

Charakterisierung von  
Chondroitinsulfat-induzierten B-Zellen  
*in vitro* und *in vivo*



DISSERTATION ZUR ERLANGUNG DES  
DOKTORGRADES DER NATURWISSENSCHAFTEN (DR. RER. NAT.)  
DER FAKULTÄT FÜR BIOLOGIE UND VORKLINISCHE MEDIZIN  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

vorgelegt von  
Frederike Winter

aus  
Schweinfurt

im Jahr  
2020

Das Promotionsgesuch wurde eingereicht am:

12.11.2020

Die Arbeit wurde angeleitet von:

Prof. Dr. Matthias Mack

Unterschrift:

---

Frederike Winter

# Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1 Das Immunsystem .....	1
1.1.1 Überblick .....	1
1.1.2 B-Zellen .....	3
1.1.2.1 Allgemeiner Aufbau eines Immunglobulins .....	3
1.1.2.2 V(D)J Rekombination .....	4
1.1.2.3 Entwicklung von B-Zellen .....	6
1.1.2.4 Aktivierung von B-Zellen.....	7
1.1.2.5 Funktion von Antikörpern in der humoralen Immunantwort.....	9
1.1.2.6 Regulatorische Funktion .....	9
1.1.2.7 Immunglobulin E .....	12
1.1.3 Basophile Granulozyten .....	12
1.1.3.1 Entwicklung .....	13
1.1.3.2 Aktivierung und Effektorfunktionen .....	14
1.2 Chondroitinsulfat.....	15
1.2.1 Allgemeiner Aufbau .....	15
1.2.2 Funktion / Wirkung .....	16
1.3 Multiple Sklerose (MS) beim Menschen .....	17
1.3.1 Epidemiologie.....	17
1.3.2 Ätiologie .....	17
1.3.3 Pathogenese .....	18
1.3.4 Symptomatik und Verlaufsformen .....	19
1.3.5 Therapieansätze .....	20
1.4 Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis (EAE) als Maus Modell der humanen MS .....	21
1.4.1 Methoden der Immunisierung .....	22
1.4.2 Verlaufsformen der EAE .....	23
1.4.3 Einfluss von B-Zellen in der EAE .....	24
1.4.3.1 Pathogener Einfluss von B-Zellen .....	24
1.4.3.2 Suppressiver Einfluss von B-Zellen.....	25
1.4.4 Einfluss von Chondroitinsulfat in der EAE.....	26
1.4.5 Einfluss von Basophilen in der EAE.....	27

1.5 Zielsetzung .....	27
2. Material.....	29
2.1 Chemikalien, Reagenzien, Puffer .....	29
2.2 Stimulanzen und Antikörper .....	30
2.3 FACS-Antikörper.....	31
2.4 Zellkulturmedien und Zellkulturzusätze .....	32
2.5 Zusammensetzung der Zellkulturmedien.....	32
2.6 Pufferzusammensetzung .....	33
2.7 Arzneistoffe.....	33
2.8 Kits .....	34
2.9 Sonstige Verbrauchsmaterialien.....	34
2.10 Geräte .....	36
2.11 Software.....	37
2.12 Versuchstiere .....	38
3. Methoden .....	39
3.1 Tierexperimente.....	39
3.1.1 Versuchstiere und Tierhaltung .....	39
3.1.2 Intraperitoneale, intravenöse und subkutane Injektionen.....	39
3.1.3 Antagonisierbare Narkose.....	39
3.1.4 <i>In vivo</i> Experimente mit Injektion von CSC .....	40
3.1.5 Tiermodell der EAE .....	40
3.1.5.1 Immunisierung .....	40
3.1.5.2 Krankheitsverlauf und Scoring.....	41
3.2 Zellbiologische Methoden .....	43
3.2.1 Entnahme von peripherem Blut und Gewinnung von Plasma.....	43
3.2.2 Transkardiale Perfusion .....	43
3.2.3 Präparation von murinen Zellen .....	43
3.2.3.1 Präparation von Zellen aus der Milz .....	44
3.2.3.2 Präparation von Zellen aus dem Gehirn.....	44
3.2.3.3 Präparation von Zellen aus dem Rückenmark .....	45
3.2.3.4 Präparation von Zellen aus dem Knochenmark .....	45
3.2.4 Isolation von Zellen mittels MACS .....	46
3.2.5 Bestimmung der Lebendzellzahl mittels Neubauer-Zählkammer.....	47
3.2.6 Stimulation und Aktivierung von isolierten Zellen in einer Zellkultur .....	48

3.2.7 Konzentrationsbestimmung von Zytokinen und Immunglobulinen mittels ELISA .....	50
3.2.8 Depletion von IgE aus Plasma .....	54
3.3 Durchflusszytometrische Zellsortierung .....	54
3.3.1 Extrazelluläre Färbung zur FACS-Analyse .....	55
3.3.2 Quantifizierung durchflusszytometrischer Analysen .....	57
3.4 Statistische Auswertung .....	60
4. Ergebnisse .....	61
4.1 Einfluss von CSC auf B-Zellen <i>in vitro</i> .....	61
4.1.1 Proliferation von B-Zellen .....	61
4.1.2 Modulation von Oberflächenrezeptoren auf B-Zellen .....	62
4.1.3 Sekretion von Zytokinen durch B-Zellen .....	62
4.2 Einfluss von CSC auf B-Zellen <i>in vivo</i> .....	63
4.2.1 Modulation von Oberflächenrezeptoren .....	64
4.2.2 Sekretion von Immunglobulinen ins Plasma .....	65
4.3 Einfluss von CSC auf Basophile <i>in vivo</i> .....	65
4.3.1 Modulation der IgE-Bindung .....	66
4.3.2 Stimulation von CD49b <sup>+</sup> Zellen aus dem Knochenmark .....	66
4.4 Wirkweise von CSC im Maus-Modell der EAE .....	68
4.4.1 Behandlung mit CSC .....	69
4.4.1.1 Behandlung mit CSC vor und nach Immunisierung .....	69
4.4.1.2 Behandlung mit CSC in unterschiedlichen Zeitfenstern .....	73
4.4.1.3 Behandlung von B-Zell-defizienten Mäusen mit CSC .....	80
4.4.1.4 Behandlung von Plasmazell-defizienten Mäusen mit CSC .....	82
4.4.2 B-Zell-Transfer aus CSC-behandelten Mäusen .....	84
4.4.3 Plasma-Transfer aus CSC-behandelten Mäusen .....	90
4.4.3.1 Transfer von Plasma aus 5 Tage und 14 Tage CSC-behandelten Mäusen .....	90
4.4.3.2 Transfer von IgE <sup>-</sup> -Plasma aus 14 Tage CSC-behandelten Mäusen ...	94
4.4.4 Depletion von Basophilen mit zusätzlicher Behandlung mit CSC .....	100
5. Diskussion .....	110
5.1 CSC führt zur Proliferation von B-Zellen <i>in vitro</i> und zu einem antiinflammatorischen Zytokin-Profil .....	110

5.2 CSC moduliert die CD138 Expression von B-Zellen <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i> und führt zur Sekretion von IgE .....	110
5.3 Basophile sind nach CSC-Behandlung besser aktivierbar und binden IgE ...	111
5.4 Behandlung mit CSC verbessert den Verlauf der EAE in Abhängigkeit von B-Zellen .....	113
5.5 Adoptiver Transfer von CSC-induzierten B-Zellen verbessert den Verlauf der EAE.....	115
5.6 Transfer von Plasma aus CSC-behandelten Mäusen verbessert den Verlauf der EAE in Abhängigkeit von IgE .....	117
5.7 Verbesserung der EAE durch CSC ist abhängig von Basophilen .....	119
5.8 Keine veränderte Infiltration des ZNS .....	121
6. Zusammenfassung .....	122
7. Abkürzungsverzeichnis .....	124
8. Abbildungsverzeichnis.....	128
9. Tabellenverzeichnis.....	131
10. Literaturverzeichnis .....	132
11. Danksagung .....	140

# 1. Einleitung

## 1.1 Das Immunsystem

### 1.1.1 Überblick

Jeder Organismus ist der fortwährenden Präsenz von potentiell pathogenen Mikroorganismen und Toxinen ausgesetzt, die den Körper schädigen könnten. Zum Schutz sowohl gegen das Eindringen solcher Krankheitserreger als auch deren Eliminierung dient das Immunsystem. Dieses stellt ein differenziertes und hochkomplexes System dar, welches eine effektive Abwehr von Pathogenen gewährleisten kann. Mit einer der wichtigsten Eigenschaften des Immunsystems ist dabei die Unterscheidung zwischen körpereigenen Antigenen und Fremd-Antigenen, was als Selbsttoleranz bezeichnet wird. Ist die Selbsttoleranz gestört, kann es durch die Ausbildung von Autoimmunerkrankungen zur Schädigung von körpereigenen Geweben kommen [1, 2].

Das Immunsystem besteht aus diversen sezernierten Molekülen und aus einer Vielzahl an Effektorzellen, die von den pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark abstammen. Es lässt sich allgemein in das angeborene, unspezifische und das adaptive (erworbene), spezifische Immunsystem unterteilen. Durch die enge Interaktion der beiden Systeme lässt sich eine effektive Abwehr von Pathogenen gewährleisten [1, 2].

Das angeborene Immunsystem stellt die erste Barriere der Abwehr dar und wirkt dabei effizient und schnell innerhalb von Minuten [2]. Es hat sich phylogenetisch früh entwickelt und löst durch die Erkennung von Eindringlingen eine unmittelbare Immunantwort aus [3]. Das angeborene Immunsystem beinhaltet physikalische und chemische Barrieren, ebenso wie zelluläre und humorale Bestandteile und Rezeptoren, die molekulare konservierte Muster auf der Oberfläche von eindringenden Pathogenen erkennen [1, 4]. Die Haut und Epithelien stellen eine physikalische Barriere dar, während beispielsweise die saure Umgebung im Magen und im Speichel enthaltene Enzyme als chemische Barriere mit anti-mikrobieller Wirkung fungieren [2]. Zu den zellulären Bestandteilen zählen unter anderem Neutrophile Granulozyten und Makrophagen. Diese sekretieren destruktive Substanzen wie Protein-verdauende Enzyme, um eindringende Zellen zu töten und diese anschließend zu phagozytieren [1, 4]. Des Weiteren

zählen Mastzellen, natürliche Killer (NK)-Zellen und dendritische Zellen zum angeborenen Immunsystem [2]. Der humorale Teil des angeborenen Immunsystems beinhaltet Proteine des Komplementsystems. Diese starten eine Kaskade an proteolytischen Reaktionen, welche zur Zerstörung der Zielzelle führen. Weitere Bestandteile sind Chemokine, die Lymphozyten anlocken, und Zytokine, welche die Funktion, Aktivierung und Proliferation weiterer Zellen steuern können [2, 4].

Das adaptive Immunsystem wirkt im Gegensatz zum angeborenen Immunsystem erst nach einigen Stunden bzw. nach einigen Tagen. Anders als bei der angeborenen Immunität starten keine unspezifischen, bereits vorhandenen Mechanismen direkt nach der Pathogen-Erkennung. Stattdessen muss eine Antigen-spezifische Immunantwort erst etabliert werden. Ein großer Vorteil des adaptiven Immunsystems ist, dass ein immunologisches Gedächtnis gebildet wird, sodass das Immunsystem bei einer Re-Infektion deutlich schneller und effektiver reagieren kann [2]. Das adaptive Immunsystem besteht aus B-Zellen und T-Zellen, bei denen es sich um Antigen-spezifische Lymphozyten handelt. Jeder Lymphozyt reift mit einer einzigartigen Variante eines Antigen-Rezeptors heran, wodurch die Lymphozyten-Population ein großes Repertoire an Rezeptoren mit hoch diversen Antigen-Bindungsstellen besitzt, die potentiell jedes fremde Antigen erkennen können [1, 2, 5]. B- und T-Zellen entstehen im Knochenmark. Anschließend verbleiben B-Zellen im Knochenmark und differenzieren zu reifen naiven B-Zellen, während T-Zellen zur Differenzierung in den Thymus wandern. Hierbei lernen die Zellen zwischen Selbst und Fremd zu unterscheiden [2, 5]. Die naiven reifen B-Zellen und T-Zellen zirkulieren zwischen Blut und sekundären lymphatischen Organen, bis sie ihr spezifisches Antigen antreffen und aktiviert werden. Die Aktivierung von Lymphozyten ist eine wichtige Verbindung zwischen dem angeborenen und dem adaptiven Immunsystem. Dendritische Zellen phagozytieren Pathogene, prozessieren diese und präsentieren sie in Peptidform auf ihrer Zelloberfläche naiven T-Zellen. Sie werden daher auch als Antigen-präsentierende Zellen (*antigen presenting cells*, APCs) bezeichnet. Erkennen T-Zellen mit ihrem T-Zell-Rezeptor (*T cell receptor*, TCR) das präsentierte Antigen, werden sie durch diese Stimulation und weitere costimulatorische Signale der dendritischen Zelle aktiviert. Im Gegensatz dazu werden B-Zellen durch die Bindung eines Antigens an ihren B-Zell-Rezeptor (*B cell receptor*, BCR) aktiviert, während weitere Aktivierungssignale durch die Interaktion mit aktivierten T-Zellen kommen [2]. Nach der Aktivierung differenzieren Lymphozyten zu Effektorzellen.



Die Effektor-Form von B-Zellen sind Plasmazellen, welche Antigen-spezifische Antikörper sekretieren, um so Pathogene und Toxine im extrazellulären Raum zu neutralisieren und zu bekämpfen. Dies stellt die humorale Immunantwort dar. T-Zellen können sich in die drei unterschiedlichen Effektorzelltypen der zytotoxischen T-Zellen, der T-Helferzellen ( $T_H$ ) und der regulatorischen T-Zellen differenzieren. Hierbei töten zytotoxische T-Zellen Zellen, die mit Viren oder intrazellulären Pathogenen infiziert sind. T-Helferzellen interagieren unter anderem mit Antigen-stimulierten B-Zellen, um deren Produktion von Antikörpern zu unterstützen. Im Gegensatz dazu unterdrücken regulatorische T-Zellen die Aktivität von anderen Lymphozyten, um Immunreaktionen einzudämmen. Daher sind T-Zellen sowohl für die humorale als auch für die zell-vermittelte Immunantwort wichtig [1, 2, 5]. Während der Immunreaktion differenzieren einige B- und T-Zellen zu langlebigen Gedächtniszellen, um eine langanhaltende Immunität zu gewährleisten [2, 5].

### 1.1.2 B-Zellen

Erstmals entdeckt wurden B-Zellen in der Bursa Fabricii, einem lymphatischen Organ in Vögeln, in dem die B-Zellen reifen. Daher wurden diese Zellen als „Bursa“ (B)-Zellen benannt [6].

