da die Wirkung dieser Zellen auf den Verlauf der physiologischen Immunreaktion noch immer weitgehend unklar ist, haben wir in den folgenden Experimenten die Interaktion von Th17 Zellen mit anderen Immunzellen näher untersucht. Zum einen sollen Kokultur Experimente mit aktivierten CCR6-positiven Th17 Zellen und myeloiden Zellen Aufschluss darüber geben, ob die postulierte Stellung der Th17 Zellen als Bindeglied zwischen adaptiver und angeborener Immunantwort bestätigt werden kann. Zum zweiten sollen Transferversuche mit gereinigten CD4⁺CCR6⁺ Zellen zeigen, ob *in vivo* die Immunantwort durch Th17 Zellen selektiv beeinflusst wird.

3.4.1 Zytokinantwort von myeloiden Zellen auf aktivierte Th17 Zellen

IL-17 induziert bei Makrophagen die Sezernierung proinflammatorischer Zytokine (Jovanovic et al., 1998) und löst bei Fibroblasten die Produktion von Wachstumsfaktoren, wie GM-CSF, aus (Cai et al., 1998; Fossiez et al., 1996). GM-CSF fördert die Entstehung von unreifen dendritischen Zellen aus myeloiden Vorläuferzellen. Wir wollten wissen, ob Th17 Zellen die Differenzierung von myeloiden Zellen aus Vorläuferzellen beeinflussen. Dies würde ihre Rolle als Bindeglied zwischen adaptiver und angeborener Immunantwort unterstreichen. Dazu wurden CCR6-positive Th17 Zellen und CCR6-negative Th Zellen aus den Lymphknoten von C57BL/6 Mäusen isoliert, polyklonal stimuliert und zusammen mit myeloiden Zellen in Transwell Kammern kultiviert (siehe Material und Methoden). Als Quelle für myeloide Zellen wählten wir Knochenmarkzellen. Das Knochenmark setzt

sich zusammen aus myeloiden und lymphoiden Vorläuferzellen, Fibroblasten und Gedächtniszellen. Weiter sind hier vor allem Granulozyten und Makrophagen von besonderem Interesse, da sie die erste Verteidigungslinie bei Infektionen in der frühen Phase der Immunreaktion sind. In unserem Versuchsaufbau standen die Th Zellen und die Knochenmarkzellen nicht in direktem Kontakt miteinander, sondern wurden durch eine Membran voneinander getrennt, die nur den Austausch von löslichen Substanzen erlaubte, den Zell-Zell Kontakt aber verhinderte. Nach acht Tagen wurden in den Überständen Zytokine nachgewiesen. $CD4^+CCR6^+$ produzierten IL-17, während $CD4^+CCR6^-$ Zellen kein IL-17 sezernierten (Abb. 33). Weiter lösten $CD4^+CCR6^+$ Zellen durch den Austausch von löslichen Substanzen mit Zellen aus dem Knochenmark die Produktion einer Vielzahl von Zytokinen aus (Tab. 5). Der Nachweis von GM-CSF zeigt, dass durch CCR6-positive Th17 Zellen die Produktion von Wachstumsfaktoren induziert werden kann. Zusätzlich konnten wir die Sezernierung von Th1 (IFN- γ) und Th2 spezifischen (IL-4, IL-5, IL-10) Zytokinen detektieren. Bei $CD4^+CCR6^-$ Zellen konnte lediglich die Produktion von IFN- γ nachgewiesen werden, was auf die T-Zell-Rezeptor-Stimulation mit anti-CD3 zurückzuführen ist.

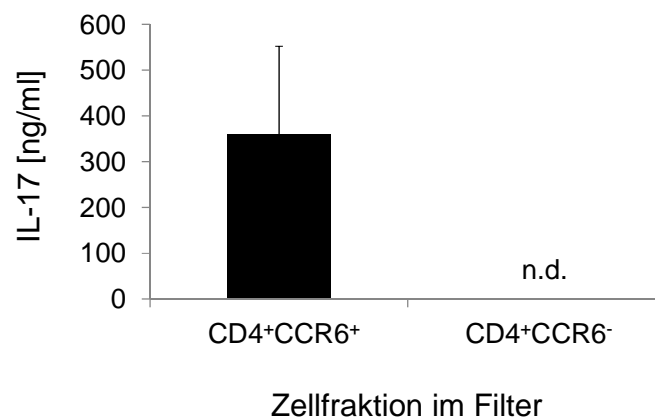


Abb. 33: IL-17 Produktion von $CD4^+CCR6^+$ Zellen in Wechselwirkung mit Knochenmarkzellen. Knochenmarkzellen aus naiven C57BL/6 Mäusen wurde mit $CCR6^+$ und $CCR6^-$ Th Zellen kokultiviert (siehe Material und Methoden). Nach 8 Tagen wurden Überstände abgenommen und die Menge an IL-17 mittels ELISA detektiert. Gezeigt ist die Menge an produzierten IL-17 \pm SD. Die Daten stammen aus 2 unabhängigen Experimenten mit jeweils 4 Mäusen.

Wir fragten uns nun, ob IL-17 Protein alleine die Produktion der Zytokine oder von GM-CSF auslösen kann. Dazu gaben wir IL-17 Protein zu verschiedenen Konzentration zu Knochenmarkzellen. In diesem Versuch konnten wir mit keiner IL-17 Konzentration die Produktion von Zytokinen oder Wachstumsfaktoren auslösen (Daten nicht gezeigt). Somit beeinflussen Th17 Zellen Knochenmarkzellen und induzieren eine starke Zytokinantwort; lösliches IL-17 alleine ist nach unseren Daten allerdings nicht in der Lage diese Zytokinausschüttung hervorzurufen. Abschließend bleibt festzuhalten, dass IL-17 produzierende Zellen, im Vergleich zu konventionellen Th Zellen, im Wechselspiel mit Knochenmarkzellen die Produktion einer Vielzahl von Zytokinen auslösen. Da IL-17 alleine diesen Effekt nicht zeigt, ist davon auszugehen, dass weitere, noch nicht genau definierte Zytokine, an dieser Wirkung beteiligt sind.

Tab. 5: CD4⁺CCR6⁺ Zellen induzieren die Produktion von Zytokinen. Knochenmarkzellen aus einer naiven C57BL/6 Maus wurden mit CCR6⁺ und CCR6⁻ Th Zellen kokultiviert (siehe Material und Methoden). Nach 8 Tagen wurden Überstände abgenommen. Die vorhandenen Zytokine wurden mittels Zytokin-Array bestimmt. n.d. = nicht detektierbar.

Zellfraktion	Zytokine					
	GM-CSF	IL-6	IL-10	IL-4	IL-5	IFN- γ
CD4 ⁺ CCR6 ⁺	+	+	+	+	+	+
CD4 ⁺ CCR6 ⁻	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	+

3.4.2 Auswirkungen auf die Immunantwort des Rezipienten durch den Transfer von Th17 Zellen

3.4.2.1 Einfluss von Th17 Zellen auf die zelluläre Immunantwort im Lymphknoten

Im vorherigen Kapitel konnten wir zeigen, dass Th17 Zellen die Produktion von Zytokinen und Wachstumsfaktoren *in vitro* auslösen. Dies führt uns zu der Hypothese, dass antigenspezifische Th17 Zellen die Initiierung der Immunreaktion *in vivo* beschleunigt. Wir transferierten daher sortierte CCR6-positive Th17 Zellen und CCR6-negative Th Zellen aus OT-II Mäusen in naive Rezipienten. Die Tiere wurden immunisiert und anschließend wurde überprüft, ob die transferierten antigen-

spezifischen Th17 Zellen die Immunantwort modifizieren, indem sie für eine erhöhte Rekrutierung von Immunzellen in den Lymphknoten sorgen. Dazu wurden die Zellzahlen der ableitenden Lymphknoten der Empfängermäuse nach Immunisierung bestimmt. Im Vergleich zum nicht-immunisierten Tier ist nach der Impfung an Tag fünf stets eine Zunahme um das 10fache der Ausgangs-Zellzahl festzustellen. Allerdings war die Gesamt-Zellularität in den Lymphknoten unabhängig von der Art der transferierten Zellen (Abb. 34A).

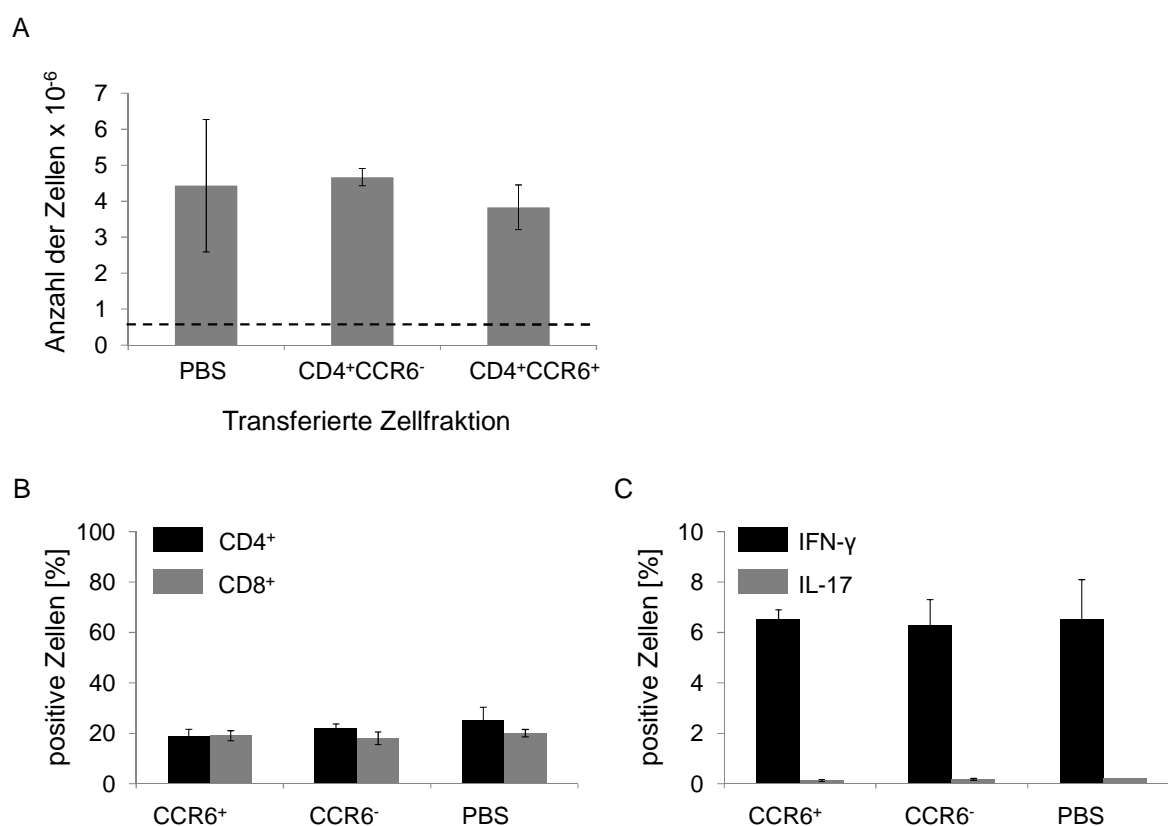


Abb. 34: T-Zell-Populationen und Zytokinprofil im Lymphknoten nach Zelltransfer und Immunisierung. Lymphozyten aus naiven OT-II Mäusen wurden wie in Abb. 22 sortiert und in CD45.1 Mäuse transferiert. Nach 24 h wurden die Tiere immunisiert und nach weiteren 5 Tagen wurden die ableitenden Lymphknoten entnommen. **(A)** Die Anzahl der Lymphknotenzellen nach dem Transfer von CD4⁺CCR6⁻ und CD4⁺CCR6⁺ Zellen bzw. PBS als Kontrolle ist gezeigt. Die gestrichelte Linie zeigt die Zellzahl von poplitealen Lymphknoten naiver Tiere. **(B)** Gezeigt ist der prozentuale Anteil (± SD) an gesamt CD4⁺ (schwarzer Balken) und CD8⁺ (grauer Balken) Zellen in den Lymphknoten der verschiedenen Rezipienten. **(C)** Der prozentuale Anteil (± SD) an IFN-γ (schwarzer Balken) und IL-17 (grauer Balken) produzierenden Zellen in den Lymphknoten der unterschiedlichen Empfängertiere ist dargestellt.

Transferierte CCR6-positive Th17 Zellen führten somit nicht zu einer erhöhten Akkumulation von Zellen im ableitenden Lymphknoten des Rezipienten. Weiter wurde überprüft, ob sich die prozentuale Zusammensetzung des Lymphknotens durch den Zelltransfer beeinflussen ließ. Es zeigte sich, dass der Anteil an CD4- oder CD8-positiven Zellen im Lymphknoten der Empfängermäuse gleich war, unabhängig von der transferierten Zellfraktion (Abb. 34B). Auch konnten wir keinen Unterschied im Anteil der IL-17 und IFN- γ Produzenten in Abhängigkeit von der transferierten Zellpopulation feststellen (Abb. 34C). Th17 Zellen konnten somit in diesem Modell keine Modulation der Immunantwort im ableitenden Lymphknoten bewirken.