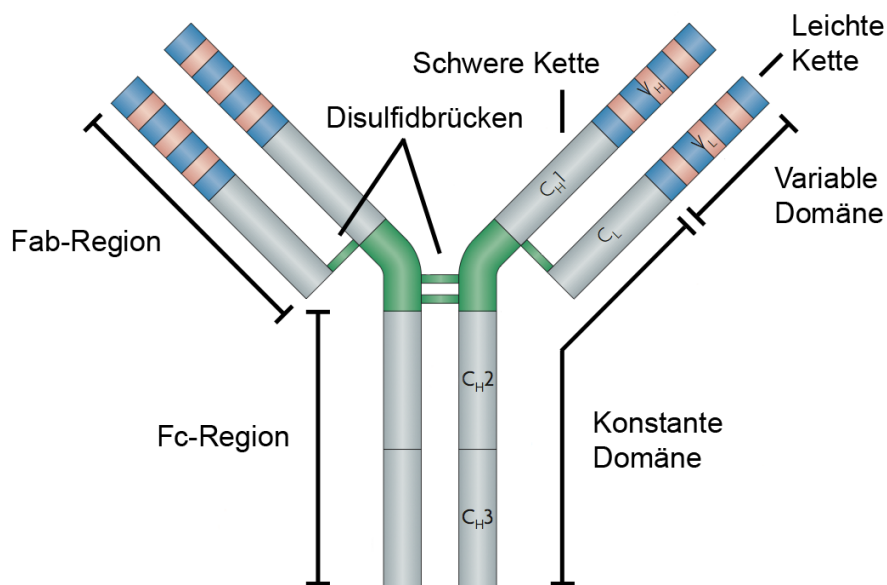
#### 1.1.2.1 Allgemeiner Aufbau eines Immunglobulins

Bei Immunglobulinen (Ig), die auf der Zelloberfläche von B-Zellen exprimiert werden bzw. durch terminal-differenzierte Plasmazellen sekretiert werden, handelt es sich um Glykoproteine. Sie stellen in ihrer Funktion als Antigenrezeptoren einen essentiellen Teil des humoralen adaptiven Immunsystems dar. Allgemein lassen sich Antikörper in die fünf Isotypen IgM, IgD, IgA, IgE und IgG unterteilen. IgG stellt dabei den im humanen Immunsystem am häufigsten vorkommenden Isotyp dar, welcher in die vier Unterklassen IgG1, IgG2, IgG3 und IgG4 unterteilt werden kann [7, 8]. IgA lässt sich in die Unterklassen IgA1 und IgA2 gliedern [8].

Ein IgG Antikörper besteht aus zwei identischen schweren Ketten (*heavy chain*, HC) und zwei identischen leichten Ketten (*light chain*, LC), die durch Disulfidbrücken miteinander verbunden sind (Abbildung 1). Die Paare von leichten und schweren Ketten

wiederum lassen sich in zwei strukturelle Domänen, die variable Domäne und die konstante Domäne untergliedern. Die leichte Kette besteht aus einer variablen Domäne (*variable light*,  $V_L$ ) und einer konstanten Domäne (*constant light*,  $C_L$ ), während sich die schwere Kette in eine variable Domäne (*variable heavy*,  $V_H$ ) und drei konstante Domänen (*constant heavy*,  $C_{H1}$ ,  $C_{H2}$ ,  $C_{H3}$ ) aufteilt [8, 9]. Im Gegensatz dazu beinhalten die schweren Ketten von IgM und IgE eine vierte konstante Domäne ( $C_{H4}$ ) [8].

Die Fab (*fragment antigen binding*)-Regionen (bestehend aus  $V_L$ ,  $V_H$ ,  $C_L$  und  $C_{H1}$ ) können spezifische Antigene binden, wohingegen die Fc (*fragment crystallizable*)-Region (bestehend aus  $C_{H2}$ ,  $C_{H3}$  und  $C_{H4}$  bei IgM und IgE) verantwortlich für Effektorfunktionen ist. Dazu gehören unter anderem die Bindung an Proteine des Komplementsystems oder die Bindung an Fc-Rezeptoren [7, 10].



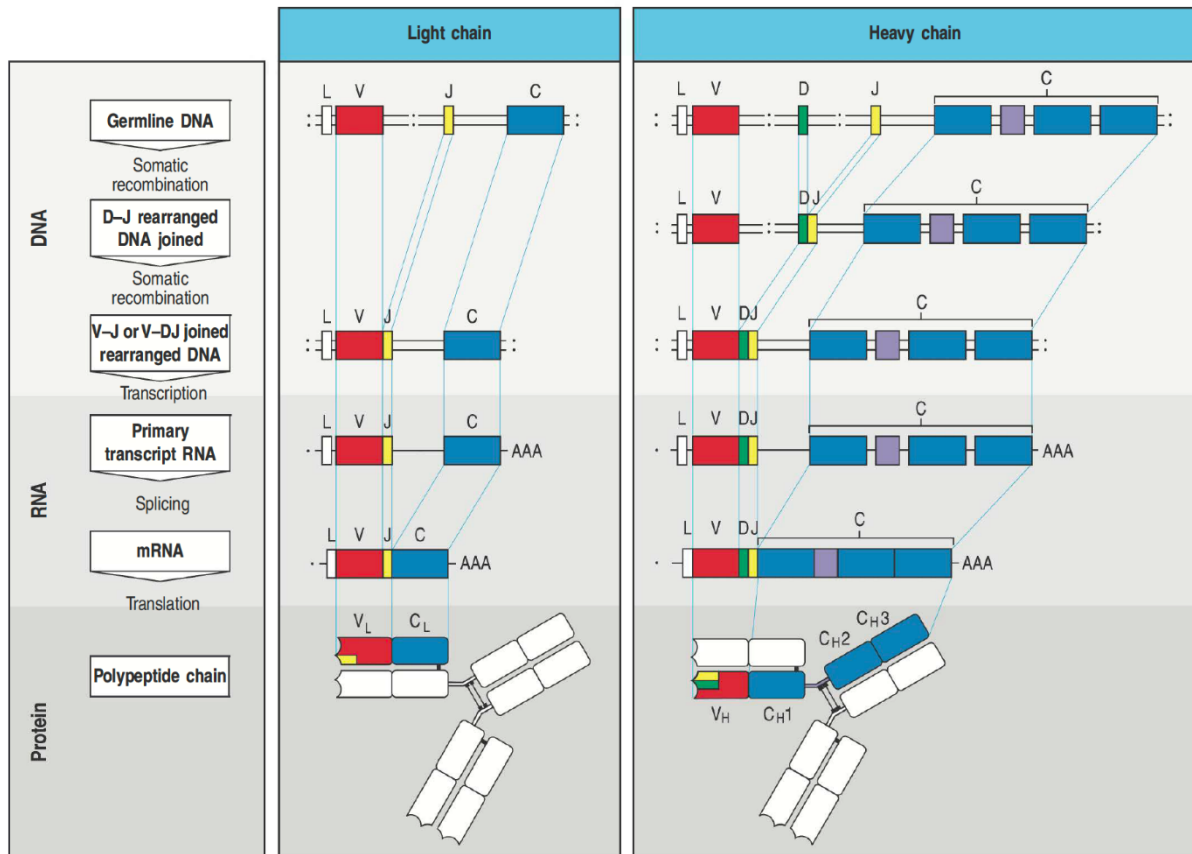
**Abbildung 1: Aufbau eines IgG Antikörpers.** Ein Antikörper besteht aus zwei schweren und zwei leichten Ketten, die über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Die schweren Ketten setzen sich aus einer variablen und drei konstanten Domänen zusammen, während die leichte Kette aus einer variablen und einer konstanten Domäne besteht. Die Fc-Region dient der Effektorfunktion des Antikörpers, wohingegen die Fab-Region für die Antigenbindung verantwortlich ist. Modifiziert von [11].

### 1.1.2.2 V(D)J Rekombination

Um jedes potentiell eindringende Pathogen erkennen zu können, wird eine hohe Anzahl an Antigen-Rezeptoren mit einzigartigen Antigen-Spezifitäten benötigt. Um diese

Diversität an Antigen-Bindestellen zu gewährleisten, liegen die Gene, die für die variable Domäne der Antigen-Rezeptoren kodieren, in mehreren Gensegmenten vor. Diese werden in der B-Zelle (ebenso wie in der T-Zelle) durch eine somatische DNA-Rekombination, die auch als V(D)J Rekombination bezeichnet wird, zu einer kompletten variablen Region zusammengesetzt. Dabei werden V-(*variable*), D-(*diversity*) und J-(*joining*) Gensegmente zufällig angeordnet, die jeweils in einer Vielzahl an Kopien im Genom vorliegen [2]. Die V(D)J Rekombination eines Igs ist in Abbildung 2 dargestellt. Die leichte Kette der variablen Domäne wird aus zwei Gensegmenten ( $V_L$  und  $J_L$ ) zusammengesetzt [12]. Durch diese Umlagerung wird ein Exon generiert, welches für die komplette leichte Kette der variablen Domäne kodiert. Um eine *messengerRNA* (*messenger ribonucleic acid*, Ribonukleinsäure, mRNA) zu generieren, die die komplette leichte Kette des Igs enthält, wird die konstante Domäne durch RNA *splicing* mit der variablen Domäne verbunden. Die variable Domäne der schweren Kette wird aus den drei Gensegmenten  $V_H$ , D und  $J_H$  hergestellt. Die zusätzlichen D Gensegmente liegen zwischen den Segmenten  $V_H$  und  $J_H$ . Zunächst werden jeweils ein D Segment und ein  $J_H$  Segment durch Rekombination miteinander verbunden, woraufhin ein  $V_H$  Segment mit dem  $DJ_H$  Segment verbunden wird. Anschließend wird, wie bei der leichten Kette, die komplette mRNA der schweren Kette durch RNA *splicing* hergestellt [2, 13].

Die Genumlagerung führt zur vermehrten Diversität, da einerseits die in verschiedenen Varianten vorliegenden Gensegmente zufällig kombiniert werden (kombinatorische Diversität) und andererseits beim Verknüpfen der Verbindungsstellen der Gensegmente Nukleotide addiert und/oder deletiert werden können. Das so generierte Antikörper Repertoire im Menschen liegt bei etwa  $10^6$ . Vermehrte Diversität wird ebenfalls durch die vielen möglichen Kombinationen von schwerer und leichter Kette geschaffen. Zur Erhöhung der Diversität führt auch die somatische Hypermutation, die Punktmutationen in die variable Region von aktivierten B-Zellen einbringt. Die Anzahl der möglichen Antikörperspezifitäten im Menschen wird so auf mindestens  $10^{11}$  erhöht [2].

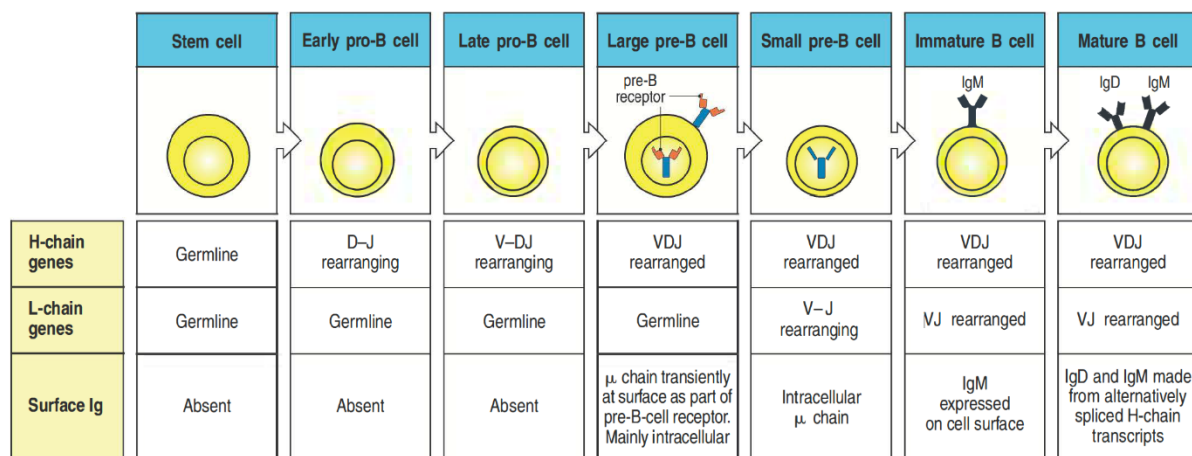


**Abbildung 2: V(D)J Rekombination der variablen Domäne eines Immunglobulins.** Die variable Domäne der leichten Kette wird aus zwei Gensegmenten (V und J) hergestellt (Mitte), während die variable Domäne der schweren Kette aus drei Gensegmenten (V, D und J) hergestellt wird (rechts). Ebenfalls dargestellt ist eine Übersicht, in welchem Stadium es sich um genomische oder rekombinierte DNA handelt bzw. wann die mRNA abgelesen wird und ein fertiges Protein entsteht (links) [2].

### 1.1.2.3 Entwicklung von B-Zellen

B-Zellen entstehen im Knochenmark und entwickeln sich aus pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen. Dabei stehen sie in Kontakt mit nicht-lymphoiden Stromazellen, welche die für die Entwicklung nötigen Signale liefern. Unter anderem wird durch die Stromazellen Interleukin (IL)-7 sekretiert, welches für das Wachstum und das Überleben der sich entwickelnden B-Zellen essentiell ist. Zunächst differenziert die Stammzelle in die gemeinsame lymphoide Vorläuferzelle (*common lymphoid progenitor*, CLP), woraus die erste Stufe der B-Zellen, die frühe pro-B-Zelle, entsteht (Abbildung 3). In diesem Stadium findet die Umlagerung der Gensegmente D und J<sub>H</sub> der schweren Kette statt, während die Umlagerung der Gensegmente V<sub>H</sub> und DJ<sub>H</sub> in der späten pro-B-Zelle erfolgt. Die erfolgreiche Rekombination von V<sub>H</sub>DJ<sub>H</sub> führt zur Expression einer kompletten schweren Kette, die zusammen mit einer *surrogate* (Ersatz) leichten Kette den pre-B-Zell-Rezeptor (pre-BCR) bildet. Durch diesen pre-BCR wird

getestet, ob die schwere Kette nach der Umlagerung funktional ist. Wird ein Signal durch einen fertigen pre-BCR an die Zelle geleitet, kann sich die späte pro-B-Zelle weiter zur großen pre-B-Zelle differenzieren, die proliferiert. Nach abgeschlossener Proliferation wird diese zur kleinen pre-B-Zelle, woraufhin die Umlagerung der Gen-segmente der leichten Kette beginnt. Nachdem die Gene beider Ketten rekombiniert sind, wird die B-Zelle zu einer unreifen B-Zelle, welche ein komplettes IgM auf ihrer Zelloberfläche exprimiert. In diesem Stadium wird die B-Zelle auf Autoreaktivität getestet. Erkennt die Zelle Selbst-Antigene, wird diese durch klonale Deletion eliminiert. Autoreaktive B-Zellen können ebenfalls den Zustand der Anergie annehmen, in welchem sie nicht mehr aktivierbar sind. Weist eine Zelle keine Autoreaktivität auf, entsteht eine reife B-Zelle, die sowohl IgM als auch IgD auf ihrer Oberfläche exprimiert. Diese verlässt das Knochenmark und wird über Blutgefäße in die Peripherie getragen [2, 13-15].



**Abbildung 3: Entwicklungsschritte einer B-Zelle.** Dargestellt sind die einzelnen Schritte der B-Zell-Entwicklung beginnend mit der Stammzelle bis hin zur reifen B-Zelle. Der jeweilige Status der Gene der schweren Kette und der Gene der leichten Kette ist angegeben. Ebenfalls wird gezeigt, ob und welche Igs auf der Zelloberfläche exprimiert werden [2].

#### 1.1.2.4 Aktivierung von B-Zellen

Naive B-Zellen zirkulieren nach Verlassen des Knochenmarks zwischen peripheren lymphoiden Geweben, dem Lymph- und dem Blutgefäßsystem, bis sie ihr spezifisches Antigen antreffen oder in die Apoptose übergehen. Immunglobuline auf der Oberfläche von B-Zellen fungieren als BCR. Dieser kann sowohl diverse Proteine als auch ganze Viruspartikel und Bakterienzellen durch Erkennung von Epitopen auf deren Oberfläche

binden. Die Antigen-Bindung führt zu zwei Reaktionen. Der BCR signalisiert dem Zellinneren, dass ein Antigen gebunden ist. Außerdem wird der BCR samt gebundenem Antigen internalisiert, woraufhin das Antigen in Peptide degradiert wird. Die Peptide wiederum werden durch den Haupthistokompatibilitäts-Komplex (*major histocompatibility complex*, MHC) Klasse II auf der B-Zell-Oberfläche präsentiert. Dies ist notwendig, da allein das Signal des BCRs nicht ausreicht, um die B-Zellen komplett zu aktivieren. Es wird ebenfalls die Antigen-spezifische Costimulation durch T-Helferzellen benötigt. T-Helferzellen, die durch das gleiche Antigen, aber nicht zwingend durch das gleiche Epitop, aktiviert wurden und die das im MHC Klasse II präsentierte Peptid erkennen, können so mit der B-Zelle interagieren und weitere Aktivierungssignale liefern. Die Erkennung des Peptid:MHC Klasse II Komplexes induziert in der T-Helferzelle die Synthese von Membran-gebundenem CD40 Ligand (CD40L) und die Sekretion von Effektormolekülen. Die Bindung von CD40L der T-Zellen an CD40 der B-Zelle fördert die B-Zell-Proliferation und die Expression von costimulatorischen Molekülen. Als drittes Signal dient die Sekretion von IL-4 durch die T-Zelle. Das Zytokin reguliert sowohl die B-Zell-Proliferation und die klonale Expansion als auch die Antikörper-Produktion. Nach einigen Runden der Proliferation differenziert sich die komplett aktivierte B-Zellen in einen Antikörper-sekretierenden Plasmablast. Dieser ist kurzlebig, kann sich immer noch teilen und exprimiert weiter Oberflächenmoleküle, die eine Interaktion mit T-Zellen erlauben. Nach einigen Tagen stoppen die Plasmablasten die Zellteilung und differenzieren sich terminal in Plasmazellen. Diese Plasmazellen können große Mengen an IgM sekretieren, um den infizierten Körper gegen Pathogene zu schützen [2, 15-17].

Um eine spätere und effektivere humorale Immunantwort zu gewährleisten, können aktivierte B-Zellen zusammen mit ihren assoziierten T-Zellen in einen primären lymphatischen Follikel einwandern. Im Follikel bilden sie einen *germinal center* (Keimzentrum, GC) aus, wodurch dieser Follikel zu einem sekundären lymphatischen Follikel wird. In einem GC findet extensive Zellteilung statt. B-Zellen durchlaufen dort einige wichtige Modifikationen. Einerseits findet die somatische Hypermutation statt, bei welcher in der variablen Domäne Punktmutationen eingeführt werden. Durch *affinity maturation* (Affinitätsreifung) werden diejenigen B-Zellen, die nach der somatischen Hypermutation eine sehr starke Affinität für ihr Antigen entwickelt haben, ausgewählt und weiter expandiert. Andererseits findet in GCs ein Klassenwechsel des Ig-Isotyps statt.

Dies dient der Erlangung neuer Effektorfunktionen, die die jeweiligen Isotypen ausüben können. Die modifizierten B-Zellen können anschließend entweder in B-Gedächtniszellen, oder in Plasmazellen differenzieren, die Immunglobuline mit höherer Antigen-Affinität und anderen Isotypen sekretieren können. Durch die GC-Reaktion kann das Immunsystem eine effektive und langlebige humorale Immunität gewährleisten [18, 19].

#### **1.1.2.5 Funktion von Antikörpern in der humoralen Immunantwort**

Im Rahmen der humoralen Immunantwort können durch Plasmazellen sekretierte Antikörper generell auf drei unterschiedliche Weisen agieren. Einerseits binden Antikörper an Viren, Bakterien oder sekretierte Toxine und können diese so neutralisieren und verhindern, dass sie in körpereigene Zellen eindringen. Andererseits schützen Antikörper ebenfalls vor Bakterien, die sich außerhalb der Zelle vermehren, indem sie die Aufnahme der Bakterien durch Phagozyten beschleunigen. Um die Phagozytose zu beschleunigen, wird die Oberfläche eines Pathogens mit Antikörpern *gecoatet*, was auch als Opsonisierung bezeichnet wird. Hierbei werden die gebundenen Antikörper durch Fc-Rezeptoren auf der Zelloberfläche von Phagozyten erkannt. Drittens, werden mit Antikörpern *gecoatete* Pathogene von Proteinen des Komplementsystems gebunden, die wiederum von Komplement-Rezeptoren auf Phagozyten gebunden und von diesen internalisiert werden. Andere Komponenten des Komplementsystems können Pathogene ebenfalls direkt lysieren, indem sie Poren in deren Membran bilden [2, 9].

#### **1.1.2.6 Regulatorische Funktion**

Eine suppressive Eigenschaft von B-Zellen wurde erstmals in den 1970er Jahren beschrieben, als herausgefunden wurde, dass B-Zellen die Entstehung von Hypersensitivitätsreaktionen unterdrückten [20]. Bei der Untergruppe von B-Zellen, die kollektiv als regulatorische B-Zellen bezeichnet werden, handelt es sich um B-Zellen mit vielen verschiedenen Phänotypen. Dabei wurden unter anderem B10 Zellen, Marginalzone (MZ) B-Zellen, CD138<sup>+</sup> Plasmazellen, Tim-1<sup>+</sup> B-Zellen und viele mehr identifiziert [21]. Diese können durch diverse Mechanismen pathogene T-Zellen supprimieren und zur Immun-Toleranz beitragen. Sehr oft werden regulatorische B-Zellen als IL-10 produzierende Zellen definiert, jedoch wurde bis heute noch kein Oberflächenmarker oder

Transkriptionsfaktor entdeckt, der für regulatorische B-Zellen einzigartig ist, um diese zu identifizieren [22].

Wahrscheinlich können regulatorische B-Zellen in jeder Stufe der B-Zell-Entwicklung und -Differenzierung entstehen, wenn die richtigen externen Stimuli vorhanden sind. Regulatorische B-Zellen wurden beispielsweise innerhalb der Populationen von unreifen B-Zellen, Gedächtnis B-Zellen und Plasmablasten entdeckt [22]. Die Tatsache, dass trotz vieler durchgeführter Gen Arrays noch kein Transkriptionsfaktor identifiziert werden konnte, lässt ebenfalls darauf schließen, dass sich potentiell jede B-Zelle in eine regulatorische B-Zelle entwickeln kann [21]. Die Entwicklung von regulatorischen B-Zellen, die zur Suppression von  $T_H17$  Antworten führt, hängt von der Anwesenheit von proinflammatorischen Zytokinen wie IL-1 und IL-6 ab [23]. Zumal diese Zytokine zur Polarisierung und Proliferation von  $T_H17$  Zellen führen [24], lässt vermuten, dass regulatorische B-Zellen in einer Immunantwort entstehen, um die Immun-Homöostase zu fördern. Ebenfalls wurde gezeigt, dass ein geringes Level an  $IFN\alpha$  die Differenzierung von regulatorischen B-Zellen fördert, während ein hohes Level an  $IFN\alpha$  diese inhibiert [25]. Daher scheinen moderate Level an Inflammation die Induktion und Aufrechterhaltung von regulatorischen B-Zellen zu fördern, was zur Wiederherstellung der Homöostase führt. Eine starke Inflammation hingegen inhibiert die Induktion von regulatorischen B-Zellen [22]. CD40 scheint in der Induktion von regulatorischen B-Zellen ebenfalls wichtig zu sein. Eine CD40-Stimulation erhöht die Produktion von IL-10 durch B-Zellen, während Mäuse mit einer CD40-Defizienz kein IL-10 produzieren und sich nicht von induzierten Krankheitsmodellen wie der Experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE) erholen können [26].

Es wurde gezeigt, dass regulatorische B-Zellen im Krankheitsmodell der Arthritis durch die Sekretion von IL-10  $T_H1$  und  $T_H17$  Zellantworten supprimieren. Zudem fördern regulatorische B-Zellen die Proliferation von regulatorischen T-Zellen und verstärken deren Expression des Transkriptionsfaktors FoxP3 [27]. Eine weitere Population an regulatorischen B-Zellen, die als B10 bezeichnet wird, kann die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen durch Monozyten auf IL-10-abhängige Weise supprimieren [28]. Es wurden  $CD138^{high}$  B-Zellen beschrieben, die große Mengen an IL-10 während einer Inflammation in EAE-Mäusen sekretieren und so die Krankheit eindämmen können [29].

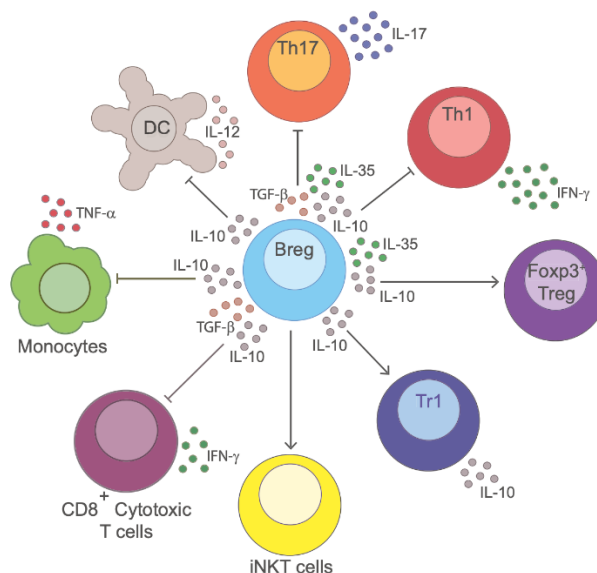


Ebenfalls wurden regulatorische B-Zellen identifiziert, die über die Produktion von IL-35 die Inflammation unterdrücken können. IL-35<sup>+</sup> regulatorische B-Zellen können die APC-Funktionen von Makrophagen, inflammatorischen T-Zellen und inflammatorischen B-Zellen negativ regulieren [30]. Zusätzlich können diese regulatorische T-Zellen expandieren [31].

Es wurde eine Population an regulatorischen B-Zellen beschrieben, die *transforming growth factor-β* (TGFβ) produziert. TGFβ kann CD4<sup>+</sup> T-Zellen dazu induzieren, sich in regulatorische T-Zellen zu differenzieren [32]. Zudem können aktivierte B-Zellen durch die Produktion von TGFβ Apoptose in CD4<sup>+</sup> T-Zellen und Anergie in CD8<sup>+</sup> T-Zellen induzieren [33, 34].

CD1d-exprimierende regulatorische B-Zellen können Inflammation unabhängig von IL-10 regulieren, indem sie mit invarianten natürlichen Killer T-Zellen (iNKT-Zellen) interagieren [35]. Diese wiederum sind mit der Immunregulation in Autoimmunerkrankungen assoziiert [36].

Abbildung 4 zeigt eine grobe Übersicht über die von regulatorischen B-Zellen sekretierten Zytokine und deren positiven bzw. negativen Einfluss auf unterschiedliche Zelltypen.



**Abbildung 4: Funktionen von regulatorischen B-Zellen.** Dargestellt ist eine Übersicht von einigen Funktionen, die regulatorische B-Zellen ausführen können. Sie können durch die Sekretion von IL-10, IL-35 und TGFβ die Funktion von CD8<sup>+</sup> T-Zellen, Monozyten, dendritischen Zellen, Th17 Zellen und Th1 Zellen supprimieren, während sie die Funktion von regulatorischen T-Zellen, Tr1 Zellen und iNKT-Zellen induzieren bzw. fördern können [21].

### 1.1.2.7 Immunglobulin E

In der GC-Reaktion können B-Zellen einen Klassenwechsel hin zur Produktion von IgE durchführen. IgE ist mit einer Konzentration von 50 bis 100 ng/ml das am wenigsten im Plasma vorkommende Immunglobulin [7, 37]. Zudem besitzt es von allen Immunglobulin-Isotypen die geringste Halbwertszeit mit weniger als einem Tag (verglichen mit der Halbwertszeit von IgG, die etwa 3 Wochen im Plasma beträgt) [37]. Rezeptor-gebundenes IgE kann hingegen für Monate bzw. die ganze Lebensspanne der Zelle auf der Oberfläche verweilen [38]. Der Fc-Teil von IgE wird durch die zwei Fc-Rezeptoren FcεRI (hoch affin) und FcεRII (CD23, niedrig affin) erkannt und gebunden. IgE spielt eine wichtige Rolle in der Expression des eigenen hoch affinen Rezeptors, da IgE FcεRI auf der Zelloberfläche stabilisiert [37]. Der hoch affine FcεRI wird auf der Zelloberfläche von Mastzellen und Basophilen Granulozyten exprimiert [39, 40], während der niedrig affine FcεRII vor allem auf B-Zellen, aber auch auf Monozyten, dendritischen Zellen und Eosinophilen Granulozyten vorhanden ist [37, 40]. Die Funktion von IgE in der adaptiven Immunantwort ist die Bekämpfung von multizellulären Parasiten und tierischen Giften [41]. Ebenfalls spielt IgE eine Rolle in allergischen Reaktionen, was in wenigen Fällen zu einer lebensbedrohlichen Anaphylaxie führen kann [39, 42]. IgE löst auch die schnellste Immunantwort in Hypersensitivitäts-Antworten aus [43]. Zusätzlich wurde ein Effekt von IgE in immunsuppressiven Antworten beobachtet. Hierbei führte die Quervernetzung von FcεRI einerseits zur Produktion des antiinflammatorischen Zytokins IL-10, während andererseits die T-Zell Proliferation *in vitro* unterdrückt wurde [37]. Des Weiteren fördern große Mengen an IgE die Entwicklung von reifen Basophilen Granulozyten im Knochenmark. Dies erfolgt durch die Erhöhung der Sensibilität von Vorläuferzellen gegenüber Wachstumsfaktoren [44].