3.4.2.2 Einfluss von Th17 Zellen auf die Rekrutierung von Immunzellen in periphere Entzündungsherde

Bisher konnten wir durch den Transfer von CD4⁺CCR6⁺ Zellen, im Vergleich zu CD4⁺CCR6⁻ Zellen, im Lymphknoten des Empfängertieres keine Veränderungen in der Immunantwort detektieren. Durch die Immunisierung in die Pfote der Maus lösen wir dort eine lokale Entzündungsreaktion aus. Wir fragten uns, ob CCR6-positive Th17 Zellen die Entzündungsreaktion im Fuß verstärken, indem das sezernierte IL-17 bei Endothelzellen die Produktion von Zytokinen und Chemokinen fördert, was zu einer Rekrutierung von weiteren Immunzellen an den Ort der Antigenapplikation führt. Dazu transferierten wir komplette und CCR6-depletierte OVA-spezifische Th Zellen in die Rezipienten und immunisierten die Empfängertiere mit spezifischem Antigen. Da CCR6 für die Migration von T-Zellen in die nicht-lymphatischen Gewebe wichtig ist, erwarten wir einerseits eine Verstärkung der lokalen Entzündung bei dem Transfer, bei dem antigenspezifische Th17 enthalten sind. Unabhängig von der Art der transferierten Zellen konnten wir allerdings anhand der *in vivo* Proliferation aller Zellen am Injektionsort der Rezipienten keinen Unterschied in der Immunreaktion feststellen. Der prozentuale Anteil an *in vivo* proliferierenden Zellen in den Füßen war durch den Transfer von CCR6-depletierten Th Zellen gegenüber dem Transfer von kompletten Th Zellen nicht erniedrigt (Abb. 35). Bei diesen Zelltransferexperimenten konnte die Funktion von CCR6-positiven Th Zellen während der Immunantwort innerhalb dieses Modells abschließend nicht geklärt werden.

Hierbei ist festzuhalten, dass die Rekrutierung von Granulozyten und Makrophagen zum Entzündungsherd durch den Ausleseparameter der Proliferation nicht messbar war. Weitere Analysen, wie die Bestimmung der zellulären Zusammensetzung am Entzündungsort und der Transfer von *in vivo* aktivierten Th17 Zellen, könnten dazu beitragen, die Funktion von Th17 Zellen in den peripheren Geweben zu klären.

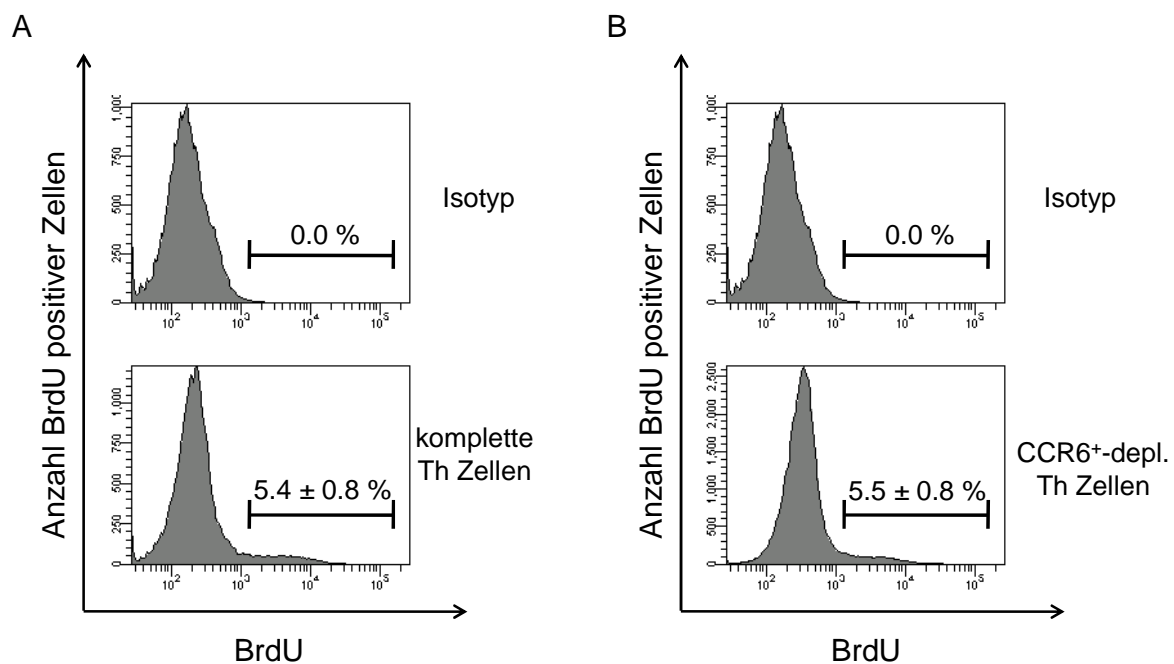


Abb. 35: Anteil proliferierender Zellen im Fuß der Rezipienten nach Zelltransfer und Immunisierung. Naiven OT-II Mäusen wurden die ableitenden Lymphknoten entnommen. Lymphknotenzellen wurden in $CD4^+CCR6^-$ + $CD4^+CCR6^+$ (A) und $CD4^+CCR6^-$ (B) Zellen sortiert. Es wurden jeweils $2,5 \times 10^5$ Zellen in je 3 C57BL/6 Rezipienten i.v. transferiert. Nach 24 h wurden die Mäuse mit OVA/CpG s.c immunisiert. Nach 4 Tagen wurden den Mäusen BrdU durch das Trinkwasser verabreicht ($c = 0,8$ mg/ml). 24 h später wurden die Zellen aus den Pfoten isoliert. Die daraus gewonnenen Zellen wurden intrazellulär mit anti-BrdU markiert und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Gezeigt ist der prozentuale Anteil BrdU-positiver Zellen im Fuß der Empfängertiere (\pm SD) nach dem Transfer von kompletten Th Zellen (A) und $CD4^+CCR6^+$ Zellen (B). Eine BrdU Isotypkontrolle wurde jeweils mitgeführt.

4. Diskussion

4.1 Analyse der CCR6-positiven Th17 Zellpopulation während der Immunantwort

Die Regulation der Immunantwort ist eine der wichtigsten Aufgaben des Körpers, um zu überleben. Eine zu schwache Immunantwort nach Infektionen führt zu schweren Erkrankungen bis hin zum Tod des Lebewesens. Genauso können allerdings überschießende Immunantworten und nicht mehr regulierbare Zellen des Immunsystems den eigenen Körper soweit beeinträchtigen, dass es ebenfalls zu einer schweren Schädigung des Organismus kommt. Th17 Zellen spielen bei der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen, wie z.B. der Multiplen Sklerose, eine zentrale Rolle (Holmoy et al., 2008; Pene et al., 2008; Steinman, 2007). Bisher ist die Biologie dieser Th Zell-Subpopulation noch weitgehend unbekannt und deren Aufklärung kann zur Entwicklung neuer Strategien zur Bekämpfung schwer therapierbarer Autoimmunerkrankungen beitragen. Beim Menschen konnte kürzlich der Nachweis erbracht werden, dass die Expression von CCR6 zusammen mit CCR4 auf Th Zellen die Subpopulation der Th17 Zellen näher beschreibt (Acosta-Rodriguez et al., 2007). Um die Funktion und Wirkweise von CCR6-positiven Th17 Zellen zu untersuchen, impften wir Mäuse und verfolgten CCR6-positive Th Zellen im Verlauf der Immunreaktion. In dieser Arbeit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass die Expression von CCR6 auf Th Zellen ein stichhaltiges Merkmal für funktionelle und antigenspezifische Th17 Zellen bei immun-kompetenten Mäusen ist. Mithilfe dieser Korrelation konnten wir Th17 Zellen im Verlauf der Immunreaktion verfolgen. Nach der Applikation einer Impfung konnten wir feststellen, dass v.a. die starke Expansion CCR6-negativer Zellen stattfindet. In den ersten drei Tagen nach der Immunisierung proliferierten $34,7 \pm 8,6$ % der CCR6-negativen Zellen. Nach dieser Phase fiel die Proliferationsrate dieser Zellen wieder auf $5,4 \pm 2,1$ % zurück. Auch CCR6-positive Th17 Zellen expandierten in den ersten Tagen, doch behielten CCR6-positive Zellen auch danach ihre erhöhte Proliferationsrate bei (Potzl et al.,

2008). Der starke Anstieg in der Proliferationsrate der CCR6-negativen Th Zellen trägt maßgeblich dazu bei, dass diese Th Zellen in der akuten Phase der Immunantwort die dominante Th Zellpopulation sind. Diese *in vivo* Daten widersprechen der Interpretation von früheren *in vitro* generierten Daten (Ebert et al., 2002). Hier ging man davon aus, dass nach einer *Mixed Lymphocyte Reaction* (MLR) die Expression von CCR6 auf Th Zellen infolge von Aktivierung ansteigt. Allerdings wurde in diesem Experiment nach Stimulation ein relativer Anstieg der Anzahl an CD4⁺CCR6⁺ Zellen beobachtet und keine Einzelanalyse der CD4 positiven Zellen vor und nach der MLR durchgeführt. Außerdem bleibt anzumerken, dass bei der MLR humane Zellen verwendet wurden. In der akuten Phase der Immunantwort sinkt nicht nur der prozentuale Anteil der CD4⁺CCR6⁺ Zellen, sondern auch die Anzahl an Th17 Zellen und die Menge an produzierten IL-17. Zu diesem Zeitpunkt konnten wir eine erhöhte Menge an IFN- γ , das hauptsächlich von Th1, CTLs und NK Zellen produziert wird, nachweisen. Es konnte wiederholt der Beweis geliefert werden, dass IFN- γ und IL-4 *in vitro* die Entwicklung von Th17 Zellen hemmen und die zelluläre bzw. humorale Immunantwort fördern (Bettelli et al., 2006; Harrington et al., 2005; Steinman, 2007). Dabei aktiviert vor allem IFN- γ Makrophagen, die ihrerseits IL-12 produzieren und so die Entwicklung von Th1 Zellen weiter fördern. Aufgrund unserer *in vivo* Befunde konnten wir zeigen, dass der Anstieg an IFN- γ produzierenden Zellen ebenfalls eine geringe Anzahl an Th17 Zellen und eine niedrige Menge an IL-17 Protein bedingt. Somit konnte dieser regulatorische Effekt, der bisher nur *in vitro* gezeigt wurde, während der physiologischen Immunreaktion in unserem Impfmodell *in vivo* nachgewiesen werden. Den Beweis, dass es sich hierbei um ein allgemeingültiges Prinzip handelte und nicht um einen Effekt, der aus der Impfstrategie mit CpG als Adjuvans erfolgte, konnten wir durch Abwandlungen im Impfschema erbringen. Wir benutzten als Adjuvantien Alum, welches die Immunreaktion in die Richtung einer Th2-Antwort lenkt oder *Incomplete Freund's Adjuvans* (IFA). In beiden Fällen war der prozentuale Anteil an CCR6-positiven Th17 Zellen und die Menge an produzierten IL-17 in der akuten Phase der Immunreaktion am geringsten.

4.2 Charakterisierung von Th17 Zellen

4.2.1 Phänotyp der Th17 Zellen

Während der Impfung korrelierte die Abnahme an CCR6-positiven Th Zellen stets mit der Abnahme an IL-17 produzierenden Th Zellen. Um CCR6 als Marker für die Th17 Zellantwort nach Immunisierung zu etablieren, wurden Oberflächenmoleküle gesucht, die die Population der CCR6-positiven Th17 Zellen besser eingrenzt. Dabei konnten wir feststellen, dass die CCR6-tragenden Zellen ebenso CD44 und CD69 exprimieren, aber negativ für Expression von CD62L sind. Das Adhäsionsmolekül CD62L ist für die Migration von naiven Zellen in sekundär lymphatische Organe elementar (Spertini et al., 1991). Um nach der Infektion zu den Entzündungsherden zu migrieren, müssen Th Zellen nach ihrer Aktivierung im Lymphknoten ihr Adhäsionsmolekül wieder verlieren. Aktivierte Th Zellen tragen somit wenig CD62L auf ihrer Oberfläche. Die Oberflächenmoleküle CD44 und CD69 werden erst nach der Aktivierung der Th Zellen exprimiert und zeigen somit auch den Aktivierungsstatus von Th Zellen (Huet et al., 1989; Testi et al., 1989). Wir konnten mittels Zell-Sortier-Versuchen zeigen, dass die Kombination dieser Marker die Th17 Zellpopulation klarer definiert. CCR6-positive Th17 Zellen zeigen somit einen aktivierten Phänotyp, der sich auch im Verlauf der Immunantwort nicht ändert. Auch in OT-II Mäusen konnten wir nachweisen, dass die Fraktion der IL-17 produzierenden Th Zellen innerhalb der CCR6-positiven Th Zellfraktion lag und einen aktivierten Phänotyp zeigt. Dies lässt vermuten, dass die Population der Th17 Zellen eine, unabhängig von Mausstämmen, konstante Zellpopulation ist, sich in ständiger „Alarmbereitschaft“ befindet und durch die Expression von CCR6 auf ihrer Oberfläche identifiziert werden kann. Der Phänotyp lässt vermuten, dass Th17 Zellen demnach eine niedrige Aktivierungsschwelle besitzen und schnell auf eingedrungene Pathogene reagieren können. Dieser Befund wird nicht nur durch die Expression der Aktivierungsmarker deutlich, sondern zeigt sich auch durch die erhöhte homöostatische Proliferation von CCR6-positiven gegenüber CCR6-negativen Th Zellen. Über einen Beobachtungszeitraum von drei Tagen konnten wir feststellen, dass CCR6-positive Th Zellen über eine robuste Proliferationsfähigkeit in naiven Mäusen verfügten: $15,2 \pm 5,2$ % der Zellen waren innerhalb dieses Zeitraums neu entstanden. CCR6-negative Th Zellen hingegen wiesen mit $0,4 \pm 0,2$ % nur eine

schwache Teilungsrate auf (Potzl et al., 2008). Da die Population der CCR6-positiven Th Zellen im Verlauf eines Mäuselebens nicht stetig zunimmt, muss man davon ausgehen, dass diese Zellen zwar einerseits stark proliferieren, andererseits aber eine hohe Apoptoserate besitzen. In unserer Arbeitsgruppe konnte kürzlich gezeigt werden, dass CCR6-positive Th17 Zellen während der Homöostase tatsächlich zu einem deutlich höheren Anteil apoptotisch sind als CCR6-negative Th Zellen (unveröffentlichte Daten). Dies erklärt, warum es, trotz der hohen homöostatischen Proliferation der CCR6-positiven Th Zellen, zu keiner Anreicherung dieser Zellen im Lymphknoten kommt. Die hohe Teilungsrate scheint in einer Art Gleichgewicht mit der hohen Apoptoserate zu sein. So wird zum einen für eine konstante Anzahl an CCR6-positiven Th17 Zellen im Lymphknoten gesorgt, die bei Auftreten einer Infektion schnell auf die Pathogene reagieren können. Zum anderen wird verhindert, dass die Menge an Th17 Zellen zu sehr ansteigt, was möglicherweise eine Gefahr für den Organismus darstellt, da Th17 Zellen für die Auslösung von Autoimmunerkrankungen hauptverantwortlich sind.

4.2.2 Proliferationsfähigkeit von *in vivo* generierten Th17 Zellen *in vitro*

Th17 Zellen zeigen bereits vor der Applikation einer Impfung einen aktivierten Phänotyp und die Population der Th17 Zellen nimmt im Verlauf der Immunreaktion ab. Dabei war unklar, ob Th17 Zellen eine bereits enddifferenzierte Zellpopulation sind, die Effektorfunktionen übernehmen und danach absterben, oder ob diese Zellen noch in der Lage sind, zu proliferieren. Es ist bereits bekannt, dass die Regulation der T-Zell-Aktivierung und Proliferation von Th1 und Th2 Zellen von verschiedenen Faktoren, wie IL-12 oder IL-4, beeinflusst wird (Gajewski et al., 1989). *In vitro* konnte bereits gezeigt werden, dass TGF- β zusammen mit IL-6 die Entwicklung von Th17 Zellen fördert und Th1 und Th2 Zytokine die Th17 Zell-Differenzierung und Proliferation hemmen (Harrington et al., 2005; Veldhoen et al., 2006). Wir konnten zeigen, dass Th17 Zellen in jeder Phase der Immunantwort in der Lage waren, zu proliferieren. Doch war die Proliferationsfähigkeit in der akuten Phase der Immunantwort am geringsten. Die hohen Mengen an IFN- γ im System können somit Th17 Zellen, auch nach starker polyklonaler Stimulation, an der Proliferation hindern.

4.2.3 Stabilität von Th17 Zellen *in vivo*

Durch den Transfer von OVA-spezifischen CD4⁺CCR6⁺ und CD4⁺CCR6⁻ Zellen in naive Mäuse und deren anschließende Immunisierung mit OVA analysierten wir die Stabilität der transferierten Zellfraktionen. Dabei konnten wir zeigen, dass CCR6-positive antigenspezifische Th Zellen nach dem Zelltransfer und anschließender Immunisierung weniger stark expandierten als CCR6-negative Th Zellen. Die Reanalyse der transferierten CD4⁺CCR6⁺ und CD4⁺CCR6⁻ Zellfraktionen ergab, dass beide Populationen fünf Tage nach der Immunisierung zu nahezu gleichen prozentualen Anteilen CCR6 exprimierten. CCR6-tragende Th Zellen können somit ihren Chemokinrezeptor wieder verlieren und CCR6-negative Th Zellen können CCR6 wieder exprimieren. Der Verlust von CCR6 kann u.a. mit der Internalisierung von Chemokinrezeptoren nach der Aktivierung erklärt werden (Allen et al., 2007). Doch kann dafür *in vivo* ein anderer Grund verantwortlich sein. Es konnte der Nachweis erbracht werden, dass Th Zellen auch ohne Interaktion mit Antigen langlebig sein können und dass diese Zellen in bestimmten Nischen der sekundär lymphatischen Organe residieren (Garcia et al., 1999). Der Transfer von Th Zellfraktionen kann so zu einer Überbesetzung der Ziel-Lokalisationen führen und bedingt, dass von diesen Zellen keine weiteren mehr in das Organ einwandern können oder vorhandene auswandern. Der Lymphknoten ist somit bestrebt, jede Zellfraktion zu einem konstanten Prozentsatz zu enthalten.

Die CCR6-positiven und CCR6-negativen Zellfraktionen waren nach dem Transfer und der anschließenden Immunisierung außerdem in der Lage, IL-17 oder IFN- γ zu produzieren. Daraus lässt sich schließen, dass Th17 Zellen zu Th1 Zellen differenzieren und dass aus der Population der ursprünglichen CCR6-negativen Th Zellfraktion Th17 Zellen entstehen können. Die verschiedenen Th Zell-Subpopulationen sind somit keine starren, enddifferenzierten Zellen, sondern können sich *in vivo* dynamisch weiterentwickeln. Dies widerspricht jüngst veröffentlichten Daten, bei denen nach polyklonaler Stimulation von Milzzellen IL-17 produzierende Zellen mittels MACS-Technik sortiert und *in vitro* kultiviert wurden (Lexberg et al., 2008). Dabei behielten diese Zellen ihre Fähigkeit zur IL-17 Produktion und stellten eine stabile Population dar, während *in vitro* generierte Th17 Zellen unter polarisierenden Bedingungen (Romagnani, 1997) zu Th1 oder Th2 Zellen differenzieren konnten. Allerdings wurden bei diesen Versuchen die *in vivo*

entstandenen Zellen anschließend *in vitro* unter polarisierenden Bedingungen kultiviert. Darunter versteht man den Zusatz von Zytokinen, wie IL-4 zur Th2, IL-12 zur Th1 und IL-6 zusammen mit TGF- β zur Th17 Zell-Differenzierung. Im Unterschied dazu analysierten wir *in vivo* generierte Th17 Zellen nach dem Zelltransfer weiterhin *in vivo*, was die unterschiedlichen Ergebnisse erklären kann.

4.2.4 Wirkweise von Th17 Zellen

Die Funktion von Th17 Zellen innerhalb des Immunsystems *in vivo* ist noch weitgehend ungeklärt. Neben der Rolle von Th17 Zellen bei Autoimmunerkrankungen (Komiyama et al., 2006) gibt es Untersuchungen, dass IL-17 zur Abwehr von extrazellulären Bakterien beiträgt (Happel et al., 2003; Ye et al., 2001). Dabei werden Makrophagen und Neutrophile zu den Entzündungsherden rekrutiert, was letztlich zur erfolgreichen Abwehr der Pathogene führt (Jovanovic et al., 1998; Witowski et al., 2000). Es konnte gezeigt werden, dass IL-17 Protein nicht nur die Rekrutierung von Neutrophilen fördert, sondern zusammen mit Stromazellen bzw. Fibroblasten auch die Reifung von Neutrophilen aus hematopoetischen Vorläufern und die Produktion von GM-CSF begünstigt (Cai et al., 1998; Fossiez et al., 1996). Die Interaktion von Th17 Zellen mit Stroma- und Vorläuferzellen ist allerdings noch unklar. Dazu kokultivierten wir Th17 Zellen mit Knochenmarkzellen, die neben Stromazellen hauptsächlich auch myeloide und lymphoide Vorläuferzellen enthalten. Wir konnten nachweisen, dass CCR6-positive Th17 Zellen im Wechselspiel mit Zellen aus dem Knochenmark eine heftige immunologische Reaktion auslösen. Dabei konnten wir zunächst die Produktion von GM-CSF detektieren. Die hohen Mengen an sezernierten IL-17 können Fibroblasten zur Produktion von GM-CSF stimulieren und so die Reifung von myeloiden Vorläufern fördern. Die Interaktion der Th17 Zellen mit den Knochenmarkzellen verursachte aber auch die Sezernierung einer Vielzahl weiterer Zytokine, wie TNF oder IL-6. Dies bedeutet, dass Th17 Zellen durch den Austausch von löslichen Substanzen mit Knochenmarkzellen in der Lage sind, ein proinflammatorisches Milieu zu erzeugen und somit andere Zellen des Immunsystems beeinflussen. Das Zytokinprofil legt nahe, dass Th17 Zellen bei der Initiierung der Immunantwort eine wichtige Rolle spielen. Dabei übernehmen Th17 Zellen Aufgaben, die man klassischerweise den Zellen des angeborenen Immun-

systems zuordnet. Th17 Zellen sind somit ein Bindeglied zwischen der adaptiven und angeborenen Immunantwort (Stockinger et al., 2007). Die Hauptaufgabe des angeborenen Immunsystems ist die Identifizierung von eingedrungenen Keimen. Die Erkennung der Pathogene erfolgt mittels *Toll-like* Rezeptoren (TLRs), z.B. wird LPS von gramnegativen Bakterien von TLR4 und virale und bakterielle CpG-Oligonukleotide von TLR9 erkannt (Takeda et al., 2003; Wagner, 2004). Wir konnten zeigen, dass CCR6-positive Th17 Zellen TLR6 exprimieren. TLR6 bildet mit TLR2 ein Heterodimer und erkennt so Lipopeptide von Mykobakterien und spielt außerdem bei der Erkennung von Zymosan aus Pilzen eine wichtige Rolle (Takeda et al., 2003). Hier ist besonders anzumerken, dass Th17 Zellen bei der Abwehr von Pilzen und grampositiven Erregern benötigt werden (Huang et al., 2004). Die Deletion von TLR6 bewirkt außerdem eine Modulation der Th1 Zytokine. So zeigen TLR6^{-/-} Mäuse eine erhöhte IFN- γ Produktionsfähigkeit (Netea et al., 2008). CCR6-positive Th17 Zellen exprimieren TLR6 und die Generierung der TLR6^{-/-} Maus kann so zur teilweisen oder vollständigen Deletion der Th17 Zellen führen. Die Population von Th1 Zellen ist demnach prozentual höher und die Produktion von IFN- γ steigt durch den fehlenden gegenregulatorischen Effekt von IL-17 an.