### 1.1.3 Basophile Granulozyten

Basophile Granulozyten (zukünftig Basophile genannt) wurden erstmals 1879 von Paul Ehrlich identifiziert, da diese nach einer basischen Färbung eine besondere, von anderen Zellen unterschiedliche Erscheinung besaßen [45]. Mit weniger als einem Prozent von allen Leukozyten stellen die Basophilen die kleinste Granulozyten-Population im peripheren Blut dar [46]. Im Gegensatz zu anderen Granulozyten besitzen reife Basophile mit etwa zwei bis drei Tagen eine relativ kurze Lebensdauer [47, 48].

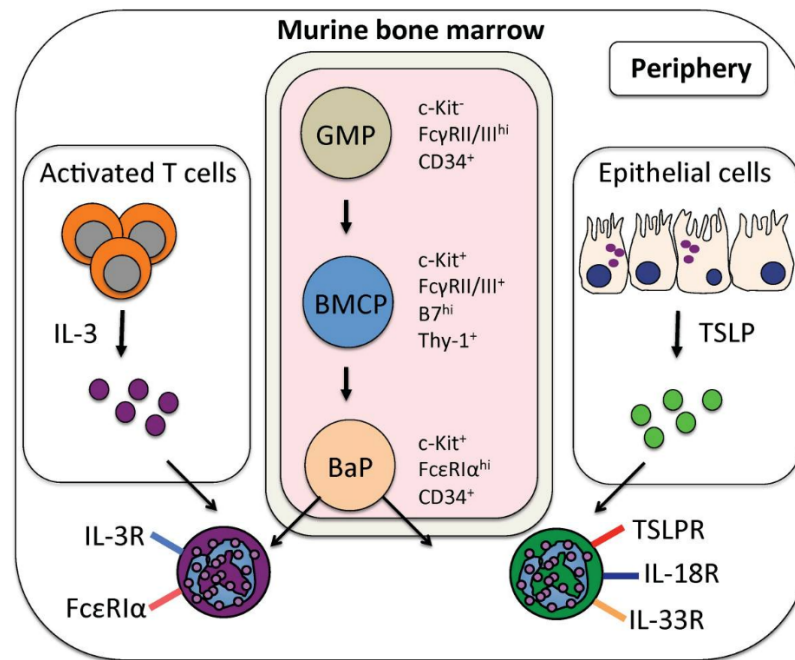
Sie tragen den hoch affinen Rezeptor FcεRI für IgE auf ihrer Zelloberfläche [39], dessen Expression direkt mit der Konzentration von IgE im Plasma korreliert [49]. Basophile besitzen zelluläre Granula, welche Histamine und Proteoglykane wie Chondroitinsulfat enthalten, die bei Aktivierung freigesetzt werden können. Sie sind in Hypersensitivitätsreaktionen und anaphylaktische Reaktionen involviert und können chronische allergische Inflammation fördern [50].

Basophile exprimieren auf ihrer Zelloberfläche CD40L. Durch die Interaktion von CD40L mit CD40 auf B-Zellen und die zusätzliche Sekretion von IL-4 und IL-3 können Basophile B-Zellen Aktivierungssignale liefern, die deren Differenzierung in Antikörperproduzierende Plasmazellen fördert. Dabei können sie einen Klassenwechsel zu IgE-produzierenden B-Zellen unabhängig von T-Zellen induzieren [51]. Ebenfalls unterstützen Basophile die Proliferation von B-Zellen und induzieren einen Helfer-Phänotyp in T-Zellen [52]. Zusätzlich sind Basophile für das Überleben von Plasmazellen *in vitro* und *in vivo* wichtig [53].

### 1.1.3.1 Entwicklung

Basophile entwickeln sich im Knochenmark aus Granulozyten-Monozyten-Vorläuferzellen (*granulocyte-monocyte progenitor cells*, GMP), die wiederum von hämatopoetischen Stammzellen abstammen (Abbildung 5). GMPs haben das Potential sich in verschiedene Zelllinien, wie Makrophagen, Eosinophile Granulozyten, Mastzellen und Basophile zu entwickeln. Diese können sich in Basophil-Mastzell-Vorläufer (*basophil-mast cell precursor*, BMCP) oder in Basophil-Vorläufer (*basophil precursor*, BaP) differenzieren. Die daraus entstandenen Basophilen verlassen erst das Knochenmark, wenn sie komplett gereift sind [54].

Es wird vermutet, dass die Entwicklung von Basophilen durch proinflammatorische Faktoren positiv reguliert werden kann. Es konnte gezeigt werden, dass es sich bei IL-3 um einen wichtigen Regulator für deren Entwicklung handelt [55]. Einen ebenfalls wichtigen Faktor für die Basophil-Entwicklung stellt das von Epithelzellen stammende *epithelial cell-derived cytokine thymic stromal lymphopoietin* (TSLP) dar [56].



**Abbildung 5: Entwicklungsschritte von Basophilen.** Dargestellt sind die einzelnen Schritte der Entwicklung von Basophilen. Granulozyten-Monozyten-Vorläuferzellen (GMP) im Knochenmark reifen zu Basophil-Mastzell-Vorläufern (BMCP), welche wiederum in Basophil-Vorläufer (BaP) differenzieren. Das von T-Zellen stammende Zytokin IL-3 und das von Epithelzellen stammende TSLP fördern einzelne Phasen der Basophilen-Entwicklung. Nach der Reifung von Basophilen im Knochenmark betreten diese die Peripherie [57].

### 1.1.3.2 Aktivierung und Effektorfunktionen

Basophile können durch viele unterschiedliche Signale, wie Antikörper, Zytokine, Proteasen oder direkt durch Antigene aktiviert werden.

Durch IgE-vermittelte Kreuzvernetzung von FcεRI werden Basophile aktiviert und sekretieren unter anderem Histamine und Leukotriene [46]. Es wurde gezeigt, dass Basophile als Antwort auf IgG-Antigen-Komplexe Anaphylaxie fördern [58]. Zusätzlich zur Aktivierung durch IgE und IgG können Basophile auch durch IgD aktiviert werden. In diesem Fall sekretieren Basophile nach Erkennung von IgD-Antigen-Komplexen antimikrobielle Peptide [59].

Das Zytokin IL-3 kann Basophile direkt und IgE-unabhängig aktivieren, woraufhin Basophile IL-4 und IL-6 sekretieren [46]. Zudem werden Basophile durch IL-18 aktiviert [60].

Zusätzlich zur Aktivierung durch Immunglobuline und Zytokine lassen sich Basophile ebenfalls durch Proteasen aktivieren. Hierbei konnten von Parasiten stammende Proteasen und die Protease Papain die Produktion von Typ-2-Zytokinen durch Basophile fördern [61].

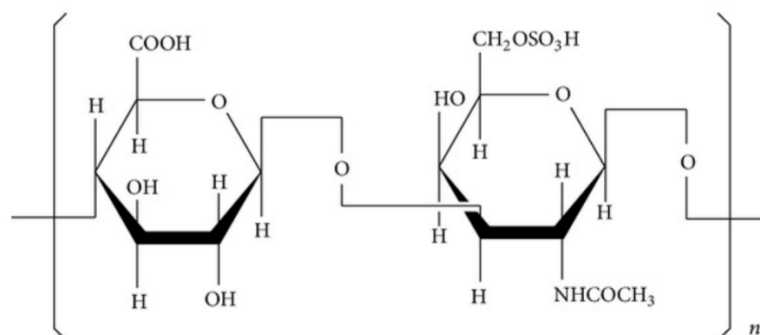
Basophile können außerdem in der Abwesenheit von Antigen-spezifischem IgE auf „Super-Antigene“ reagieren. Beispielsweise führt das Glykoprotein IPSE/ $\alpha$ -1, welches von *Schistosoma* stammt, zur Sekretion von IL-4 durch Basophile [62].

## 1.2 Chondroitinsulfat

Bei Chondroitinsulfat (CS) handelt es sich um ein natürlich vorkommendes Polysaccharid, das der Familie der Glykosaminoglykane (GAG) angehört [63]. CS wird in Knorpeln, der extrazellulären Matrix und intrazellulären Granula gefunden [64].

### 1.2.1 Allgemeiner Aufbau

GAGs stellen lange, lineare und hoch negativ geladene heterogene Polysaccharid-Makromoleküle dar [64]. Die Polysaccharide bestehen aus sich unterschiedlich häufig wiederholenden Disaccharid-Einheiten, wobei  $\beta$ -Glucuronsäure mit *N*-Acetyl-D-Galactosamin verbunden ist (Abbildung 6) [65, 66]. Das Disaccharid besitzt am *N*-Acetyl-D-Galactosamin eine kovalent gebundene Sulfat-Gruppe [63], die entweder an Position 4 oder 6 sitzt. Befindet sich die Sulfat-Gruppe an Position 4, handelt es sich um Chondroitinsulfat A (CSA), befindet sich die Sulfat-Gruppe an Position 6, spricht man von Chondroitinsulfat C (CSC) [65].



**Abbildung 6: Chemische Strukturformel von Chondroitinsulfat C.** Chondroitinsulfat C (CSC) stellt ein Polysaccharid dar, das aus sich wiederholenden Disaccharid-Einheiten besteht. Dabei ist  $\beta$ -Glucuronsäure mit *N*-Acetyl-D-Galactosamin verbunden. Die kovalent an Position 6 von *N*-Acetyl-D-Galactosamin gebundene Sulfat-Gruppe charakterisiert CSC [67].

Bei Chondroitinsulfat-Proteoglykanen handelt es sich um Proteoglykane, die aus einem Protein-Kern und einer Chondroitinsulfat-Seitenkette bestehen. Diese sind unter anderem ein wichtiger Bestandteil der extrazellulären Matrix des zentralen Nervensystems (ZNS) [68].

### 1.2.2 Funktion / Wirkung

Die konventionelle strukturelle Funktion von CS ist der Aufbau von extrazellulärer Matrix und die Formation von Organen und Geweben, wie Knorpel und Knochen [69]. Daneben sind CS bekannt für ihre immunmodulatorische Funktionen; bei chronischen Krankheiten werden sie als antiinflammatorische Behandlung eingesetzt [70, 71].

Basierend auf der strukturellen Diversität in Kettenlänge und Sulfat-Rest-Mustern besitzen CS spezifische Funktionen in Zell-Adhäsion, Bildung von neuronalen Netzwerken und Zellteilung [66]. Aufgrund der hohen negativen Ladung kann CS mit Proteinen der extrazellulären Matrix interagieren und hilft bei der Regulation von zellulären Aktivitäten [63]. CSs können mit einer Vielzahl an Zytokinen, Chemokinen, Wachstumsfaktoren und Membranproteinen, wie Integrinen und Selektinen, interagieren [72]. Ebenfalls wurde gezeigt, dass CSC B-Zellen *in vitro* aktiviert und CD138<sup>+</sup> B-Zellen *in vivo* expandiert [72].

Die Behandlung von symptomatischer Osteoarthritis (OA) mit CS führt zu einer verminderten Entwicklungs-Geschwindigkeit der Krankheit [73]. Diese ist auf die antiinflammatorische Aktivität, die Stimulation der Synthese von Proteoglykanen und Hyaluronsäure und die Inhibierung der Synthese von proteolytischen Enzymen, die Knorpel-Matrix zerstören, zurückzuführen [74]. Außerdem spielt CS eine Rolle in der Bildung von neuen Knochen und Knorpeln [75].

CSE agiert als Stimulator für Neuronen-Wachstum, während CSA das Wachstum negativ beeinflusst. Axonale Regeneration kann zudem durch CSC gefördert werden [76].

Eine Rolle von CSE in der Metastasen-Bildung wurde ebenfalls publiziert. Hierbei wird vermutet, dass CSE-enthaltende Strukturen an der Bildung von pulmonalen Metastasen bei *Lewis lung carcinoma* (LLC) beteiligt sind [76].

### **1.3 Multiple Sklerose (MS) beim Menschen**

Bei der Multiplen Sklerose (MS) handelt es sich um eine chronisch-inflammatorische demyelinisierende Autoimmunerkrankung des Zentralen Nervensystems (ZNS) [77]. Die ersten veröffentlichten Studien zum Krankheitsbild der MS lieferten Carswell und Cruveilhier in den 1830er Jahren. In diesen beschrieben sie Läsionen in Teilen des Rückenmarks und im Gehirn von Patienten mit neurologischen Symptomen, wie Paresen der Beinmuskulatur und Koordinations- und Gleichgewichtsstörungen [78]. Die erste überzeugende und detaillierte Beschreibung der histologischen und klinischen Befunde wurde 1868 von Chacrot publiziert. Bei den beschriebenen charakteristisch auftretenden Symptomen handelte es sich um Nystagmus, Intentionstremor und skandierende Sprache [78]. Erst nach der Durchführung von Tierexperimenten wurde 1930 festgestellt, dass es sich bei der MS um eine Autoimmunerkrankung handelt [78].

#### **1.3.1 Epidemiologie**

Die MS gilt heutzutage als die häufigste chronisch-inflammatorische Erkrankung des ZNS in der westlichen Welt [77]. Die Prävalenz der Krankheit in Deutschland im Jahr 2010 betrug 289/100.000. Es waren in allen Altersklassen Frauen häufiger betroffen als Männer, womit das Geschlechterverhältnis bei 2,3:1 lag. Die Patienten waren im Mittel 49,4 Jahre alt [79]; jedoch manifestiert sich die MS bei einem Großteil der Fälle zwischen dem 20. und 30. Lebensjahr [80].