4.3 Antigenpezifität von Th17 Zellen

Da CCR6-positive Th17 Zellen schon während der Homöostase zu einem hohen Prozentsatz proliferierten und nach einer Impfung weniger stark expandierten als CCR6-negative Th Zellen (Potzl et al., 2008), war unklar, ob Th17 Zellen nach der Vakzinierung auch auf das applizierte Antigen spezifisch antworten und ob sich Gedächtnis-Th17 entwickeln können. Antigen-spezifische Gedächtnis-T-Zellen sind wichtig für die Zweitexposition und den Schutz vor Erkrankungen. Bei ihrer Differenzierung aus naiven T-Zellen nehmen die Stärke der Stimulierung und das Zytokinmilieu eine entscheidende Funktion ein (Iezzi et al., 1999; Lanzavecchia et al., 2005; Sallusto et al., 2001). So bekommt bei einer schwachen Stimulation des T-Zell-Rezeptors eine naive T-Zelle zu wenige Überlebenssignale und stirbt. Eine

starke Stimulation erzeugt Effektor-T-Zellen, die nach der Ausübung ihrer Funktionen ebenfalls sterben. Ist das Signal nicht zu schwach und nicht zu stark, entwickeln sich Gedächtnis-T-Zellen (Lanzavecchia et al., 2005). Dabei spielen auch Überlebenssignale eine wesentliche Rolle. So sind für die Differenzierung und das Überleben von CD8⁺ Gedächtniszellen IL-15 und IL-7 von enormer Bedeutung, wohingegen bei Gedächtnis-Th Zellen neben IL-7 auch TCR-Signale eine wichtigere Rolle spielen (Marrack et al., 2004). Gedächtniszellen sind für den raschen Aufbau einer Immunantwort im Falle einer Zweitinfektion eminent wichtig. Durch das OVA-Immunisierungsmodell konnten wir OVA-spezifische Th17 Zellen generieren. Mit CCR6 als Th17 Zellmarker waren wir in der Lage, diese Zellpopulation im Verlauf der Immunantwort zu verfolgen. Dabei reagierten die antigenspezifischen Th17 Zellen in der akuten Phase der Immunantwort nach OVA-Stimulierung mit Proliferation und der Produktion von IL-17 Protein. In der späten Phase der Immunantwort konnten wir eindeutig antigenspezifische, proliferierende CCR6-positive Th Zellen detektieren. Zu diesem Zeitpunkt war es allerdings nicht mehr möglich, die Produktion von IL-17 nach antigenspezifischer Stimulation auszulösen. Die Population der CCR6-positiven Th Zellen im Lymphknoten beinhaltet somit in der späten Phase der Immunreaktion antigenspezifische Th Zellen, die jedoch nach antigenspezifischer Stimulierung kein IL-17 mehr produzieren können. Funktionelle Th1 Zellen waren dagegen auch in der späten Phase, an Tag 21 nach der Immunantwort, eindeutig nachweisbar. Antigenspezifische Th17 unterscheiden sich somit von antigenspezifischen Th1 Zellen. Die Frage bleibt allerdings offen, ob Th17 Zellen weniger lange in sekundär lymphatischen Organen residieren oder ob sie schneller absterben. Da eine unkontrollierte Th17 Zellantwort ursächlich an der Entstehung von Autoimmunerkrankungen beteiligt ist (Bettelli et al., 2007b; Hirota et al., 2007; Kebir et al., 2007; Komiyama et al., 2006), könnte eine rasche Entfernung oder starke Dezimierung dieser Zellen nach erfolgreicher Bekämpfung der Infektion ein wichtiger, protektiver Mechanismus zur Verhinderung von Autoimmunerkrankungen sein.

4.4 Die Rolle von CCR6-positiven Th Zellen in der at-EAE

Die Ätiologie von Autoimmunerkrankungen ist noch immer weitgehend unklar. Genetische- und Umwelt-Faktoren scheinen dabei eine wichtige Rolle zu spielen. Weitere Faktoren, die zur Entstehung dieser Autoimmunerkrankung beitragen, sind soziale Faktoren, wie Stress, und immunologische Faktoren. Auf der Suche nach dem krankheitsauslösenden Antigen stieß man auf das Stressprotein α B-Crystallin. Dieses Protein taucht im Myelin von gesunden Menschen nicht auf, doch fand man es im Myelin von MS Läsionen (Holmoy et al., 2008). α B-Crystallin löst eine sehr starke T-Zellantwort beim Menschen aus und man konnte Antikörper gegen α B-Crystallin im Liquor von MS Patienten und im Serum von EAE Mäusen nachweisen (Verbeek et al., 2007). In der Vergangenheit konnten auf zellulärer Ebene sowohl CCR6-positive Th Zellen als auch Th17 Zellen immer wieder in Verbindung mit Autoimmunerkrankungen gebracht werden (Bettelli et al., 2007a; Homey et al., 2000; Matsui et al., 2001). Bei IL-17 *knock-out* Mäusen ist die EAE stark supprimiert und der Transfer von IL-17-defizienten Th Zellen löste keine at-EAE aus (Komiyama et al., 2006). Wir konnten zum ersten Mal den funktionellen Zusammenhang von CCR6-positiven Th Zellen und Th17 Zellen als Auslöser von Autoimmunerkrankungen zeigen. Durch die Depletion von autoreaktiven CCR6-positiven Th17 Zellen aus den Lymphknoten von PLP-immunisierten Mäusen wurde die Produktion von IL-17 sehr stark inhibiert und der Verlauf der Transfer-EAE deutlich abgemildert. Zytotoxische T-Zellen oder weitere IL-17 produzierende Zellpopulationen spielen bei der Transfer-EAE demnach eine untergeordnete Rolle, da die selektive Depletion von CCR6-positiven Th Zellen ausreicht, um den Verlauf der EAE deutlich zu verbessern. Das heißt, dass nicht IL-17 *per se* die Krankheit auslöst, sondern Th Zellen für die Entstehung wichtig sind. Da CCR6, das spezifische Kennzeichen von Th17 Zellen, als Chemokinrezeptor für die korrekte Lokalisation von Zellen im Organismus verantwortlich ist, lassen unsere Daten vermuten, dass bei der Krankheitsentstehung die Lokalisation von autoreaktiven, IL-17 produzierenden Zellen eine entscheidende Rolle spielt. CCL20, der Ligand von CCR6, ist im Rückenmark von Tieren während der EAE verstärkt exprimiert und kann die Rekrutierung von CCR6-positiven Th17 Zellen zum ZNS fördern (Serafini et al., 2000). Im ZNS können die Th17 Zellen IL-17 sezernieren, somit enzephalogen

wirken und die EAE auslösen. Wir konnten zeigen, dass CD4⁺CCR6⁺ depletierte Lymphknotenzellen aus PLP-immunisierten Mäusen nach antigenspezifischer und polyklonaler Restimulation nahezu kein IL-17 Protein mehr produzieren konnten. Allerdings konnten wir nach *in vitro* Stimulation in der Fraktion der CD4⁺CCR6⁺ depletierten Lymphknotenzellen wieder CCR6-positive Th Zellen detektieren. Diese Zellen waren jedoch nicht oder nach drei Tagen noch nicht in der Lage, IL-17 zu produzieren. Da wir den Ausbruch der EAE durch die Depletion von CD4⁺CCR6⁺ Zellen nicht vollständig verhindern konnten, könnten die *de novo* entstandenen CCR6-positiven Th Zellen *in vivo* nach längerer Zeit wieder funktionsfähig werden und so ihre Enzephalogenität erneut erlangen. *In vitro* tragen die Zytokine IL-6, TGF- β und IL-23 wesentlich zur Differenzierung und Expansion von Th17 Zellen bei (Bettelli et al., 2006; Langrish et al., 2005; Veldhoen et al., 2006). Die stark verminderte IL-17 Produktion der CCR6-positiven Th Zellen aus CD4⁺CCR6⁺ depletierten Lymphknotenzellen *in vitro* kann durch die *in vivo* Situation aufgehoben sein, da hier durch die Entzündung die Th17 Zell-relevanten Substanzen im richtigen Maß vorhanden sind. Eine weitere Möglichkeit zur Auslösung der abgeschwächten EAE in den Rezipienten, denen CCR6-depletierte Th Zellen transferiert wurden, ist die Induktion autoreaktiver oder kreuzreaktiver T-Zellen (Fujinami et al., 1985; Hemmer et al., 1997; Wucherpfennig et al., 1995). Sobald die Selbsttoleranz überwunden ist, können Selbstantigene aus dem ZNS zu einer fortwährenden Rekrutierung von autoreaktiven T-Zellen führen. Auch T-Zellen, die aufgrund anderer Infektionen gebildet wurden, z.B. gegen virale Proteine, können zusätzlich auf Myelin-Epitope antworten. Dieser Prozess, genannt *epitope spreading*, ist bei chronischen EAE Modellen ausschlaggebend (Lehmann et al., 1993; Vanderlugt et al., 2002). Durch diesen Prozess können einige nicht-CCR6-tragende Zellen, z.B. Th1 Zellen, zu autoreaktiven T-Zellen entarten und so die EAE auch durch den Transfer von CD4⁺CCR6⁺ depletierten Zellen in abgeschwächter Form auslösen. Die Depletion von CD4⁺CCR6⁺ Zellen kann bei unseren Versuchen die Schwere der EAE deutlich mildern, was CCR6 als Zielstruktur für Therapien interessant macht. Es ist allerdings immer zu beachten, dass *in vivo* Effekte in der Maus nicht vollständig auf den Menschen übertragbar sind oder gar den gegenteiligen Effekt auslösen können. So hatte zum Beispiel die externe Gabe von IFN- γ bei der EAE einen mildernden Effekt, wohingegen bei der Multiplen Sklerose sich das Krankheitsbild verschlimmerte (Hemmer et al., 2006). Die Erklärung ist in der verschiedenen Natur

der beiden Erkrankungen gegeben. Die Auslösung der EAE ist vor allem Th Zell-vermittelt. Bei der Multiplen Sklerose sind Th17 Zellen zwar ein wichtiger Bestandteil bei der Entstehung der Erkrankung, doch sind neben Th1 Zellen und zytotoxischen T-Zellen auch B-Zellen maßgeblich an der Schwere und Komplexität der Autoimmunität beteiligt (Hauser et al., 2008; Noseworthy et al., 2000). Trotzdem konnte durch die Verwendung des Tiermodells der EAE eine Vielzahl von Therapien gegen die Multiple Sklerose entwickelt werden. Prominente Beispiele dafür sind die IFN- β Therapie oder die Entwicklung von Mitoxantrone, einem Immunsuppressivum. Auch Natalizumab ist ein solches Beispiel. Als Antikörper gegen das zelluläre Adhäsionsmolekül α 4-Integrin hemmt es die Migration von inflammatorischen Zellen. Je gezielter somit eine Therapie verläuft, desto unwahrscheinlicher sind unerwünschte Nebeneffekte.

CCR6 ist aber trotz aller Bedenken eine interessante Zielstruktur zur Entwicklung von neuen Strategien zur Bekämpfung von Autoimmunerkrankungen. Therapieansätze gegen Autoimmunerkrankungen, die auf der Blockade von Chemokinrezeptoren beruhen, sind mittlerweile in Bearbeitung (Mackay, 2008). Durch die Blockade von CCR6 durch Antikörper oder *small molecules* (SM) wird versucht, eine neue MS-Therapie zu entwickeln, ohne dass bislang die Wirkung dieser Therapie bekannt ist. Durch unsere Befunde konnten wir zum ersten Mal aufzeigen, dass dieser Ansatz vielversprechend ist, da unsere Versuche kausal beweisen, dass CCR6 enzephalitogene Zellen auszeichnet.

4.5 Die Wirkung von Glucocorticoiden auf Th17 und Th1 Zellen in den peripheren Lymphknoten von gestressten Tieren

Chronische Entzündungen zeichnen sich durch eine erhöhte Anzahl an Th1 und Th17 Zellen im Organismus aus (Hoyer et al., 2008) und werden durch chronischen Stress negativ beeinflusst (Dhabhar et al., 1997; Reber et al., 2006). Glucocorticoide und Katecholamine sind Hormone, die in Stresssituationen ausgeschüttet werden. Diese Moleküle inhibieren die Produktion von proinflammatorischen Molekülen, wie IL-12, IFN- γ und TNF und fördern die Sezernierung von anti-inflammatorischen

Zytokinen, wie IL-10, IL-4 und TGF- β (Elenkov et al., 2002). Dabei induzieren Glucocorticoide bei T-Zellen Apoptose und inhibieren so die Verstärkung der Immunantwort (Screpanti et al., 1989). Bei Autoimmunerkrankungen und chronischen Erkrankungen scheint die regulatorische Funktion der Stress-induzierten Hormone gestört zu sein (Wilder et al., 1999). Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass psycho-sozialer Stress die Schwere von induzierten chronischen Darmerkrankungen verstärkt (Reber et al., 2006). Bei gestressten Tieren produzierten Zellen aus mesenterialen Lymphknoten eine erhöhte Menge an pro- und anti-inflammatorischen Zytokinen und es konnte eine Schädigung des Darms bereits nach 14-tägiger Stressexposition festgestellt werden (Reber et al., 2007). Daraus kann man ableiten, dass chronischer Stress den Verdauungstrakt von Mäusen lokal schädigt. Wir untersuchten nun zusätzlich, wie Stress sich systemisch auf den Immunstatus auswirkt und analysierten die Zellen in den peripheren Lymphknoten. Die Lymphknotenzellen aus gestressten Tieren produzierten deutlich mehr IFN- γ als Kontrolltiere; dies deutet auf eine verstärkte Th1 Antwort in den peripheren Lymphknoten hin. Chronischer Stress hat somit nicht nur eine lokal begrenzte Wirkung, z. B. im Darm, sondern zeigt ebenfalls einen immunmodulatorischen Effekt in peripheren lymphatischen Organen. In diesem Fall führt der Stress, wie auch bei Reber *et al.*, zu einer Erhöhung des proinflammatorischen Zytokins. Wir konnten bereits zeigen, dass nicht nur *in vitro*, sondern ebenfalls *in vivo* eine hohe Anzahl an IFN- γ produzierenden Th1 Zellen die Entwicklung und Expansion von Th17 Zellen hemmt. Auch bei diesem Tiermodell konnten wir neben dem erhöhten Anteil an IFN- γ Produzenten eine Verminderung des prozentualen Anteils an Th17 Zellen in den peripheren Lymphknoten von gestressten gegenüber unbehandelten Tieren beobachten. Die erhöhte IFN- γ Menge in gestressten Tieren könnte zu einer unregulierbaren Hyperinflammation führen und zur Auslösung einer Autoimmunerkrankung beitragen (Olsson, 1995). Eine der effektivsten Therapien bei akuten Schüben von chronischen Erkrankungen ist die Gabe von Glucocorticoiden zur Dämpfung der Immunreaktion. Wir detektierten eine deutliche Verminderung der IFN- γ Produktionsfähigkeit bei Kontroll- und chronisch gestressten Mäusen nach Gabe von Dexamethason und waren somit immer in der Lage, die Th1 Antwort zu schwächen. Es zeigte sich, dass nach chronischem Stress, anders als bei chronischen Entzündungen, die Glucocorticoidausschüttung zwar nicht verringert ist, doch sprechen die Zielzellen nicht mehr auf Cortisol an (Davis et al., 2008). Th17

Zellen, die ebenso maßgeblich an der Entstehung von chronisch-entzündlichen Erkrankungen beteiligt sind (Hemmer et al., 2006), waren im Gegensatz zu Th1 Zellen nach Stressexposition nur wenig empfänglich gegenüber der immunsuppressiven Wirkung von Dexamethason. Die reduzierte immunsuppressive Wirkung von Dexamethason auf Th17 Zellen aus gestressten Tieren deutet darauf hin, dass Th17 Zellen eine Glucocorticoid-Resistenz entwickeln. Bei Patienten mit chronisch-entzündlichen Erkrankungen, wie MS, bewirkt die Gabe von Glucocorticoiden zwar eine Verminderung von proinflammatorischen Zytokinen im Plasma (Gayo et al., 1998), doch kann die Erkrankung dadurch nicht geheilt werden. Unsere Ergebnisse helfen bei der Klärung dieses Sachverhaltes: die Th1 Zellantwort kann durch die Gabe von Dexamethason gehemmt werden, was eine Linderung akuter Beschwerden bewirkt. Allerdings scheint unter chronisch-entzündlichen Bedingungen, die bei uns durch chronischen Stress erzeugt wurden, die Wirkung von Glucocorticoiden auf Th17 Zellen herabgesetzt. Diese Zellen können unter diesen Voraussetzungen weiterhin autoreaktiv wirken und die Entzündungsreaktion weiter vorantreiben. Neueste Untersuchungen zeigen, dass Th1 Zellen in der Entstehungsphase von chronisch-entzündlichen Erkrankungen und Autoimmunerkrankungen die Produktion von Selbstantikörpern antreiben. Erst danach sorgen Th17 Zellen für die Entstehung einer chronischen Entzündung (Hoyer et al., 2008). Bei chronischem Stress sind entzündungsfördernde Zellen, z.B. Th1 Zellen, bereits aktiviert, da in den peripheren Lymphknoten eine erhöhte Menge an proinflammatorischen IFN- γ zu finden ist. Dies kann bei noch längerer Stressexposition zu einer Aktivierung von Th17 Zellen führen, die dann auch trotz der Verabreichung von Glucocorticoiden autoreaktiv wirken und die Auslösung einer Autoimmunerkrankung fördern. Demnach ist die Behandlung von Autoimmunerkrankungen in einem gestressten Organismus erschwert.

5. Zusammenfassung

Die Expression von Chemokinrezeptoren wird zur Charakterisierung von Th Zell-Subpopulationen herangezogen. Es konnte gezeigt werden, dass humane Th17 Zellen, die maßgeblich bei der Entstehung von Autoimmunerkrankungen beteiligt sind, durch die Expression von CCR6 und CCR4 identifiziert werden können. Um die Rolle von CCR6 auf Th Zellen während der physiologischen Immunantwort zu klären, analysierten wir zunächst den Phänotyp und die Differenzierung von CCR6-positiven Zellen in einem Immunisierungsmodell.

Wir konnten zum ersten mal zeigen, dass CCR6 während der Immunreaktion ein hinreichender Marker zur Identifikation von funktionellen Th17 Zellen in immun-kompetenten C57BL/6 Mäusen ist, da sämtliche IL-17 produzierenden Th Zellen innerhalb der CCR6-positiven Th Zellfraktion lagen. CCR6-positiv Th17 Zellen zeigten außerdem in naiven Mäusen einen aktivierten Phänotyp, ohne jede äußere Stimulation. Die Th17 Zellen befinden sich somit in ständiger „Alarmbereitschaft“ und können daher schnell auf ein eindringendes Pathogen reagieren. Die Funktion von Th17 Zellen in der frühen Phase der Immunantwort konnten wir durch die Interaktion von Th17 Zellen mit Zellen aus dem Knochenmark nachweisen. In Kokultur Experimenten konnten wir zeigen, dass Th17 Zellen im Zusammenspiel mit Knochenmarkzellen ein proinflammatorisches Milieu generierten, was die Rekrutierung von Immunzellen zur Folge haben kann.

Im Lauf einer fortschreitenden Immunreaktion in unseren Immunisierungsmodellen verlieren Th17 Zellen an Bedeutung. Dies zeigte sich in einer erniedrigten Anzahl an Th17 Zellen und den geringen Mengen an IL-17 Protein nach der Impfung. Hier, in der akuten Phase der Immunantwort, sind IFN- γ produzierende Th1 Zellen die dominante Th Zell-Subpopulation. IFN- γ hemmt somit auch *in vivo* die Entwicklung und Expansion von Th17 Zellen im Zuge einer Erst-Exposition mit Antigen. Ungeachtet dessen entstanden nach Vakzinierung antigenspezifische CCR6-positiv Th17 Zellen. *In vivo* aktivierte Th17 Zellen reagierten nach Stimulation mit spezifischem Antigen mit Zytokinproduktion und Proliferation.

Die Funktionalität von CCR6 als Marker für Th17 Zellen demonstrierten wir in der EAE. In diesem Mausmodell der Multiplen Sklerose werden myelin-spezifische, autoreaktive Th Zellen durch Vakzinierung mit PLP erzeugt, die zur Entwicklung einer progredienten Lähmung in den Tieren führt. Der Transfer von Th Zellen, die $CD4^+CCR6^+$ depletiert waren, führte zu einer deutlich abgeschwächten EAE. Die Erkrankung konnte allerdings nicht vollständig verhindert werden. Der Grund dafür mag in der Plastizität der Th17 Zellen begründet sein, die wir in Zelltransfer-Versuchen nachweisen konnten. CCR6-positive Th17 Zellen waren *in vivo* in der Lage, zu Th1 Zellen und Th1 Zellen zu Th17 Zellen zu differenzieren.

Weiterhin konnten wir einen neuen Mechanismus etablieren, der die pro-inflammatorische Wirkung von Th17 Zellen in chronisch-entzündlichen Erkrankungen erklärt. Th17 Zellen, nicht aber Th1 Zellen, wiesen unter chronischem Stress eine Glucocorticoidresistenz auf. Bis heute ist die Heilung einer Vielzahl von chronisch-entzündlichen Erkrankungen durch die Verabreichung von Glucocorticoiden nicht möglich. Die Dezimierung der Th1 Zell-vermittelten zellulären Immunantwort durch die Glucocorticoid-Gabe kann die akute Aufhebung der Gewebszerstörung zur Folge haben, doch bleiben, vor allem unter chronisch-entzündlichen Bedingungen, autoreaktive Th17 zurück, die jederzeit wieder eine neue Erkrankung auslösen können.

In dieser Arbeit konnte die eindeutige Identifikation von funktionellen und antigenspezifischen Th17 Zellen durch die CCR6 Expression gezeigt werden. Aufgrund unserer Befunde kann die selektive Neutralisierung von CCR6-positiven Th Zellen eine neue, vielversprechende Therapiemöglichkeit zur Bekämpfung von Autoimmunerkrankungen darstellen.

6. Anhang

6.1 Abkürzungen

%	Prozent
°C	Grad Celsius
μ	mikro
APC	<i>Antigen Presenting Cell</i>
at-EAE	<i>adoptive transfer - EAE</i>
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
CCR	Chemokinrezeptor
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CFSE	5,6-Carboxyfluorescein-succinimidylester
CpG	Cytosin-Guanosin Dinucleotid
DC	dendritische Zelle
DNA	<i>Desoxyribonucleic Acid</i>
dNTP	Desoxyribonucleosid-triphosphat
EAE	experimentelle Autoimmune-Enzephalomyelitis
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>Enzym Linked Immunosorbent Assay</i>
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i>
FKS	Fötales Kälber Serum
G-CSF	<i>Granulocyte Colony-Stimulating Factor</i>
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor

h	Stunde
IFA	Inkomplettes Freundsches Adjuvans
IFN	Interferon
IL	Interleukin
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
kDa	Kilodalton
LPS	Lipopolysaccharid
m	mili
MACS	<i>Magnetic Cell Separation</i>
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
M-MLV	Moloney Leukämie Virus der Maus
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MS	Multiple Sklerose
n.d.	nicht detektierbar
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
ODN	Oligodesoxynukleotide
Oligo-dT	Oligodesoxythymidin
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PMA	Phorbol Myristate Acetate
r	rekombinant
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i>
rpm	<i>revolutions per minute</i>
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
s.c.	subkutan
Th	T-Helfer-Zelle
TGF- β	<i>Transforming growth factor-β</i>

TNF	<i>Tumor Necrosis Factor</i>
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	<i>Unit</i>
ZNS	Zentrales Nervensystem

6.2 Publikationen

Publikationen, die im Rahmen dieser Doktorarbeit entstanden sind:

Tracing Functional Antigen-Specific CCR6+ Th17 Cells after Vaccination

Johann Pötzl, Catherine Botteron, Eugen Tausch, Xiomara Pedré, André M. Mueller, Daniela N. Männel, Anja Lechner

Publiziert in: PLoS ONE. 2008 Aug 13;3(8):e2951

Abstract: Re-Evaluation of the Function of CCR6 on Effector T Cells by Multi-Color Flow Cytometry

Johann Pötzl, Catherine Botteron, Daniela N. Männel, Anja Lechner

Publiziert in: Cytometry A. 2007 Sep;71(9):759

Poster:

- 09/2008: 38. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Immunologie und der Österreichischen Gesellschaft für Allergologie und Immunologie in Wien: „Tracing Functional Antigen-Specific CCR6⁺ Th17 Cells after Vaccination“
- 03/2008 4. *Spring School on Immunology* der Deutschen Gesellschaft für Immunologie in Ettal: „CCR6 expression defines a functional antigen specific Th17 cell subset in mice during the immune response“
- 10/2007 17. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Zytometrie in Regensburg: „Re-Evaluation of the Function of CCR6 on Effector T Cells by Multi-Color Flow Cytometry“
- 09/2007 37. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Immunologie in Heidelberg: „Characterisation of long-lived CCR6 expressing Th cells in the immune response“
- 09/2006 *16th European Congress of Immunology-Eci* in Paris: “Regulation of chemokine receptor expression after immunisation”

7. Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. Daniela N. Männel und Herrn PD Dr. Werner Kremer für die Bereitstellung des interessanten Themas bedanken. Insbesondere möchte ich Frau Männel für ihre wertvollen Ratschläge während der Seminare und ihr offenes Ohr bei allen Angelegenheiten danken. Mein besonderer Dank gilt ebenso Frau Dr. Anja Lechner für die Einarbeitung und Diskussionen während meiner Doktorarbeit. Herrn Assoc. Prof. Dr. Heinrich Körner möchte ich für die freundliche Aufnahme an der *James Cook University* in Townsville und die Bereitstellung seines Labors danken.

Ein herzliches Dankeschön auch an Catherine, André und Xiomara für die sehr gute Zusammenarbeit. Danke auch an die Mitglieder des Mikro-Biologie-Labors: Karin, Eugen, Christian und Thomas. Sie trugen alle zu einem sehr guten Arbeitsklima bei und halfen immer, wenn „Not am Mann“ war.

Weiter möchte ich Barbara, Johannes, Louay und der *Kaffee-Pause-Crew* für die mentale Unterstützung während der „Zusammenschreib-Phase“ danken.

Herrn Dr. Sven Mostböck danke ich für die Erweiterung meines Methodenspektrums und seine freundlich-kritische Art des Diskutierens.

Unserer Sekretärin Frau Kroher danke ich für ihre Hilfe bei allen organisatorischen und Amts-Angelegenheiten.