#### **1.3.2 Ätiologie**

Die genaue Ursache der Erkrankung an MS konnte bisher noch nicht eindeutig geklärt werden. Allerdings wird angenommen, dass der Ausbruch der MS multifaktoriell bedingt ist. In einer Studie konnten bei 20 % der Patienten eine familiäre Häufung der Erkrankung an MS festgestellt werden, wobei diese abhängig vom Verwandtschaftsgrad war. Das Risiko einer Erkrankung lag bei Geschwistern bei 5 %, während das Risiko bei Verwandten dritten Grades bei 1 % lag. Bei monozygoten Zwillingen dagegen lag das Risiko einer Erkrankung bei 25 % [81]. Ebenfalls wurde eine Assoziation zwischen der MS und Allelen von MHC identifiziert [82]. Als eine weitere mögliche Ursache der MS-

Erkrankung werden Virusinfektionen vermutet. Es wird vor allem eine Korrelation mit dem Epstein-Barr-Virus (EBV) vermutet, da der Antigen-Titer für das Virus bei MS-Patienten deutlich höher liegt, als bei Kontrollen [83]. Eine höhere Prädisposition geht außerdem mit dem Tabakrauchen einher [84]. Zudem werden Umweltfaktoren mit der Erkrankung an MS assoziiert. Hierbei werden in Regionen mit höherer geographischer Breite mehr Erkrankungsfälle registriert. Diese Assoziation wird mit der Sonnenlicht-Exposition und dem Vitamin-D Haushalt erklärt, da sowohl eine hohe Exposition gegenüber Sonnenlicht als auch eine hohe Serumkonzentration von 25-Hydroxyvitamin D einen protektiven Effekt besitzen sollen [85, 86].

### 1.3.3 Pathogenese

Die Immunpathogenese der MS ist bis heute nicht vollständig verstanden. Es wird vermutet, dass autoreaktive T-Zellen in den peripheren Lymphknoten durch unbekannte Auslöser aktiviert werden. Als Auslöser könnte beispielsweise die molekulare Mimikry zählen. Hierbei werden T-Zellen aktiviert, die ein fremdes Antigen erkennen, das eine Sequenzhomologie mit Selbst-Epitopen der Myelinscheide teilt. Nach Aktivierung können die T-Zellen mit diesen Selbst-Epitopen kreuzreagieren und so eine Autoimmunreaktion induzieren [87]. In MS-Patienten wurden beispielsweise Myelin-Basisches Protein (MBP)-spezifische T-Zellen und Antikörper nachgewiesen, die mit EBV-Antigenen kreuzreagierten [88, 89]. Im Gegensatz zu naiven T-Zellen sind aktivierte T-Zellen in der Lage, die Blut-Hirn-Schranke zu passieren, da unter inflammatorischen Bedingungen die Expression von Adhäsionsmolekülen und Chemokinen auf den Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke induziert wird [90]. Dendritische Zellen können den migrierten T-Zellen ZNS-Antigene präsentieren [91]. Durch die Reaktivierung der T-Zellen kommt es zur klonalen Expansion und Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen, wodurch weitere Immunzellen, wie B-Zellen und Makrophagen ins ZNS rekrutiert werden. Infolgedessen werden unter anderem Sauerstoffradikale wie Stickstoffmonoxid durch Makrophagen ausgeschüttet. Außerdem kommt es und zur Einleitung von proteolytischen Reaktionen des Komplementsystems, welche durch von B-Zellen sekretierte Antikörper induziert werden. Durch die Reaktionen des Immunsystems gegen Myelin-Proteine wird folglich die Myelinschicht zerstört [92].



### 1.3.4 Symptomatik und Verlaufsformen

Die Symptomatik der MS beinhaltet neben zentralen Paresen, Sehstörungen und Sensibilitätsstörungen auch zerebelläre Symptome wie Miktionsstörungen, Ataxie und psychopathologische Symptome. Jedoch kann die Symptomatik für jeden individuellen Fall sehr unterschiedlich ausfallen, da die Symptome von Ort und Ausmaß der Schädigung abhängen [93]. Die Störungen lassen sich auf herdförmige Läsionen zurückführen, die durch perivaskuläre Infiltrationen von Immunzellen, sowie Demyelinisierungen, Verlust von Myelin-produzierenden Oligodendrozyten und eine direkte Schädigung von Nervenfasern charakterisiert sind. Diese Läsionen lassen sich durch die Magnetresonanztomographie als scharf abgrenzbare Zonen darstellen. Sie können zum Teil in der grauen Substanz lokalisiert werden, befinden sich vor allem aber in der weißen Substanz des ZNS, dabei vorzugsweise in periventrikulären Regionen, im Hirnstamm, in optischen Nerven und im Rückenmark [94].

Die häufigste Form der MS stellt mit etwa 85-90 % der Patienten der schubförmig-remittierende Verlauf dar. In diesem Fall erleiden die Patienten voneinander abgrenzbare Krankheitsschübe, bei denen diverse Symptome auftreten, die sich anfänglich noch vollständig oder aber auch nur partiell wieder zurückbilden können. Über Jahre hinweg kann diese Form in eine sekundär-progressive Form übergehen, bei welcher es zu einer langsamen Zunahme der neurologischen Dysfunktion kommt. Bei dieser Form werden vor allem fokal-inflammatorische demyelinisierte Läsionen in der weißen Substanz beobachtet. Die primär progrediente Form der MS kommt mit etwa 10-15 % der Patienten deutlich seltener vor. Diese Form der MS ist durch eine von Beginn an vorhandene schleichende Progression ohne Rückbildung der neurologischen Defizite charakterisiert. Pathologisch weist die primär progrediente Form der MS einen diffusen axonalen Schaden mit einer globalen Beeinträchtigung des Gehirns auf [93-95]. Die klinische Remission der Symptome beim schubförmig-remittierenden Verlauf kann mit einer Rückbildung der Entzündung, sowie einer Wiederherstellung der Erregungsleitung durch Remyelinisierung erklärt werden. Im Gegensatz dazu ist eine Schädigung von Nervenfasern irreversibel und führt zur Persistenz der neurologischen Dysfunktion [96].

### 1.3.5 Therapieansätze

Das Ziel der MS-Therapie ist es pathologische Prozesse zu unterdrücken, protektive Prozesse zu unterstützen und das Fortschreiten der Krankheit möglichst zu verhindern. Allgemein umfassen die möglichen Therapieansätze die Immunsuppression, die Immunmodulation und die gezielte Depletion bestimmter Immunzellen. Dabei wird zwischen drei Behandlungsansätzen unterschieden: der Behandlung eines akuten Schubes, der symptomatischen Behandlung und der immunmodulatorischen Langzeitbehandlung [97].

Die Behandlung eines akuten Schubes soll die funktionelle Remission der neurologischen Defizite beschleunigen, die Stärke der Attacke lindern und bleibende Schäden möglichst verhindern oder gering halten [97]. Zur Behandlung werden hoch dosierte Glukokortikosteroide, wie Methylprednisolon, für drei bis fünf Tage verabreicht. Diese können durch ihre entzündungshemmende und immunsuppressive Funktion Symptome reduzieren, motorische Funktionen verbessern und die Dauer der akuten Schübe verringern [98]. Sollte die Behandlung mit Glukokortikosteroiden nicht wirken, kann ebenfalls eine Plasmapherese angewendet werden [97, 99].

Die symptomatische Behandlung dient vor allem der Aufrechterhaltung der Lebensqualität und Selbstständigkeit von Patienten mit MS. Für die Behandlung werden medikamentöse und nicht-medikamentöse Behandlungsansätze aus Bereichen der Physiotherapie, Ergotherapie, Logopädie oder Psychotherapie kombiniert. Ebenfalls werden sekundäre Symptome wie beispielsweise Infektionen des Harnwegs, die durch Blasen-Dysfunktionen bedingt sind, behandelt [97].

Für die Durchführung einer immunmodulatorischen Langzeitbehandlung werden je nach Verlaufsform des Patienten und je nach Ansprechen auf eine Therapie unterschiedliche Medikamente eingesetzt. Bereits seit den 90er Jahren werden Interferon (IFN)- $\beta$  und Glatirameracetat (GA) verwendet. In klinischen Studien konnten diese Medikamente eine Reduktion von akuten Schüben um 30 % erreichen. Zudem konnte eine Reduktion an Läsionen im ZNS beobachtet werden [100]. Die exakte Wirkweise von IFN $\beta$  ist nicht komplett verstanden, ist aber wahrscheinlich auf die Herunterregulierung von MHC Klasse II Komplexen auf APCs, die Induktion der Produktion von IL-10 durch T-Zellen und die Inhibition der T-Zell-Migration zurückzuführen [101]. Bei GA handelt es sich um einen heterogenen Mix aus synthetischen Polypeptiden; der

genaue Mechanismus der therapeutischen Wirkung ist jedoch nicht bekannt. Es wird vermutet, dass GA-spezifische Suppressor T-Zellen induziert werden [102]. Eine weitere Behandlungsmöglichkeit stellen monoklonale Antikörper dar. Natalizumab ist ein monoklonaler Antikörper, der  $\alpha 4$  Integrin blockiert, welches für die Migration von Lymphozyten durch die Blut-Hirn-Schranke wichtig ist. Klinische Studien zeigten eine signifikante Reduktion von akuten Schüben durch die Behandlung mit Natalizumab. Als Nebenwirkung waren Patienten allerdings anfällig für eine progressive multifokale Leukenzephalopathie, die durch das JC-Virus ausgelöst wird [103]. Einen weiteren monoklonalen Antikörper stellt Alemtuzumab dar, welcher  $CD52^+$  Immunzellen depletiert. Eine Therapie mit diesem Antikörper konnte akute Schübe ebenfalls signifikant reduzieren [97]. Der monoklonale Antikörper Ocrelizumab wird als das heute effektivste Medikament gegen die MS angesehen. Dieser anti-CD20 Antikörper depletiert sowohl B-Zellen als auch eine  $CD20^+$  T-Zell Unterpopulation. Behandlung von Patienten mit Ocrelizumab zeigte eine verminderte Schub-Rate und weniger Läsionen im ZNS. Des Weiteren wurde ein verlangsamtes Fortschreiten von Krankheitssymptomen bei Patienten mit primärer progredienter MS beobachtet [104, 105]. Zusätzlich ist die Gabe von oral einzunehmenden Medikamenten wie Fingolimod, Terifluomid und Dimethylfumarat möglich. Die Behandlung mit Fingolimod führt zu einer Reduktion an Lymphozyten im Blut, die darauf zurückzuführen ist, dass Lymphozyten zurück in sekundäre lymphoide Organe wandern [100]. Terifluomid hingegen inhibiert die Biosynthese von Pyrimidin in aktivierten Lymphozyten, wodurch deren Proliferation blockiert wird [106]. Die genaue Wirkweise von Dimethylfumarat ist nicht geklärt. Es wird vermutet, dass diese auf die Inhibierung von NF $\kappa$ B, eine Verschiebung des Zytokinprofils in die anti-inflammatorische Richtung und die Induktion von Apoptose in Lymphozyten zurückzuführen ist [100].

#### **1.4 Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis (EAE) als Maus Modell der humanen MS**

Die Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis (EAE) ist ein Maus Modell für die MS und stellt eines der am intensivsten untersuchten Maus-Modelle dar [107]. EAE wurde zu ersten Mal 1933 von Rivers beschrieben, der beobachtete, dass sich eine akute Enzephalomyelitis teilweise nach einer Tollwut-Impfung entwickelte. Diese

Enzephalomyelitis konnte er in Affen reproduzieren, indem er Gehirn-Extrakte aus Hasen in Affen injizierte [108]. Diese Ergebnisse konnten daraufhin verwendet werden, um EAE in Mäusen, Ratten und anderen Spezies auszulösen [109].

Die EAE wird induziert, indem eine Immunantwort gegen Antigene des ZNS ausgelöst wird. Dabei wird eine durch T-Helferzellen vermittelte Autoimmunerkrankung ausgelöst, die durch eine Infiltration von T-Zellen, Monozyten und Neutrophilen Granulozyten ins ZNS und eine lokale Inflammation charakterisiert ist. Die Inflammation resultiert in primärer Demyelinisierung und Schädigung von Axonen und einer progressiven Paralyse der Beine bzw. des Schwanzes. Daher stellt die EAE ein passendes Modell für die Untersuchung der humanen MS dar [110].

#### 1.4.1 Methoden der Immunisierung

Generell werden Mäuse, die im Modell der EAE verwendet werden, durch die Injektion von Selbst-Antigenen bzw. Selbst-reaktiven Zellen immunisiert. Daneben existieren ebenfalls transgene Maus-Stämme, welche spontan die Krankheit entwickeln können. EAE kann allgemein auf zwei unterschiedliche Weisen induziert werden; durch eine aktive Immunisierung mit Myelin-Peptiden, oder durch eine passive Immunisierung durch den adoptiven Transfer von Myelin-spezifischen T-Zellen in naive Mäuse [111].

Die aktiv induzierte EAE stellt das am einfachsten zu induzierende Modell dar und liefert schnelle und robuste Ergebnisse [112]. Bei der aktiv induzierten EAE werden Mäuse (oder andere Tiere) mit einem Myelin-verwandtem Antigen oder Peptid, wie *myelin basic protein* (MBP), Proteolipid-Protein (PLP) oder Myelin Oligodendrozyten Glykoprotein (MOG) immunisiert [113, 114]. Das Myelin-Peptid liegt in einer Emulsion mit Komplettem Freund's Adjuvant (*complete Freund's adjuvant*, CFA) vor und wird durch subcutane Injektion appliziert [111]. CFA fördert einerseits eine Immunantwort durch T-Helferzellen, während es andererseits die Permeabilität der Blut-Hirnschranke erhöht [115]. Der größte Nachteil von CFA ist hierbei, dass das Immunsystem durch das Adjuvans global aktiviert wird und somit keine eindeutigen Vergleiche mit Immunreaktionen von naiven Mäusen gezogen werden können [112]. Zusätzlich wird die zweimalige Injektion von Pertussis Toxin, einem Virulenzfaktor von *Bordetella Pertussis*, zur Induktion benötigt. Das Toxin kann durch noch nicht komplett aufge-

klärte Prozesse den Eintritt von Immunzellen in das ZNS erleichtern und die Proliferation und Zytokin-Produktion von T-Zellen fördern [111]. Durch die Immunisierung mit Myelin-Peptiden werden Myelin-spezifische T-Zellen aktiviert, die expandieren und als differenzierte Effektorzellen durch die Blut-Hirn-Schranke ins ZNS einwandern. Dort werden sie durch APCs reaktiviert, sekretieren proinflammatorische Zytokine und rekrutieren weitere Immunzellen [111]. Dies führt letztlich zu Gewebeschäden und Demyelinisierung, welche der Pathologie der humanen MS ähnlich sind [116].