Am Schluss möchte ich mich bei meiner, mittlerweile immer größer werdenden, Familie bedanken. Vor allem bedanke ich mich dabei bei meiner Mutter, die mich auf allen Lebenswegen immer unterstützt hat. Der „Tine“ danke ich fürs Korrekturlesen...Deutsche Sprache, schwere Sprache!

Zu Schluss bedanke ich mich ganz herzlich bei meiner Frau. Für ihre Liebe und Kraft, die sie mir jeden Tag neu schenkt.

8. Literaturverzeichnis

Abdollahi-Roodsaz, S., Joosten, L. A., Koenders, M. I., Devesa, I., Roelofs, M. F., Radstake, T. R., Heuvelmans-Jacobs, M., Akira, S., Nicklin, M. J., Ribeiro-Dias, F., and van den Berg, W. B. (2008). Stimulation of TLR2 and TLR4 differentially skews the balance of T cells in a mouse model of arthritis. *J.Clin.Invest* **118**, 205-216.

Acosta-Rodriguez, E. V., Rivino, L., Geginat, J., Jarrossay, D., Gattorno, M., Lanzavecchia, A., Sallusto, F., and Napolitani, G. (2007). Surface phenotype and antigenic specificity of human interleukin 17-producing T helper memory cells. *Nat.Immunol.* **8**, 639-646.

Aggarwal, S., Ghilardi, N., Xie, M. H., de Sauvage, F. J., and Gurney, A. L. (2003). Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17. *J.Biol.Chem.* **278**, 1910-1914.

Allen, S. J., Crown, S. E., and Handel, T. M. (2007). Chemokine: receptor structure, interactions, and antagonism. *Annu.Rev.Immunol.* **25**, 787-820.

Ando, D. G., Clayton, J., Kono, D., Urban, J. L., and Sercarz, E. E. (1989). Encephalitogenic T cells in the B10.PL model of experimental allergic encephalomyelitis (EAE) are of the Th-1 lymphokine subtype. *Cell Immunol.* **124**, 132-143.

Baba, M., Imai, T., Nishimura, M., Kakizaki, M., Takagi, S., Hieshima, K., Nomiyama, H., and Yoshie, O. (1997). Identification of CCR6, the specific receptor for a novel lymphocyte-directed CC chemokine LARC. *J.Biol.Chem.* **272**, 14893-14898.

Baggiolini, M. (1998). Chemokines and leukocyte traffic. *Nature* **392**, 565-568.

Bargatze, R. F. and Butcher, E. C. (1993). Rapid G protein-regulated activation event involved in lymphocyte binding to high endothelial venules. *J.Exp.Med.* **178**, 367-372.

Ben Elyahu, S., Yirmiya, R., Liebeskind, J. C., Taylor, A. N., and Gale, R. P. (1991). Stress increases metastatic spread of a mammary tumor in rats: evidence for mediation by the immune system. *Brain Behav.Immun.* **5**, 193-205.

Betelli, E., Carrier, Y., Gao, W., Korn, T., Strom, T. B., Oukka, M., Weiner, H. L., and Kuchroo, V. K. (2006). Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* **441**, 235-238.

Betelli, E., Korn, T., and Kuchroo, V. K. (2007a). Th17: the third member of the effector T cell trilogy. *Curr.Opin.Immunol.* **19**, 652-657.

Betelli, E., Oukka, M., and Kuchroo, V. K. (2007b). T(H)-17 cells in the circle of immunity and autoimmunity. *Nat.Immunol.* **8**, 345-350.

Billiau, A., Heremans, H., Vandekerckhove, F., Dijkmans, R., Sobis, H., Meulepas, E., and Carton, H. (1988). Enhancement of experimental allergic encephalomyelitis in mice by antibodies against IFN-gamma. *J.Immunol.* **140**, 1506-1510.

- Bogdan, C., Gessner, A., Solbach, W., and Rollinghoff, M. (1996). Invasion, control and persistence of Leishmania parasites. *Curr.Opin.Immunol.* **8**, 517-525.
- Bonecchi, R., Bianchi, G., Bordignon, P. P., D'Ambrosio, D., Lang, R., Borsatti, A., Sozzani, S., Allavena, P., Gray, P. A., Mantovani, A., and Sinigaglia, F. (1998). Differential expression of chemokine receptors and chemotactic responsiveness of type 1 T helper cells (Th1s) and Th2s. *J.Exp.Med.* **187**, 129-134.
- Bromley, S. K., Peterson, D. A., Gunn, M. D., and Dustin, M. L. (2000). Cutting edge: hierarchy of chemokine receptor and TCR signals regulating T cell migration and proliferation. *J.Immunol.* **165**, 15-19.
- Cai, X. Y., Gommoll, C. P., Jr., Justice, L., Narula, S. K., and Fine, J. S. (1998). Regulation of granulocyte colony-stimulating factor gene expression by interleukin-17. *Immunol.Lett.* **62**, 51-58.
- Campbell, J. J., Pan, J., and Butcher, E. C. (1999). Cutting edge: developmental switches in chemokine responses during T cell maturation. *J.Immunol.* **163**, 2353-2357.
- Charmandari, E., Kino, T., Souvatzoglou, E., and Chrousos, G. P. (2003). Pediatric stress: hormonal mediators and human development. *Horm.Res.* **59**, 161-179.
- Cook, D. N., Prosser, D. M., Forster, R., Zhang, J., Kuklin, N. A., Abbondanzo, S. J., Niu, X. D., Chen, S. C., Manfra, D. J., Wiekowski, M. T., Sullivan, L. M., Smith, S. R., Greenberg, H. B., Narula, S. K., Lipp, M., and Lira, S. A. (2000). CCR6 mediates dendritic cell localization, lymphocyte homeostasis, and immune responses in mucosal tissue. *Immunity.* **12**, 495-503.
- Cua, D. J., Sherlock, J., Chen, Y., Murphy, C. A., Joyce, B., Seymour, B., Lucian, L., To, W., Kwan, S., Churakova, T., Zurawski, S., Wiekowski, M., Lira, S. A., Gorman, D., Kastelein, R. A., and Sedgwick, J. D. (2003). Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature* **421**, 744-748.
- Curnock, A. P., Logan, M. K., and Ward, S. G. (2002). Chemokine signalling: pivoting around multiple phosphoinositide 3-kinases. *Immunology* **105**, 125-136.
- Davis, M. C., Zautra, A. J., Younger, J., Motivala, S. J., Attrep, J., and Irwin, M. R. (2008). Chronic stress and regulation of cellular markers of inflammation in rheumatoid arthritis: implications for fatigue. *Brain Behav.Immun.* **22**, 24-32.
- Dhabhar, F. S. and McEwen, B. S. (1996). Stress-induced enhancement of antigen-specific cell-mediated immunity. *J.Immunol.* **156**, 2608-2615.
- Dhabhar, F. S. and McEwen, B. S. (1997). Acute stress enhances while chronic stress suppresses cell-mediated immunity in vivo: a potential role for leukocyte trafficking. *Brain Behav.Immun.* **11**, 286-306.
- Dhabhar, F. S. and McEwen, B. S. (1999). Enhancing versus suppressive effects of stress hormones on skin immune function. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **96**, 1059-1064.
- Dhabhar, F. S., Miller, A. H., Stein, M., McEwen, B. S., and Spencer, R. L. (1994). Diurnal and acute stress-induced changes in distribution of peripheral blood leukocyte subpopulations. *Brain Behav.Immun.* **8**, 66-79.
- Dieu, M. C., Vanbervliet, B., Vicari, A., Bridon, J. M., Oldham, E., Ait-Yahia, S., Briere, F., Zlotnik, A., Lebecque, S., and Caux, C. (1998). Selective recruitment of immature and

mature dendritic cells by distinct chemokines expressed in different anatomic sites. *J.Exp.Med.* **188**, 373-386.

Ebert, L. M. and McColl, S. R. (2002). Up-regulation of CCR5 and CCR6 on distinct subpopulations of antigen-activated CD4+ T lymphocytes. *J.Immunol.* **168**, 65-72.

Elenkov, I. J. and Chrousos, G. P. (2002). Stress hormones, proinflammatory and antiinflammatory cytokines, and autoimmunity. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* **966**, 290-303.

Faria, A. M. and Weiner, H. L. (2006). Oral tolerance and TGF-beta-producing cells. *Inflamm.Allergy Drug Targets.* **5**, 179-190.

Ferber, I. A., Brocke, S., Taylor-Edwards, C., Ridgway, W., Dinisco, C., Steinman, L., Dalton, D., and Fathman, C. G. (1996). Mice with a disrupted IFN-gamma gene are susceptible to the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *J.Immunol.* **156**, 5-7.

Forster, R., Schubel, A., Breitfeld, D., Kremmer, E., Renner-Muller, I., Wolf, E., and Lipp, M. (1999). CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs. *Cell* **99**, 23-33.

Fossiez, F., Djossou, O., Chomarat, P., Flores-Romo, L., Ait-Yahia, S., Maat, C., Pin, J. J., Garrone, P., Garcia, E., Saeland, S., Blanchard, D., Gaillard, C., Das, M. B., Rouvier, E., Golstein, P., Banchereau, J., and Lebecque, S. (1996). T cell interleukin-17 induces stromal cells to produce proinflammatory and hematopoietic cytokines. *J.Exp.Med.* **183**, 2593-2603.

Fujinami, R. S. and Oldstone, M. B. (1985). Amino acid homology between the encephalitogenic site of myelin basic protein and virus: mechanism for autoimmunity. *Science* **230**, 1043-1045.

Gajewski, T. F., Schell, S. R., Nau, G., and Fitch, F. W. (1989). Regulation of T-cell activation: differences among T-cell subsets. *Immunol.Rev.* **111**, 79-110.

Garcia, S., DiSanto, J., and Stockinger, B. (1999). Following the development of a CD4 T cell response in vivo: from activation to memory formation. *Immunity.* **11**, 163-171.

Gayo, A., Mozo, L., Suarez, A., Tunon, A., Lahoz, C., and Gutierrez, C. (1998). Glucocorticoids increase IL-10 expression in multiple sclerosis patients with acute relapse. *J.Neuroimmunol.* **85**, 122-130.

Girard, J. P. and Springer, T. A. (1995). High endothelial venules (HEVs): specialized endothelium for lymphocyte migration. *Immunol.Today* **16**, 449-457.

Glaser, R., Pearl, D. K., Kiecolt-Glaser, J. K., and Malarkey, W. B. (1994). Plasma cortisol levels and reactivation of latent Epstein-Barr virus in response to examination stress. *Psychoneuroendocrinology* **19**, 765-772.

Gran, B., Chu, N., Zhang, G. X., Yu, S., Li, Y., Chen, X. H., Kamoun, M., and Rostami, A. (2004). Early administration of IL-12 suppresses EAE through induction of interferon-gamma. *J.Neuroimmunol.* **156**, 123-131.

Greaves, D. R., Wang, W., Dairaghi, D. J., Dieu, M. C., Saint-Vis, B., Franz-Bacon, K., Rossi, D., Caux, C., McClanahan, T., Gordon, S., Zlotnik, A., and Schall, T. J. (1997). CCR6, a CC chemokine receptor that interacts with macrophage inflammatory protein 3alpha and is highly expressed in human dendritic cells. *J.Exp.Med.* **186**, 837-844.

- Hajjar, A. M., O'Mahony, D. S., Ozinsky, A., Underhill, D. M., Aderem, A., Klebanoff, S. J., and Wilson, C. B. (2001). Cutting edge: functional interactions between toll-like receptor (TLR) 2 and TLR1 or TLR6 in response to phenol-soluble modulin. *J.Immunol.* **166**, 15-19.
- Happel, K. I., Zheng, M., Young, E., Quinton, L. J., Lockhart, E., Ramsay, A. J., Shellito, J. E., Schurr, J. R., Bagby, G. J., Nelson, S., and Kolls, J. K. (2003). Cutting edge: roles of Toll-like receptor 4 and IL-23 in IL-17 expression in response to *Klebsiella pneumoniae* infection. *J.Immunol.* **170**, 4432-4436.
- Harrington, L. E., Hatton, R. D., Mangan, P. R., Turner, H., Murphy, T. L., Murphy, K. M., and Weaver, C. T. (2005). Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat.Immunol.* **6**, 1123-1132.
- Hauser, S. L., Waubant, E., Arnold, D. L., Vollmer, T., Antel, J., Fox, R. J., Bar-Or, A., Panzara, M., Sarkar, N., Agarwal, S., Langer-Gould, A., and Smith, C. H. (2008). B-cell depletion with rituximab in relapsing-remitting multiple sclerosis. *N.Engl.J.Med.* **358**, 676-688.
- Hemmer, B., Fleckenstein, B. T., Vergelli, M., Jung, G., McFarland, H., Martin, R., and Wiesmuller, K. H. (1997). Identification of high potency microbial and self ligands for a human autoreactive class II-restricted T cell clone. *J.Exp.Med.* **185**, 1651-1659.
- Hemmer, B., Nessler, S., Zhou, D., Kieseier, B., and Hartung, H. P. (2006). Immunopathogenesis and immunotherapy of multiple sclerosis. *Nat.Clin.Pract.Neurol.* **2**, 201-211.
- Hieshima, K., Imai, T., Opdenakker, G., Van Damme, J., Kusuda, J., Tei, H., Sakaki, Y., Takatsuki, K., Miura, R., Yoshie, O., and Nomiyama, H. (1997). Molecular cloning of a novel human CC chemokine liver and activation-regulated chemokine (LARC) expressed in liver. Chemotactic activity for lymphocytes and gene localization on chromosome 2. *J.Biol.Chem.* **272**, 5846-5853.
- Hirota, K., Hashimoto, M., Yoshitomi, H., Tanaka, S., Nomura, T., Yamaguchi, T., Iwakura, Y., Sakaguchi, N., and Sakaguchi, S. (2007). T cell self-reactivity forms a cytokine milieu for spontaneous development of IL-17+ Th cells that cause autoimmune arthritis. *J.Exp.Med.* **204**, 41-47.
- Hofstetter, H. H., Ibrahim, S. M., Koczan, D., Kruse, N., Weishaupt, A., Toyka, K. V., and Gold, R. (2005). Therapeutic efficacy of IL-17 neutralization in murine experimental autoimmune encephalomyelitis. *Cell Immunol.* **237**, 123-130.
- Holmoy, T. and Hestvik, A. L. (2008). Multiple sclerosis: immunopathogenesis and controversies in defining the cause. *Curr.Opin.Infect.Dis.* **21**, 271-278.
- Homey, B., Dieu-Nosjean, M. C., Wiesenborn, A., Massacrier, C., Pin, J. J., Oldham, E., Catron, D., Buchanan, M. E., Muller, A., deWaal, M. R., Deng, G., Orozco, R., Ruzicka, T., Lehmann, P., Lebecque, S., Caux, C., and Zlotnik, A. (2000). Up-regulation of macrophage inflammatory protein-3 alpha/CCL20 and CC chemokine receptor 6 in psoriasis. *J.Immunol.* **164**, 6621-6632.
- Hoyer, K. K., Kuswanto, W. F., Gallo, E., and Abbas, A. K. (2008). Distinct roles of helper T cell subsets in a systemic autoimmune disease. *Blood.*

Hsieh, C. S., Macatonia, S. E., Tripp, C. S., Wolf, S. F., O'Garra, A., and Murphy, K. M. (1993). Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages. *Science* **260**, 547-549.

Huang, W., Na, L., Fidel, P. L., and Schwarzenberger, P. (2004). Requirement of interleukin-17A for systemic anti-Candida albicans host defense in mice. *J.Infect.Dis.* **190**, 624-631.

Huet, S., Groux, H., Caillou, B., Valentin, H., Prieur, A. M., and Bernard, A. (1989). CD44 contributes to T cell activation. *J.Immunol.* **143**, 798-801.

Huseby, E. S., Liggitt, D., Brabb, T., Schnabel, B., Ohlen, C., and Goverman, J. (2001). A pathogenic role for myelin-specific CD8(+) T cells in a model for multiple sclerosis. *J.Exp.Med.* **194**, 669-676.

Iezzi, G., Scotet, E., Scheidegger, D., and Lanzavecchia, A. (1999). The interplay between the duration of TCR and cytokine signaling determines T cell polarization. *Eur.J.Immunol.* **29**, 4092-4101.

Ivanov, I. I., McKenzie, B. S., Zhou, L., Tadokoro, C. E., Lepelley, A., Lafaille, J. J., Cua, D. J., and Littman, D. R. (2006). The orphan nuclear receptor ROR γ directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. *Cell* **126**, 1121-1133.

Iwasaki, A. and Kelsall, B. L. (2000). Localization of distinct Peyer's patch dendritic cell subsets and their recruitment by chemokines macrophage inflammatory protein (MIP)-3 α , MIP-3 β , and secondary lymphoid organ chemokine. *J.Exp.Med.* **191**, 1381-1394.

Jenkins, M. K., Khoruts, A., Ingulli, E., Mueller, D. L., McSorley, S. J., Reinhardt, R. L., Itano, A., and Pape, K. A. (2001). In vivo activation of antigen-specific CD4 T cells. *Annu.Rev.Immunol.* **19**, 23-45.

Jovanovic, D. V., Di Battista, J. A., Martel-Pelletier, J., Jolicoeur, F. C., He, Y., Zhang, M., Mineau, F., and Pelletier, J. P. (1998). IL-17 stimulates the production and expression of proinflammatory cytokines, IL-beta and TNF-alpha, by human macrophages. *J.Immunol.* **160**, 3513-3521.

Kebir, H., Kreymborg, K., Ifergan, I., Dodelet-Devillers, A., Cayrol, R., Bernard, M., Giuliani, F., Arbour, N., Becher, B., and Prat, A. (2007). Human TH17 lymphocytes promote blood-brain barrier disruption and central nervous system inflammation. *Nat.Med.* **13**, 1173-1175.

Khader, S. A., Pearl, J. E., Sakamoto, K., Gilmartin, L., Bell, G. K., Jelley-Gibbs, D. M., Ghilardi, N., deSauvage, F., and Cooper, A. M. (2005). IL-23 compensates for the absence of IL-12p70 and is essential for the IL-17 response during tuberculosis but is dispensable for protection and antigen-specific IFN-gamma responses if IL-12p70 is available. *J.Immunol.* **175**, 788-795.

Khoruts, A., Miller, S. D., and Jenkins, M. K. (1995). Neuroantigen-specific Th2 cells are inefficient suppressors of experimental autoimmune encephalomyelitis induced by effector Th1 cells. *J.Immunol.* **155**, 5011-5017.

Kinashi, T. (2007). Integrin regulation of lymphocyte trafficking: lessons from structural and signaling studies. *Adv.Immunol.* **93**, 185-227.

Kirschning, C. J. and Bauer, S. (2001). Toll-like receptors: cellular signal transducers for exogenous molecular patterns causing immune responses. *Int.J.Med.Microbiol.* **291**, 251-260.

Kolanus, W. and Seed, B. (1997). Integrins and inside-out signal transduction: converging signals from PKC and PIP3. *Curr.Opin.Cell Biol.* **9**, 725-731.

Komiyama, Y., Nakae, S., Matsuki, T., Nambu, A., Ishigame, H., Kakuta, S., Sudo, K., and Iwakura, Y. (2006). IL-17 plays an important role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J.Immunol.* **177**, 566-573.

Kurtzke, J. F. (2000). Epidemiology of multiple sclerosis. Does this really point toward an etiology? Lectio Doctoralis. *Neurol.Sci.* **21**, 383-403.

Laan, M., Cui, Z. H., Hoshino, H., Lotvall, J., Sjostrand, M., Gruenert, D. C., Skoogh, B. E., and Linden, A. (1999). Neutrophil recruitment by human IL-17 via C-X-C chemokine release in the airways. *J.Immunol.* **162**, 2347-2352.

Langrish, C. L., Chen, Y., Blumenschein, W. M., Mattson, J., Basham, B., Sedgwick, J. D., McClanahan, T., Kastelein, R. A., and Cua, D. J. (2005). IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J.Exp.Med.* **201**, 233-240.

Lanzavecchia, A. and Sallusto, F. (2005). Understanding the generation and function of memory T cell subsets. *Curr.Opin.Immunol.* **17**, 326-332.

Lehmann, P. V., Sercarz, E. E., Forsthuber, T., Dayan, C.M., and Gammon, G. (1993). Determinant spreading and the dynamics of the autoimmune T-cell repertoire. *Immunol.Today* **14**, 203-208.

Levings, M. K. and Roncarolo, M. G. (2005). Phenotypic and functional differences between human CD4+CD25+ and type 1 regulatory T cells. *Curr.Top.Microbiol.Immunol.* **293**, 303-326.

Lexberg, M. H., Taubner, A., Forster, A., Albrecht, I., Richter, A., Kamradt, T., Radbruch, A., and Chang, H. D. (2008). Th memory for interleukin-17 expression is stable in vivo. *Eur.J.Immunol.*

Liao, F., Lee, H. H., and Farber, J. M. (1997). Cloning of STRL22, a new human gene encoding a G-protein-coupled receptor related to chemokine receptors and located on chromosome 6q27. *Genomics* **40**, 175-180.

Liao, F., Rabin, R. L., Smith, C. S., Sharma, G., Nutman, T. B., and Farber, J. M. (1999). CC-chemokine receptor 6 is expressed on diverse memory subsets of T cells and determines responsiveness to macrophage inflammatory protein 3 alpha. *J.Immunol.* **162**, 186-194.

Mackay, C. R. (2001). Chemokines: immunology's high impact factors. *Nat.Immunol.* **2**, 95-101.

Mackay, C. R. (2008). Moving targets: cell migration inhibitors as new anti-inflammatory therapies. *Nat.Immunol.* **9**, 988-998.

Marrack, P. and Kappler, J. (2004). Control of T cell viability. *Annu.Rev.Immunol.* **22**, 765-787.

Matsui, T., Akahoshi, T., Namai, R., Hashimoto, A., Kurihara, Y., Rana, M., Nishimura, A., Endo, H., Kitasato, H., Kawai, S., Takagishi, K., and Kondo, H. (2001). Selective recruitment of CCR6-expressing cells by increased production of MIP-3 alpha in rheumatoid arthritis. *Clin.Exp.Immunol.* **125**, 155-161.

- McFarland, H. F. and Martin, R. (2007). Multiple sclerosis: a complicated picture of autoimmunity. *Nat.Immunol.* **8**, 913-919.
- Mei-Tal, V., Meyerowitz, S., and Engel, G. L. (1970). The role of psychological process in a somatic disorder: multiple sclerosis. 1. The emotional setting of illness onset and exacerbation. *Psychosom.Med.* **32**, 67-86.
- Meissner, A., Zilles, O., Varona, R., Jozefowski, K., Ritter, U., Marquez, G., Hallmann, R., and Korner, H. (2003). CC chemokine ligand 20 partially controls adhesion of naive B cells to activated endothelial cells under shear stress. *Blood* **102**, 2724-2727.
- Mosmann, T. R. and Coffman, R. L. (1989). TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu.Rev.Immunol.* **7**, 145-173.
- Murphy, C. A., Langrish, C. L., Chen, Y., Blumenschein, W., McClanahan, T., Kastelein, R. A., Sedgwick, J. D., and Cua, D. J. (2003). Divergent pro- and antiinflammatory roles for IL-23 and IL-12 in joint autoimmune inflammation. *J.Exp.Med.* **198**, 1951-1957.
- Murphy, P. M., Baggiolini, M., Charo, I. F., Hebert, C. A., Horuk, R., Matsushima, K., Miller, L. H., Oppenheim, J. J., and Power, C. A. (2000). International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. *Pharmacol.Rev.* **52**, 145-176.
- Nakayama, T., Fujisawa, R., Yamada, H., Horikawa, T., Kawasaki, H., Hieshima, K., Izawa, D., Fujie, S., Tezuka, T., and Yoshie, O. (2001). Inducible expression of a CC chemokine liver- and activation-regulated chemokine (LARC)/macrophage inflammatory protein (MIP)-3 alpha/CCL20 by epidermal keratinocytes and its role in atopic dermatitis. *Int.Immunol.* **13**, 95-103.
- Netea, M. G., van, d., V, Verschueren, I., van der Meer, J. W., and Kullberg, B. J. (2008). Role of TLR1 and TLR6 in the host defense against disseminated candidiasis. *FEMS Immunol.Med.Microbiol.* **52**, 118-123.
- Noseworthy, J. H., Lucchinetti, C., Rodriguez, M., and Weinshenker, B. G. (2000). Multiple sclerosis. *N.Engl.J.Med.* **343**, 938-952.
- Nurieva, R., Yang, X. O., Martinez, G., Zhang, Y., Panopoulos, A. D., Ma, L., Schluns, K., Tian, Q., Watowich, S. S., Jetten, A. M., and Dong, C. (2007). Essential autocrine regulation by IL-21 in the generation of inflammatory T cells. *Nature* **448**, 480-483.
- O'Garra, A., Stockinger, B., and Veldhoen, M. (2008). Differentiation of human T(H)-17 cells does require TGF-beta! *Nat.Immunol.* **9**, 588-590.
- Olerup, O. and Hillert, J. (1991). HLA class II-associated genetic susceptibility in multiple sclerosis: a critical evaluation. *Tissue Antigens* **38**, 1-15.
- Olsson, T. (1995). Cytokine-producing cells in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Neurology* **45**, S11-S15.
- Oppermann, M. (2004). Chemokine receptor CCR5: insights into structure, function, and regulation. *Cell Signal.* **16**, 1201-1210.
- Park, H., Li, Z., Yang, X. O., Chang, S. H., Nurieva, R., Wang, Y. H., Wang, Y., Hood, L., Zhu, Z., Tian, Q., and Dong, C. (2005). A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat.Immunol.* **6**, 1133-1141.