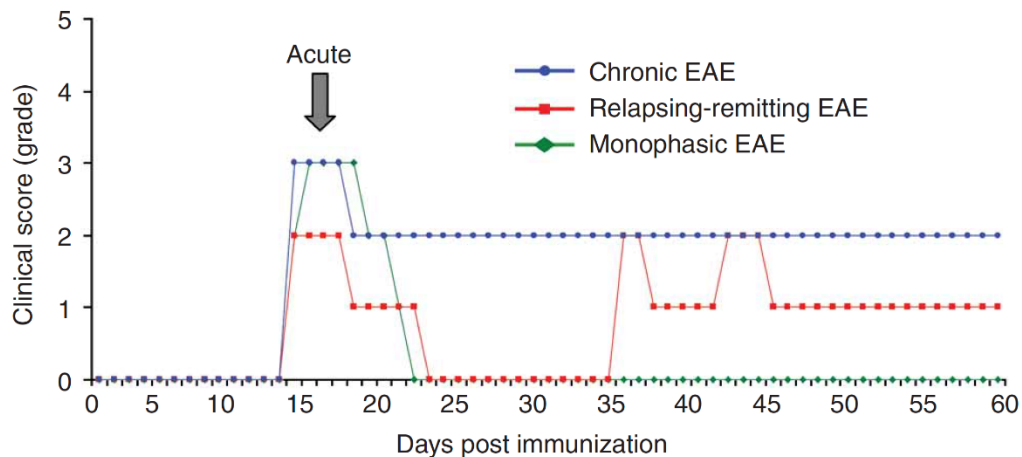
Die zweite Möglichkeit, eine EAE zu induzieren, ist die passive Immunisierung durch den adoptiven Transfer von Myelin-spezifischen T-Zellen. Zu diesem Zweck werden T-Zellen aus der Milz und den Lymphknoten von Mäusen isoliert, die etwa 10 Tage vorher durch Myelin-Antigene zusammen mit CFA aktiv immunisiert wurden. Die isolierten T-Zellen werden anschließend *in vitro* mit Myelin-Antigenen und verschiedenen Proliferationsfaktoren restimuliert. Nachdem die aktivierten T-Zellen in die Empfänger-Maus injiziert wurden, entsteht die EAE durch Migration der aktivierten T-Zellen in das ZNS [117]. Dort werden sie, wie im Modell der aktiven Immunisierung, durch APCs reaktiviert, sekretieren proinflammatorische Zytokine und rekrutieren weitere Immunzellen [111]. Dies führt zu Gewebeschäden und Demyelinisierung [116]. Der größte Vorteil dieser Methode besteht darin, die isolierten Zellen vor dem adoptiven Transfer zu markieren, um deren Lokalisierung und Aktivität beobachten zu können. Zudem können bei dieser Methode die T-Zellen so kultiviert werden, dass sie sich in unterschiedliche Subpopulationen differenzieren [111, 117].

Generell treten die ersten Symptome der EAE etwa 9 bis 10 Tage nach der Immunisierung auf und es kommt durch die Schäden und Demyelinisierung im ZNS zu funktionellen Defiziten, wie einer Lähmung von Schwanz und Beinen [113]. Das Modell der EAE reflektiert eine Inflammation, die vor allem im Rückenmark lokalisiert ist [116].

#### **1.4.2 Verlaufsformen der EAE**

Ob die EAE einen monophasischen (akuten), einen chronischen oder einen schubförmig-remittierenden Verlauf annimmt, hängt vom Stamm, dem immunogenen Protein und der Verwendung von Pertussis Toxin ab (Abbildung 7) [116]. Beim monophasischen Verlauf kommt es zu einem akuten Schub, nach welchem die Symptome der Versuchstiere nahezu komplett remittieren. Der chronische Verlauf ist ebenso durch

einen akuten Schub charakterisiert, welcher sich jedoch nur partiell zurückbildet, während einige Symptome dauerhaft persistieren. Bei der schubförmig-remittierenden Verlaufsform erleiden die Versuchstiere einen ersten akuten Schub, der wieder komplett remittieren kann. Daraufhin kann es zu erneuten Schüben kommen, die wiederum nicht komplett remittieren und einige Symptome persistieren können [116].



**Abbildung 7: Unterschiedliche Verlaufsformen der EAE anhand des klinischen EAE Scores.** Dargestellt sind die drei möglichen Verlaufsformen der EAE anhand des klinischen Scores: chronischer Verlauf (blau), schubförmig-remittierender Verlauf (rot) und monophasischer Verlauf (grün). Der klinische Score wurde dabei mittels einer Score-Skala, die von 0 bis 5 reicht, erhoben [116].

Die in dieser Arbeit verwendete aktive Induktion der EAE durch die Immunisierung mit MOG<sub>35-55</sub>-Peptid zusammen mit CFA und zweimaliger Injektion von Pertussis Toxin führt zur Ausbildung einer chronischen EAE, bei der die ersten Symptome etwa an Tag 9 bis 10 auftreten [118].

### 1.4.3 Einfluss von B-Zellen in der EAE

#### 1.4.3.1 Pathogener Einfluss von B-Zellen

Obwohl die Induktion der EAE eine starke T-Zell-vermittelte Immunantwort benötigt, spielt die humorale Immunität ebenfalls eine wichtige Rolle in der Pathogenese der Krankheit [110]. B-Zellen agieren bei der EAE durch die Sekretion von Antikörpern, Antigen-induzierte Effektorfunktionen und die Stimulation von T-Zellen durch Antigen-Präsentation [119]. Dies wird deutlich durch den monoklonalen Antikörper Rituximab

gezeigt, der mit Ausnahme von Plasmazellen alle B-Zellen depletiert [120]. Die Behandlung von MS-Patienten mit Rituximab führte zu weniger neuen Läsionen und zu einer Reduktion an neuen Schüben [121].

Der Einfluss von Antikörpern wurde demonstriert, als in Geweben von MS-Patienten *post mortem* Myelin-spezifische Antikörper in Läsionen identifiziert wurden [110]. Zudem werden Läsionen häufig mit Antikörper- und Komplementablagerungen assoziiert [122] und eine Studie konnte zeigen, dass nur Patienten mit Läsionen, die solche Ablagerungen beinhalteten, von Plasmapheresen profitierten [123].

Da es sich bei B-Zellen um potente APCs handelt, können B-Zell-T-Zell-Interaktionen sowohl die Expression von costimulatorischen Molekülen und Zytokinen als auch Effektorfunktionen von T-Zellen modulieren [110]. In der EAE wurde gezeigt, dass B-Zellen für die Entwicklung einer EAE essentiell sind, wenn Mäuse mit komplettem MOG-Protein immunisiert wurden, nicht aber, wenn sie mit MOG-Peptiden immunisiert wurden. Dies lässt darauf schließen, dass die Prozessierung von Proteinen durch B-Zellen und die Präsentation von Peptiden über MHC Klasse II in der Entwicklung der MS wichtig sein könnte. Beispielsweise enthalten Läsionen von MS-Patienten häufig Myelinfragmente mit völlig intaktem Protein [124].

#### 1.4.3.2 Suppressiver Einfluss von B-Zellen

Ein erster suppressiver Einfluss von B-Zellen im Modell der EAE wurde durch die Verwendung von B-Zell-defizienten  $\mu$ MT-Mäusen beobachtet. In einem Experiment wurde durch die Immunisierung mit MBP sowohl in *wildtyp* Mäusen als auch in  $\mu$ MT-Mäusen eine EAE induziert. *Wildtyp* Mäuse entwickelten eine monophasische EAE, die sich wieder erholte, während  $\mu$ MT-Mäuse in Abwesenheit von B-Zellen eine chronische EAE entwickelten, die sich nicht zurückbildete [125]. Der positive Einfluss von B-Zellen auf den Verlauf einer EAE wurde neben der Verwendung von *knock-out* Mäusen auch durch eine  $\alpha$ CD20-Antikörper-induzierte Depletion von B-Zellen in Mäusen gezeigt. Mäuse mit depletierten B-Zellen zeigten einen deutlich schwereren EAE-Verlauf. Des Weiteren war eine erhöhte Anzahl an ZNS-infiltrierenden  $CD4^+$  T-Zellen und deren Produktion von proinflammatorischen Zytokinen zu erkennen [126]. In einer weiteren Studie wurde ein positiver Effekt durch die Sekretion des antiinflammatorischen Zytokins IL-10 durch B-Zellen beschrieben, aufgrund dessen die proinflammatorische

Zytokin-Antwort vermindert wurde [26]. Ebenfalls wird vermutet, dass B-Zellen durch die Interaktion mit T-Zellen mittels costimulatorischer Moleküle wie B7 Foxp3-exprimierende regulatorische T-Zellen rekrutieren, die einen supprimierenden Effekt auf die Inflammation haben [127]. Von B-Zellen sekretierte Antikörper können auch einen modulatorischen Effekt auf die Immunreaktion besitzen. Die Behandlung von EAE-immunisierten Mäusen mit intravenösen Immunglobulin (IVIg), das vor allem aus IgG besteht, zeigte sowohl eine Verbesserung des Krankheitsverlaufs als auch eine geringere Inflammation des ZNS. Die Verbesserung durch IVIg ist wahrscheinlich auf eine Modulation der Makrophagen-Funktion und eine Inhibition des Komplementsystems durch die Igs zurückzuführen [128].

#### 1.4.4 Einfluss von Chondroitinsulfat in der EAE

Bisher wurden nur wenige Studien publiziert, in denen Mäuse mit einer induzierten EAE mit CS behandelt wurden.

Es wurde gezeigt, dass die Injektion von CSA in EAE-induzierte Mäuse die Krankheitssymptome deutlich verstärkte im Vergleich zur Kontrolle [129]. Wurde im Gegensatz dazu ein durch die Chondroitinase ABC degradiertes CSA-Produkt EAE-induzierten Mäusen injiziert, führte dies zu einer starken Suppression der Krankheit [68, 129]. Während CSA die Infiltration von Lymphozyten ins Gehirn verstärkte, blockierte das degradierte CSA-Produkt die Migration von Lymphozyten [129]. In Ratten hatte die Behandlung mit CSA keinen Effekt auf den Verlauf einer passiven EAE [130]. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass die CSA Seitenkette von CS-Proteoglykanen in Mäusen mit EAE im Rückenmark hochreguliert waren. Diese Hochregulation erhöhte zusätzlich die Expression von proinflammatorischen Zytokinen durch Makrophagen [131].

Wurde eine EAE in Mäusen induziert, denen ein wichtiges Enzym für die Synthese von CS fehlte, verlief die EAE im Vergleich zur Kontrolle milder [132].

Miyamoto und Kollegen induzierten aktiv eine EAE in Chondroitin 6-O-Sulfattransferase 1-defizienten ( $C6ST1^{-/-}$ ) Mäusen.  $C6st1$  modifiziert CS hin zu CSC über das Anbringen eines Sulfatrestes an Position 6 von *N*-Acetyl-D-Galactosamin. Im Vergleich zu *wildtyp* Mäusen entwickelten  $C6st1^{-/-}$  Mäuse einen schwereren Krankheitsverlauf. Das gleiche Bild zeigte sich auch in einer passiv induzierten EAE. Eine EAE-Induktion in  $C6ST1$  transgenen Mäusen, welche  $C6ST1$  überexprimieren, führte zu



einem milderen Verlauf, als in *wildtyp* Mäusen. Demnach konnte die Anwesenheit von CSC die Pathogenese der EAE verbessern [133].

Insgesamt zeigten sowohl die Behandlungen von EAE-induzierten Mäusen mit verschiedenen CS als auch die Verwendung von *knockout* Mäusen unterschiedliche Ergebnisse in der Suppression bzw. Verstärkung von Krankheitssymptomen der EAE.

#### **1.4.5 Einfluss von Basophilen in der EAE**

Ein Einfluss von Basophilen auf den Verlauf der induzierten EAE in Mäusen wurde bislang kaum publiziert.

In einer Studie wurden durch die i.p. Injektion eines anti-Fc $\epsilon$ RI $\alpha$  Antikörpers Basophile in Mäusen mit induzierter EAE depletiert. Diese Mäuse zeigten einen verschlechterten Krankheitsverlauf der EAE im Vergleich zur Kontrolle. Es wurde eine verstärkte Th1 und Th17 Antwort gegen Myelin-Antigene in Mäusen ohne Basophile gezeigt. Diese Resultate ließen darauf schließen, dass Basophile oder Interaktionen von Fc $\epsilon$ RI eine wichtige Rolle in der EAE spielen [134].

### **1.5 Zielsetzung**

Die suppressive Eigenschaft von regulatorischen B-Zellen wurde erstmals in den 1970er Jahren beschrieben. Obwohl seitdem viel Zeit vergangen ist und eine Vielzahl an unterschiedlichen Studien durchgeführt wurde, ist es noch nicht gelungen, einen Oberflächenmarker oder Transkriptionsfaktor zu identifizieren, der einzigartig für die Definition einer regulatorischen B-Zelle wäre. Stattdessen wurde bislang eine Vielzahl an regulatorischen B-Zellen mit unterschiedlichen Phänotypen beschrieben. Dies lässt darauf schließen, dass regulatorische B-Zellen nicht aus einer bestimmten Vorläuferzelle entstehen, sondern dass sich potentiell jede B-Zelle in eine regulatorische B-Zelle differenzieren kann, wenn sie den richtigen Stimulus erhält.

Ein positiver Einfluss von regulatorischen B-Zellen auf den Krankheitsverlauf wurde bislang in einigen Krankheiten gezeigt. Die genaue funktionelle Rolle von regulatorischen B-Zellen in der demyelinisierenden Autoimmunerkrankung der Multiplen Sklerose (MS) muss jedoch noch genau geklärt werden.

Die Stimulation von B-Zellen mit dem Glykosaminoglykan Chondroitinsulfat C (CSC) führt zur Proliferation von B-Zellen und es wird vermutet, dass diese B-Zellen einen regulatorischen Phänotyp besitzen. Daher ist das primäre Ziel dieser Arbeit, B-Zellen, die mit CSC stimuliert wurden, genauer zu charakterisieren und eine mögliche suppressive Wirkung im Modell der EAE zu untersuchen.

Zu diesem Zweck sollen CSC-stimulierte B-Zellen zunächst *in vitro* charakterisiert werden. Hierbei wird der Fokus auf die Proliferation, die Modulation von Oberflächenrezeptoren und das Expressionsprofil von antiinflammatorischen und proinflammatorischen Zytokinen gelegt. Zudem werden B-Zellen untersucht, die *in vivo* durch die Injektion von CSC stimuliert wurden. Dabei soll ebenfalls die Modulation von Oberflächenrezeptoren, aber auch die Sekretion von Immunglobulinen ins Plasma untersucht werden.

Um letztlich herauszufinden, ob durch CSC-stimulierte B-Zellen einen regulatorischen Phänotyp besitzen und in der Lage sind, den Verlauf einer Autoimmunerkrankung zu verbessern, sollen diese B-Zellen im Modell der EAE, welches die Krankheit der MS in der Maus darstellt, untersucht werden. Zu diesem Zweck werden die Mäuse direkt mit CSC behandelt. Zusätzlich soll untersucht werden, ob der Transfer von CSC-stimulierten B-Zellen den Verlauf der Krankheit verbessern kann.

Die grundsätzliche Fragestellung dieser Arbeit ist zusammengenommen letztlich, ob CSC-stimulierte B-Zellen einen suppressiven Effekt auf den Verlauf der EAE haben und welche Zellen bzw. welche von Zellen sekretierten Proteine daran beteiligt sind.

## 2. Material

### 2.1 Chemikalien, Reagenzien, Puffer

Tabelle 1: Verwendete Chemikalien, Reagenzien und Puffer.

Bezeichnung	Verwendung	Bezugsquelle
ABTS-Tabletten	ELISA	Sigma Aldrich, Taufkirchen
AccuCheck Counting Beads	FACS-Analyse	Life Technologies, Carlsbad, USA
<i>Aqua ad iniectabilia</i>	EAE Immunisierung	Braun, Melsungen
Bovines Serum Albumin (BSA)	ELISA, EAE Immunisierung	Sigma Aldrich, Taufkirchen
CD19 MicroBeads, mouse	Zellisolation	Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG, Bergisch-Gladbach
CD49b (DX5) MicroBeads, mouse	Zellisolation	Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG, Bergisch-Gladbach
Chondroitinsulfat aus Hai-Knorpeln	Injektionen, Stimulation	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS)	ELISA + EAE Immunisierung	Sigma Aldrich, Taufkirchen
EDTA	Blutentnahme	Roth, Karlsruhe
FACS Lysing Solution, FACS Clean, FACS Flow	FACS-Analyse	BD Sciences, Heidelberg
Freund's Adjuvant, incomplete	EAE Immunisierung	Sigma Aldrich, Steinheim
Hanks Balanced Salt Solution (HBSS)	FACS-Analyse	Sigma Aldrich, Steinheim
<i>Mycobacterium Butyricum</i> Difco	EAE Immunisierung	BD Sciences, Heidelberg

Kaliumchlorid (KCl)	PBS	Roth, Karlsruhe
Kaliumhydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	PBS	Roth, Karlsruhe
MOG <sub>35-55</sub> -Peptid (MEVGWYRS-PFSRVVHLYRNGK)	EAE Immunisierung, ELISA, Zellkultur	EZ Biolab, Carmel, USA
NaCl 0,9 % steril	Injektionen	Braun, Melsungen
Natriumchlorid (NaCl)	PBS	Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid (NaOH)	PBS	Roth, Karlsruhe
Percoll	Zellisolation	Sigma Aldrich, Steinheim
Pertussis Toxin von <i>Bordetella Pertussis</i>	EAE Immunisierung	Sigma Aldrich, Steinheim
Schwefelsäure (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	ELISA	Roth, Karlsruhe
Streptavidin Sepharose high performance	Depletion von IgE	Merck, Darmstadt
Tetramethylbenzidin (TMB Substrate Set)	ELISA	BioLegend, San Diego, USA
Trypanblau-Lösung	Zellen zählen	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Türks Lösung	Zellen zählen	Merck Millipore, Darmstadt
Tween 20	ELISA	Merck Millipore, Darmstadt

## 2.2 Stimulanzen und Antikörper

Tabelle 2: Verwendete Stimulanzen und Antikörper.

Bezeichnung	Konzentration	Bezugsquelle
Anti-CD40	1 µg/ml	BioLegend, San Diego, USA
Biotin anti-mouse IgE	300 µg/ml	BioLegend, San Diego, USA
ChromPure Syrian Hamster IgG, whole molecule	10 µg/Injektion	Jackson Immuno Research, Suffolk, UK

CpG	1 nM	TIB Molbiol, Berlin
FceRI alpha Monoclonal Antibody (MAR-1), Functional Grade	10 µg/Injektion	(eBioscience) Thermo Fisher Scientific, Dreieich
Lipopolysaccharid (LPS)	1 µg/ml	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Normales Mausserum	1/10	Jackson Immuno Research, Suffolk, UK
Purified Rat Anti-Mouse IgE, Klon R35-72	1 µg/ml	BD Biosciences, Heidelberg
Rabbit-anti-mouse-HRP (P0260)	1/2000	DAKO A/S, Dänemark (Agilent Technologies GmbH, Waldbronn)
Recombinant Mouse IL-3	25 ng/ml	Peprotech, Hamburg

### 2.3 FACS-Antikörper

Tabelle 3: Verwendete FACS-Antikörper.

Target	Fluorochrom	Klon	Bezugsquelle
R0439 (Polyclonal Rabbit Anti-Mouse Immunoglobulins/RPE, Rabbit F(ab') <sub>2</sub> )	PE	Polyklonal	DAKO A/S, Dänemark (Agilent Technologies GmbH, Waldbronn)
Anti-CD11b	PE-Cy7	M1/70	Biolegend, San Diego, USA
Anti-CD138	APC	281-2	Biolegend, San Diego, USA
Anti-CD19	PerCp-Cy5.5	1D3/CD19	Biolegend, San Diego, USA
Anti-CD4	APC eFluor 780	RM4-5	Invitrogen, Karlsruhe
Anti-CD45	V500	30-F11	BD Biosciences, Heidelberg
Anti-CD49b	eF450	DX5	Biolegend, San Diego, USA

Anti-IgE	FITC	R35-72	BD Biosciences, Heidelberg
----------	------	--------	----------------------------

## 2.4 Zellkulturmedien und Zellkulturzusätze

Tabelle 4: Verwendete Zellkulturmedien und Zellkulturzusätze.

Bezeichnung	Bezugsquelle
$\beta$ -Mercaptoethanol	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Fetales Kälberserum (hitzeinaktiviert 1h bei 56 °C)	PAA, Cölbe
HEPES Buffer Solution 1M	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe
MEM NEAA (100x) Minimum Essential Medium Non-Essential Amino Acids	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe
RPMI (Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium)	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe
Penicillin	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe
Sodium Pyruvate Solution 100 nM	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Streptomycin	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe

## 2.5 Zusammensetzung der Zellkulturmedien

Tabelle 5: Zusammensetzung der verwendeten Zellkulturmedien.

Zellkulturmedium	Zusammensetzung
MLR-Medium	500 ml RPMI, 10 % iFCS, 1 % Penicillin/Streptomycin-Stammlösung, 1 % Sodium Pyruvat, 1 % HEPES, 1 % NEAA, 1,8 $\mu$ l $\beta$ -Mercaptoethanol

## 2.6 Pufferzusammensetzung

Tabelle 6: Zusammensetzung der verwendeten Puffer.

Puffer	Zusammensetzung
10x PBS	11,5g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 80g NaCl, 2g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 2g KCL (in 1l H <sub>2</sub> O)
Block- und Verdünnungspuffer für ELISA	1 % BSA in PBS bzw. 2 % BSA in PBS
MACS-Puffer	0,5 % BSA in PBS + 2 mM EDTA
Präparationspuffer	0,5 % BSA in PBS
Waschpuffer für ELISA	0,05 % Tween 20 in PBS

## 2.7 Arzneistoffe

Tabelle 7: Verwendete Arzneistoffe.

Wirkstoff	Verwendung	Konzentration	Hersteller
Atipamezolhydrochlorid	Antagonist	5 mg/ml	Vetoquinol, Ravensburg
Fentanylcitrat	Narkose	0,1 mg/ml	Janssen, Beerse, Belgien
Flumazenil	Antagonist	0,5 mg/ml	Hexal, Holzkirchen
Medetomidinhydrochlorid	Narkose	1 mg/ml	Vetoquinol, Ravensburg
Midazolam	Narkose	1 mg/ml	Rotexmedica, Trittau
Naloxonhydrochlorid	Antagonist	0,4 mg/ml	Ratiopharm, Ulm

## 2.8 Kits

Tabelle 8: Verwendete Kits.

Kit	Verwendung	Bezugsquelle
ELISA MAX Deluxe Set Mouse IgE	ELISA	Biolegend, San Diego, USA
IgM Mouse Uncoated ELISA Kit	ELISA	(Invitrogen) Thermo Fisher Scientific, Dreieich
Mouse IFN-gamma DuoSet ELISA	ELISA	R&D Systems, Minneapolis, USA
Mouse IL-3 DuoSet ELISA	ELISA	R&D Systems, Minneapolis, USA
Mouse IL-4 DuoSet ELISA	ELISA	R&D Systems, Minneapolis, USA
Mouse IL-6 DuoSet ELISA	ELISA	R&D Systems, Minneapolis, USA
Mouse IL-10 DuoSet ELISA	ELISA	R&D Systems, Minneapolis, USA
Mouse IL-17 DuoSet ELISA	ELISA	R&D Systems, Minneapolis, USA

## 2.9 Sonstige Verbrauchsmaterialien

Tabelle 9: Sonstige verwendete Verbrauchsmaterialien.

Bezeichnung	Verwendung	Bezugsquelle
24 Well Culture Plate	Zellkultur	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Abdeckfolie für Mikrotestplatten	ELISA, Zellkulturüberstände	Roth, Karlsruhe
Cell-Strainer (70 nm, 100 nm)	Vereinzelung der Zellen	Falcon / Corning Inc., Twerksbury, USA
CellTrics 30 µm	Vereinzelung der Zellen	Sysmex, Görlitz
Discofix Drei-Wege-Hahn	EAE Immunisierung	Braun, Melsungen



Disposable Hemocytometer C-Chip, Neubauer-improved	Zellen zählen	Nano EnTek, Waltham, USA
Einmal-Microhaematokrit-Kapillaren	Blutentnahme	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Einmalskalpell (No. 10)	Zerteilen des Gehirns, Schaben von Knochenmark	Pfm, Köln
Einmalspritzen (1 ml, 2 ml, 20 ml)	Injektionen, Perfusion, Organ homogenisieren	BD Biosciences, Heidelberg
ELISA-Platte F96 Maxisorp	ELISA	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
Kanülen (0,80x40mm, 0,40x20mm)	Injektion, Bereitung von MOG-Emulsion	BD Medical, Heidelberg
LS-Säulen	Zellisolation	Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG, Bergisch-Gladbach
Mikrotester Rundbodenplatte 96-Well	ELISA	Sarstedt, Nümbrecht
Omnifix Luer Lock Spritze, 1 ml	EAE Immunisierung	Braun, Melsungen
Omnifix Luer Lock Spritze, 10 ml	EAE Immunisierung	Braun, Melsungen
Pasteurpipetten ohne Wattestopfen	Zellisolation, FACS-Analyse	Roth, Karlsruhe
Petrischale (verschiedene Größen)	Zellpräparation	BD Biosciences, Heidelberg
Pipettenspitzen ohne Filter (10, 20, 100, 200, 1000 µl)	Pipettieren	Sarstedt, Nümbrecht

Pipettenspitzen mit Filter (10, 20, 100, 200, 1000 µl)	Pipettieren	Eppendorf, Hamburg
Pipettieraufsätze für Multi- pette plus	Pipettieren	Eppendorf, Hamburg
Polystyrolröhrchen für Durchflusszytometrie (5 ml)	FACS-Analyse	BD Falcon, Le Pont de Claix, Frankreich
Reaktionsgefäße (0,2, 1,5, 2, 5 ml)	Pipettieren	Sarstedt, Nümbrecht
Serologische Pipetten (5, 10, 25, 50 ml)	Pipettieren	nerbe plus GmbH & Co. KG, Winsen/Luhe
Spritzenvorsatzfilter, 0,22 µm	EAE Immunisierung	VWR, Darmstadt
VersaTouch Handschuhe	Steriles Arbeiten, Selbst- schutz	Ansell Europe, Brüssel, Belgien
Zellkulturplatten Cellstar Rundboden 96-Well	Zellkultur	Greiner Bio-One, Fricken- hausen
Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml)	Zellbiologische Methoden	Sarstedt, Nümbrecht

## 2.10 Geräte

Tabelle 10: Verwendete Geräte und Hilfsmittel.

Laborgerät	Hersteller
Brutschrank	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
Durchflusszytometer FACS Canto II	BD Biosciences, Heidelberg
Durchlichtmikroskop Axiovert 25	Zeiss, Jena
Eismaschine	Ziegra, Isernhagen

Kühlschrank	Liebherr, Bulle, Schweiz
Magnetrührer MR 3001	Heidolph Instruments, Schwabach
Mehrkanalpipetten Transferpette (0,5-10 µl, 5-50 µl, 2-200 µl)	Brand, Wertheim
Microplate Reader Infinite M200 PRO	Tecan, Männedorf, Schweiz
Microplate Washer Wellwash Versa	Thermo Fisher Scientific, Vantaa, Finnland
Pipette Multipette plus	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Pipetten Pipetman (P10, P20, P100, P200, P1000)	Gilson, Limburg-Offheim
Pipettierhilfe Accu-jet pro	Brand, Wertheim
Premium No Frost -20 °C Gefrierschrank	Liebherr, Bulle, Schweiz
Rotator SB3	Stuart, Staffordshire, UK
Schüttelgerät Vortex Genie 2	Scientific Industries, New York, USA
Sterilbank LaminAir HB2448	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
Wasseraufbereitungsanlage	Millipore, Eschborn
Wasserbad	GFL, München
Zentrifuge (Megafuge 16R)	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
Zentrifuge (Centrifuge 5417 R)	Eppendorf, Hamburg

## 2.11 Software

Tabelle 11: Verwendete Software.

Software	Verwendung	Herausgeber
FACS Diva Version 8.0.2	FACS-Analyse	BD Biosciences, Heidelberg

GraphPad Prism 8.0.1	FACS-Analyse und Statistik	GraphPad Software, La Jolla, USA
Microplate Reader Software i-control TM	ELISA	Tecan, Männedorf, Schweiz
Microsoft Excel 2016	Berechnungen	Microsoft, Redmont, USA

## 2.12 Versuchstiere

Tabelle 12: Verwendete Versuchstiere.

Stamm	Abkürzung	Herkunft
C57Bl/6N	Bl/6N	Charles River, Sulzfeld
B6.129P2-Igh-J <sup>tm1Cgn</sup> /J	J <sub>H</sub> T	Aus der Arbeitsgruppe von Simon Fillatreau
Mb1 <sup>wt/cre</sup> x blimp1 <sup>fl/fl</sup>	-	Aus der Arbeitsgruppe von Simon Fillatreau
Mb1 <sup>wt/wt</sup> x blimp1 <sup>fl/fl</sup>	-	Aus der Arbeitsgruppe von Simon Fillatreau

## **3. Methoden**

### **3.1 Tierexperimente**

#### **3.1.1 Versuchstiere und Tierhaltung**

Alle verwendeten Mäuse wurden unter spezifischen pathogenfreien Bedingungen bei einer konstanten Temperatur von  $21\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$  und einer Luftfeuchtigkeit von 60 % gehalten. Der Hell-Dunkel-Rhythmus folgte einem 12-Stunden-Wechsel. Wasser und Nahrung wurden den Mäusen durchgehend *ad libitum* zur Verfügung gestellt. Für die Versuche wurden ausschließlich weibliche Mäuse verwendet, welche sich in einem Alter von 8-13 Wochen befanden. Alle durchgeführten Tierexperimente wurden genehmigt und unter der Beachtung der jeweiligen geltenden Richtlinien durchgeführt.