- Pene, J., Chevalier, S., Preisser, L., Venereau, E., Guilleux, M. H., Ghannam, S., Moles, J. P., Danger, Y., Ravon, E., Lesaux, S., Yssel, H., and Gascan, H. (2008). Chronically inflamed human tissues are infiltrated by highly differentiated Th17 lymphocytes. *J.Immunol.* **180**, 7423-7430.
- Perez-Canadillas, J. M., Zaballos, A., Gutierrez, J., Varona, R., Roncal, F., Albar, J. P., Marquez, G., and Bruix, M. (2001). NMR solution structure of murine CCL20/MIP-3alpha, a chemokine that specifically chemoattracts immature dendritic cells and lymphocytes through its highly specific interaction with the beta-chemokine receptor CCR6. *J.Biol.Chem.* **276**, 28372-28379.
- Potzl, J., Botteron, C., Tausch, E., Pedre, X., Mueller, A. M., Mannel, D. N., and Lechner, A. (2008). Tracing functional antigen-specific CCR6 Th17 cells after vaccination. *PLoS.ONE.* **3**, e2951.
- Randolph, D. A., Huang, G., Carruthers, C. J., Bromley, L. E., and Chaplin, D. D. (1999). The role of CCR7 in TH1 and TH2 cell localization and delivery of B cell help in vivo. *Science* **286**, 2159-2162.
- Reber, S. O., Birkeneder, L., Veenema, A. H., Obermeier, F., Falk, W., Straub, R. H., and Neumann, I. D. (2007). Adrenal insufficiency and colonic inflammation after a novel chronic psycho-social stress paradigm in mice: implications and mechanisms. *Endocrinology* **148**, 670-682.
- Reber, S. O., Obermeier, F., Straub, R. H., Falk, W., and Neumann, I. D. (2006). Chronic intermittent psychosocial stress (social defeat/overcrowding) in mice increases the severity of an acute DSS-induced colitis and impairs regeneration. *Endocrinology* **147**, 4968-4976.
- Reinhardt, R. L., Khoruts, A., Merica, R., Zell, T., and Jenkins, M. K. (2001). Visualizing the generation of memory CD4 T cells in the whole body. *Nature* **410**, 101-105.
- Rollins, B. J. (1997). Chemokines. *Blood* **90**, 909-928.
- Romagnani, S. (1997). The Th1/Th2 paradigm. *Immunol.Today* **18**, 263-266.
- Sallusto, F. and Lanzavecchia, A. (2001). Exploring pathways for memory T cell generation. *J.Clin.Invest* **108**, 805-806.
- Sallusto, F., Lenig, D., Mackay, C. R., and Lanzavecchia, A. (1998). Flexible programs of chemokine receptor expression on human polarized T helper 1 and 2 lymphocytes. *J.Exp.Med.* **187**, 875-883.
- Sallusto, F., Mackay, C. R., and Lanzavecchia, A. (1997). Selective expression of the eotaxin receptor CCR3 by human T helper 2 cells. *Science* **277**, 2005-2007.
- Sallusto, F., Mackay, C. R., and Lanzavecchia, A. (2000). The role of chemokine receptors in primary, effector, and memory immune responses. *Annu.Rev.Immunol.* **18**, 593-620.
- Screpanti, I., Morrone, S., Meco, D., Santoni, A., Gulino, A., Paolini, R., Crisanti, A., Mathieson, B. J., and Frati, L. (1989). Steroid sensitivity of thymocyte subpopulations during intrathymic differentiation. Effects of 17 beta-estradiol and dexamethasone on subsets expressing T cell antigen receptor or IL-2 receptor. *J.Immunol.* **142**, 3378-3383.

- Seder, R. A., Paul, W. E., Davis, M. M., and Fazekas de St, G. B. (1992). The presence of interleukin 4 during in vitro priming determines the lymphokine-producing potential of CD4+ T cells from T cell receptor transgenic mice. *J.Exp.Med.* **176**, 1091-1098.
- Serafini, B., Columba-Cabezas, S., Di Rosa, F., and Aloisi, F. (2000). Intracerebral recruitment and maturation of dendritic cells in the onset and progression of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Am.J.Pathol.* **157**, 1991-2002.
- Shevach, E. M. (2006). From vanilla to 28 flavors: multiple varieties of T regulatory cells. *Immunity.* **25**, 195-201.
- Siveke, J. T. and Hamann, A. (1998). T helper 1 and T helper 2 cells respond differentially to chemokines. *J.Immunol.* **160**, 550-554.
- SOLOMON, G. F., MOOS, R. H., STONE, G. C., and FESSEL, W. J. (1964). PERIPHERAL VASOCONSTRICTION INDUCED BY EMOTIONAL STRESS IN RATS. *Angiology* **15**, 362-365.
- Spertini, O., Kansas, G. S., Munro, J. M., Griffin, J. D., and Tedder, T. F. (1991). Regulation of leukocyte migration by activation of the leukocyte adhesion molecule-1 (LAM-1) selectin. *Nature* **349**, 691-694.
- Springer, T. A. (1994). Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* **76**, 301-314.
- Steinman, L. (2007). A brief history of T(H)17, the first major revision in the T(H)1/T(H)2 hypothesis of T cell-mediated tissue damage. *Nat.Med.* **13**, 139-145.
- Stockinger, B., Veldhoen, M., and Martin, B. (2007). Th17 T cells: linking innate and adaptive immunity. *Semin.Immunol.* **19**, 353-361.
- Suri-Payer, E., Amar, A. Z., Thornton, A. M., and Shevach, E. M. (1998). CD4+CD25+ T cells inhibit both the induction and effector function of autoreactive T cells and represent a unique lineage of immunoregulatory cells. *J.Immunol.* **160**, 1212-1218.
- Takeda, K., Kaisho, T., and Akira, S. (2003). Toll-like receptors. *Annu.Rev.Immunol.* **21**, 335-376.
- Testi, R., Phillips, J. H., and Lanier, L. L. (1989). T cell activation via Leu-23 (CD69). *J.Immunol.* **143**, 1123-1128.
- Thomason, B. T., Brantley, P. J., Jones, G. N., Dyer, H. R., and Morris, J. L. (1992). The relation between stress and disease activity in rheumatoid arthritis. *J.Behav.Med.* **15**, 215-220.
- Vaknin-Dembinsky, A., Balashov, K., and Weiner, H. L. (2006). IL-23 is increased in dendritic cells in multiple sclerosis and down-regulation of IL-23 by antisense oligos increases dendritic cell IL-10 production. *J.Immunol.* **176**, 7768-7774.
- van Beelen, A. J., Zelinkova, Z., Taanman-Kueter, E. W., Muller, F. J., Hommes, D. W., Zaat, S. A., Kapsenberg, M. L., and de Jong, E. C. (2007). Stimulation of the intracellular bacterial sensor NOD2 programs dendritic cells to promote interleukin-17 production in human memory T cells. *Immunity.* **27**, 660-669.

- Vanderlugt, C. L. and Miller, S. D. (2002). Epitope spreading in immune-mediated diseases: implications for immunotherapy. *Nat.Rev.Immunol.* **2**, 85-95.
- Varona, R., Villares, R., Carramolino, L., Goya, I., Zaballos, A., Gutierrez, J., Torres, M., Martinez, A., and Marquez, G. (2001). CCR6-deficient mice have impaired leukocyte homeostasis and altered contact hypersensitivity and delayed-type hypersensitivity responses. *J.Clin.Invest* **107**, R37-R45.
- Varona, R., Zaballos, A., Gutierrez, J., Martin, P., Roncal, F., Albar, J. P., Ardavin, C., and Marquez, G. (1998). Molecular cloning, functional characterization and mRNA expression analysis of the murine chemokine receptor CCR6 and its specific ligand MIP-3alpha. *FEBS Lett.* **440**, 188-194.
- Veldhoen, M., Hocking, R. J., Atkins, C. J., Locksley, R. M., and Stockinger, B. (2006). TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity.* **24**, 179-189.
- Verbeek, R., van Dongen, H., Wawrousek, E. F., Amor, S., and van Noort, J. M. (2007). Induction of EAE by T cells specific for alpha B-crystallin depends on prior viral infection in the CNS. *Int.Immunol.* **19**, 277-285.
- Viswanathan, K., Daugherty, C., and Dhabhar, F. S. (2005). Stress as an endogenous adjuvant: augmentation of the immunization phase of cell-mediated immunity. *Int.Immunol.* **17**, 1059-1069.
- Wagner, H. (2004). The immunobiology of the TLR9 subfamily. *Trends Immunol.* **25**, 381-386.
- Wan, Y. Y. and Flavell, R. A. (2006). The roles for cytokines in the generation and maintenance of regulatory T cells. *Immunol.Rev.* **212**, 114-130.
- Warnock, R. A., Askari, S., Butcher, E. C., and von Andrian, U. H. (1998). Molecular mechanisms of lymphocyte homing to peripheral lymph nodes. *J.Exp.Med.* **187**, 205-216.
- Wilder, R. L. and Elenkov, I. J. (1999). Hormonal regulation of tumor necrosis factor-alpha, interleukin-12 and interleukin-10 production by activated macrophages. A disease-modifying mechanism in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus? *Ann.N.Y.Acad.Sci.* **876**, 14-31.
- Wilson, N. J., Boniface, K., Chan, J. R., McKenzie, B. S., Blumenschein, W. M., Mattson, J. D., Basham, B., Smith, K., Chen, T., Morel, F., Lecron, J. C., Kastelein, R. A., Cua, D. J., McClanahan, T. K., Bowman, E. P., and de Waal, M. R. (2007). Development, cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells. *Nat.Immunol.* **8**, 950-957.
- Witowski, J., Pawlaczyk, K., Breborowicz, A., Scheuren, A., Kuzlan-Pawlaczyk, M., Wisniewska, J., Polubinska, A., Friess, H., Gahl, G. M., Frei, U., and Jorres, A. (2000). IL-17 stimulates intraperitoneal neutrophil infiltration through the release of GRO alpha chemokine from mesothelial cells. *J.Immunol.* **165**, 5814-5821.
- Wucherpfennig, K. W. and Strominger, J. L. (1995). Molecular mimicry in T cell-mediated autoimmunity: viral peptides activate human T cell clones specific for myelin basic protein. *Cell* **80**, 695-705.

Yang, D., Chertov, O., Bykovskaia, S. N., Chen, Q., Buffo, M. J., Shogan, J., Anderson, M., Schroder, J. M., Wang, J. M., Howard, O. M., and Oppenheim, J. J. (1999). Beta-defensins: linking innate and adaptive immunity through dendritic and T cell CCR6. *Science* **286**, 525-528.

Ye, P., Garvey, P. B., Zhang, P., Nelson, S., Bagby, G., Summer, W. R., Schwarzenberger, P., Shellito, J. E., and Kolls, J. K. (2001). Interleukin-17 and lung host defense against *Klebsiella pneumoniae* infection. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* **25**, 335-340.

Zamvil, S. S. and Steinman, L. (1990). The T lymphocyte in experimental allergic encephalomyelitis. *Annu.Rev.Immunol.* **8**, 579-621.

Zlotnik, A. and Yoshie, O. (2000). Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity.* **12**, 121-127.

Zou, Y. R., Kottmann, A. H., Kuroda, M., Taniuchi, I., and Littman, D. R. (1998). Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development. *Nature* **393**, 595-599.

9. Lebenslauf

Promotion

seit 11/2005 Stipendium der Bayerischen Forschungsstiftung. Promotion am Institut für Immunologie der Universität Regensburg bei Frau Prof. Dr. Daniela Männel.

Auslandserfahrung

07/2006 - 12/2006 Im Rahmen der Doktorarbeit wurden Experimente am *Comparative Genomics Centre* der James Cook Universität in Townsville (Australien) bei Prof. Dr. Heinrich Körner durchgeführt.

Hochschulbildung

11/1999 - 05/2005 Studium der Biologie an der Universität Regensburg
Schwerpunkte: Biochemie, Bioinformatik und Organische Chemie
Abschluss: Diplom-Biologe; Note: sehr gut

05/2004 - 05/2005 Diplomarbeit am Lehrstuhl für Biophysik und physikalische Biochemie bei Herrn Prof. Dr. Dr. Hans-Robert Kalbitzer.
Thema: „³¹P-NMR-spektroskopische Untersuchung der Aktivierung und Inaktivierung des menschlichen Ras-Proteins, eines molekularen Schalters in der zellulären Signaltransduktion“.

Schule und Wehrdienst

09/1998 - 05/1999 Sanitäter bei der Fernmeldeeinheit F in Kötzing

09/1989 - 07/1998 Carl-Friedrich-Gauss Gymnasium Schwandorf. Abschluss: Allgemeine Hochschulreife; Note: befriedigend