#### **3.1.2 Intraperitoneale, intravenöse und subkutane Injektionen**

Alle Injektionen wurden unter Beachtung der durch die Gesellschaft für Versuchstierkunde (GV-SOLAS) empfohlenen Injektionsmethoden und Injektionsvolumina bei Versuchstieren durchgeführt. Subkutan wurden Injektionen in die Nackenfalte bzw. die Hinterflanken appliziert. Intravenöse Injektionen fanden über die laterale Schwanzvene statt.

#### **3.1.3 Antagonisierbare Narkose**

Zur Entnahme von peripherem Blut wurde eine antagonisierbare Narkose durchgeführt. Diese wurde direkt nach der Blutentnahme wieder antagonisiert, wodurch die Mäuse nur kurz in Narkose lagen und die Narkose somit gut verträglich war. Die Narkose, bestehend aus Fentanyl (0,05 mg/kg), Midazolam (5 mg/kg) und Medetomidin (0,5 mg/kg) wurde durch intraperitoneale Injektion eingeleitet. Durch eine subkutane Injektion des Antagonisten, bestehend aus Naloxon (1,2 mg/kg), Flumazenil (0,5 mg/kg) und Atipamezol (2,5 mg/kg) konnte die Narkose wieder aufgehoben werden.

### 3.1.4 *In vivo* Experimente mit Injektion von CSC

Für die Durchführung von *in vivo* Experimenten wurden 6-13 Wochen alte weibliche Bl/6N Mäuse der Firma Charles River verwendet. Diese wurden nach Anlieferung für mindestens 2 Wochen im Tierstall adaptiert, bevor ein Experiment gestartet wurde. Abhängig vom jeweiligen Versuchsaufbau wurde den Mäusen täglich für 5, 14 oder 20 Tage 10 mg CSC bzw. NaCl als Kontrolle i.p. injiziert. Je nach Fragestellung wurden die Mäuse am Tag nach der letzten Injektion (für Organanalysen mittels FACS bzw. Ansetzen einer Zellkultur) bzw. drei Tage nach der letzten Injektion (für Gewinnung von Blutplasma) durch zervikale Dislokation getötet. Anschließend wurden entsprechende Organe entnommen und weitergehend untersucht.

### 3.1.5 Tiermodell der EAE

Um den Einfluss von CSC und CSC-aktivierten Zellen in einer inflammatorischen Autoimmunkrankheit zu untersuchen, wurde ein Maus Modell, das die humane Multiple Sklerose nachbildet, verwendet. Hierbei handelte es sich um die MOG<sub>35-55</sub>-induzierte EAE, welche durch eine aktive Immunisierung induziert wird.

EAE-Experimente wurden in weiblichen Bl/6N Mäusen mit einem Alter von 11-12 Wochen durchgeführt. Da das Modell der EAE zum Teil stressabhängig ist, wurden die Mäuse mindestens für 2 Wochen im Tierstall adaptiert, bevor eine EAE induziert wurde. Zusätzlich musste darauf geachtet werden, die Mäuse vorsichtig und nur so oft wie nötig zu untersuchen und zu behandeln [135].

#### 3.1.5.1 Immunisierung

Zunächst wurde eine Emulsion aus MOG<sub>35-55</sub>-Peptid zusammen mit *complete Freund's adjuvant* (Komplettes Freund's Adjuvant, CFA) hergestellt. Hierfür wurden in einer 50 ml Röhre 4800 µl PBS mit 200 µl MOG<sub>35-55</sub>-Peptid mit einer Ausgangskonzentration von 50 mg/ml versetzt und gemischt. Daneben wurden die 10 ml Inhalt eines Fläschchens Inkompletten Freund's Adjuvant in eine 50 ml Röhre überführt und anschließend 100 mg *Mycobacterium Butyricum* zugegeben, wodurch CFA entstand. Nachdem 5 ml des CFA zu den 5 ml verdünnten MOG<sub>35-55</sub>-Peptids gegeben wurden, konnte die Emulsion mittels eines Vortex-Geräts gut gemischt werden und mit einer

10 ml Spritze und einer 0,80x40 mm Kanüle aufgezogen werden. Die Emulsion musste nun mittels einer zweiten 10 ml Spritze und eines Drei-Wege-Hahns durch mehrmaliges hin-und-her Drücken verdichtet werden.

Zusätzlich wurde Pertussis Toxin angesetzt, welches verwendet wird, um die Induktion der EAE in den Mäusen zu fördern. Das als lyophilisiertes Pulver vorhandene Pertussis Toxin, welches von *Bordetella pertussis* sekretiert wurde, musste zunächst durch die Zugabe von 500 µl sterilem *Aqua ad iniectabilia* und 500 µl sterilem PBS mit 1 % BSA gelöst werden, wodurch eine Konzentration 50 µg/ml entsteht. Anschließend wurde das Pertussis Toxin in PBS auf eine Konzentration von 1,25 µg/ml eingestellt.

Den zu immunisierenden Mäusen konnten nun an Tag 0 in beide Hinterflanken jeweils 100 µl der Emulsion subcutan injiziert werden, was insgesamt 200 µg MOG<sub>35-55</sub>-Peptid mit 1 mg *M. Butyricum* entspricht. Daraufhin wurden 200 µl des Pertussis Toxins intraperitoneal injiziert, was 0,25 µg pro Maus entspricht. Die Injektion des Pertussis Toxins wurde an Tag 2 wiederholt.

### 3.1.5.2 Krankheitsverlauf und Scoring

Nach der Immunisierung wurden die Mäuse täglich gewogen, sowie der klinische Score erhoben. Meist kam es wenige Tage nach dem Beginn der Krankheit zu einem Gewichtsverlust der Mäuse. Die ersten klinischen Symptome der EAE traten zwischen 9 und 10 Tagen nach der Immunisierung auf. Generell zeigten Mäuse etwa 16 bis 18 Tage nach der Immunisierung eine teilweise Genesung und damit einhergehend eine leichte Verbesserung des klinischen Scores. Typischer Weise wird der klinische Score der EAE mit einer Bewertungsskala, die von 0 bis 5 reicht, bewertet [116], wohingegen in dieser Arbeit eine detailliertere Bewertungsskala von 0 bis 14 verwendet wurde. Diese ist in Tabelle 13 dargestellt. Es wurden auf die vier Beine und den Schwanz einzeln Scores gegeben, die addiert wurden, um den endgültigen Score der jeweiligen Maus zu erhalten. Unter Beachtung der genehmigten Richtlinien, wurden Mäuse, die einen zu hohen Score, oder anderweitige Erkrankungen, wie beispielsweise infizierte und offene Hautverletzungen aufwiesen, vorzeitig aus dem Versuch genommen. Am Tag 21 nach der Immunisierung wurden die Experimente beendet. Die Mäuse wurden

mittels Vergasung mit CO<sub>2</sub> mit einer Expositionsdauer von mindestens 10 Minuten getötet; anschließend konnten die zu untersuchenden Organe präpariert und analysiert werden.

**Tabelle 13: Klinisches Scoring System.** Gezeigt sind die Score-Punkte, sowie die dazugehörige klinische Symptomatik der Versuchstiere.

Score	Klinische Symptome	Erklärung
0	Keine klinischen Symptome	Normaler Gang, Schwanz bewegt sich und kann angehoben werden
1	Teilweise erschlaffter Schwanz	Schwanzspitze hängt herab, Schwanz kann an Basis noch bewegt werden
2	Komplette Lähmung des Schwanzes	Schwanz ist erschlafft, kann nicht mehr bewegt werden
1	Leichte Lähmung eines der Beine	Leicht unkoordinierter Gang; Maus kann sich mit Vorderfuß etwas schlechter an Gitterstäben festhalten
2	Mittlere Lähmung eines der Beine	Deutlich unkoordinierter, schwankender Gang; Maus kann sich mit Vorderfuß nur schlecht an Gitterstäben festhalten
3	Komplette Lähmung eines der Beine	Bein kann nicht mehr bewegt werden und wird nachgezogen



## **3.2 Zellbiologische Methoden**

### **3.2.1 Entnahme von peripherem Blut und Gewinnung von Plasma**

Zunächst wurde wie unter 3.1.3 beschrieben, bei den Mäusen eine antagonisierbare Narkose eingeleitet. Mittels einer Heparin-beschichteten Kapillare konnte anschließend retrobulbär Blut entnommen werden, welches mit 0,1 M EDTA vermengt wurde. Bis zur weiteren Verwendung wurde das Blut auf Eis gelagert.

Zur Gewinnung des Blutplasmas wurden die Reagiergefäße, welche das entnommene Blut enthielten bei 2500 rpm und 4 °C für 15 Minuten zentrifugiert. Durch die Zentrifugation befanden sich alle zellulären Bestandteile des Blutes am Boden des Reagiergefäßes, während sich der flüssige Anteil des Blutes, also das Plasma, als Überstand abtrennte. Das in ein neues Gefäß überführte Plasma wurde bis zur weiteren Analyse bei -20 °C gelagert.

### **3.2.2 Transkardiale Perfusion**

Damit keine kontaminierenden Blutzellen bei der Analyse von Zellen aus dem Gehirn bzw. dem Rückenmark vorhanden waren, wurden die Mäuse perfundiert, nachdem sie durch eine 10-minütige Exposition mit CO<sub>2</sub> getötet wurden. Zur Perfusion des Herzkreislaufs wurde der Brustkorb geöffnet, indem die Rippen seitlich aufgeschnitten wurden. Zusätzlich wurde die *Arteria femoralis superficialis* geöffnet, um das Blut aus den Gefäßen auswaschen zu können. Daraufhin wurde der linke Ventrikel mit einer Kanüle punktiert und der Blutkreislauf mit 20 ml kaltem PBS unter konstantem Druck gespült.

### **3.2.3 Präparation von murinen Zellen**

Zur Präparation unterschiedlicher Organe wurden die Mäuse zunächst durch zervikale Dislokation bzw. Vergasung mit CO<sub>2</sub> mit einer Expositionsdauer von mindestens 10 Minuten getötet. Das Fell wurde mit 70 % Ethanol desinfiziert.

### 3.2.3.1 Präparation von Zellen aus der Milz

Nach Öffnung des Bauchraumes und Freilegung des umliegenden Gewebes konnte die Milz entnommen werden. Für die anschließenden Analysen wurde eine Einzelzellsuspension der Milz hergestellt. Hierfür wurde die Milz mit Hilfe des Stempels einer 2 ml Spritze und Präparationspuffer durch einen 70 µm Filter homogenisiert. Diese Suspension wurde in eine 15 ml Röhre überführt und bei 1200 rpm und 4 °C für 6 Minuten zentrifugiert. Das Pellet wurde in Präparationspuffer resuspendiert, über einen 30 µm Filter gegeben und bei 1600 rpm und 4 °C für 6 Minuten zentrifugiert. Das Zellpellet wurde im entsprechenden Medium in Lösung genommen und bis zur Weiterverarbeitung auf Eis gelagert.

### 3.2.3.2 Präparation von Zellen aus dem Gehirn

Zunächst wurden die Mäuse wie unter 3.2.2 beschrieben perfundiert. Zur Präparation des Gehirns wurden die Mäuse dekapitiert und der Schädelknochen wurde entlang der Schädelnähte durchgeschnitten, um das komplette Gehirn aus der Schädelhöhle heben zu können. Die linke Seite des Gehirns wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und für spätere Experimente aufbewahrt. Die rechte Seite des Gehirns wurde mit Hilfe des Stempels einer 2 ml Spritze und Präparationspuffer durch einen 100 µm Filter homogenisiert. Die Suspension wurde in eine 15 ml Röhre überführt und für 10 Minuten bei 3000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Inzwischen wurde der zu verwendende Percoll in *Hanks balanced salt solution* (HBSS) verdünnt. Das Pellet konnte anschließend mit insgesamt 8 ml 40 %-igem Percoll resuspendiert werden und in eine neue 15 ml Röhre überführt werden. Daraufhin wurden die Zellen mit 2 ml 80 %-igem Percoll unterschichtet und für 20 Minuten bei 2000 rpm und 4 °C mit verminderter Beschleunigungs- und Bremsstärke (Acc 4, Decc 4) zentrifugiert. Durch die unterschiedlichen Konzentrationen des Percolls bildete sich ein Dichtegradient, wodurch sich die Zellen in der Interphase befanden. Die Interphase wurde anschließend in neues Gefäß überführt und die Zellen wurden mit 3 ml RPMI mit 10 % FCS durch Zentrifugation für 6 Minuten bei 1600 rpm und 4 °C gewaschen. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Zellen auf Eis gelagert.

### 3.2.3.3 Präparation von Zellen aus dem Rückenmark

Wie unter 3.2.2 beschrieben wurde zunächst der Blutkreislauf der Mäuse perfundiert. Zur Präparation des Rückenmarks wurden die Mäuse dekapitiert und der Schwanz abgetrennt. Anschließend konnte die komplette Wirbelsäule präpariert werden. Um das Rückenmark zu gewinnen, wurde die Wirbelsäule mit 10 ml PBS gespült, wodurch die Zellen herausgelöst wurden. Daraufhin wurde das Rückenmark mit Hilfe des Stempels einer 2 ml Spritze und Präparationspuffer durch einen 100 µm Filter homogenisiert. Die Zellsuspension wurde in eine 15 ml Röhre überführt und für 10 Minuten bei 3000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Inzwischen wurde der zu verwendende Percoll in HBSS verdünnt. Mit insgesamt 8 ml 40 %-igem Percoll wurde das Zellpellet resuspendiert und in eine neue 15 ml Röhre überführt. Anschließend wurden die Zellen mit 2 ml 80 %-igem Percoll unterschichtet und für 20 Minuten bei 2000 rpm und 4 °C mit verminderter Beschleunigungs- und Bremsstärke (Acc 4, Decc 4) zentrifugiert. Durch die unterschiedlichen Konzentrationen des Percolls bildete sich ein Dichtegradient, wodurch sich die Zellen in der Interphase befanden. Nach der Überführung der Interphase in neues Gefäß, wurden die Zellen mit 3 ml RPMI mit 10 % FCS durch Zentrifugation für 6 Minuten bei 1600 rpm und 4 °C gewaschen. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Zellen auf Eis gelagert.

### 3.2.3.4 Präparation von Zellen aus dem Knochenmark

Zur Präparation des Knochenmarks wurde zunächst der untere Bauchraum der Maus geöffnet und die Beine von Haut und Fell freigelegt. Anschließend wurden die Beine auf der Höhe des Hüftgelenks abgetrennt. Daraufhin wurden Unterschenkel und Oberschenkel durch einen Schnitt im Kniegelenk getrennt, zusätzlich wurde der Fuß entfernt. Um die Knochen freizulegen wurde das umliegende Gewebe mit Hilfe eines Skalpell abgeschabt. Zur Gewinnung der Knochenmarkszellen, wurden die Knochen mit Hilfe einer dünnen Kanüle (0,40 x 20 mm) mit 10 ml PBS gespült, wodurch die Zellen herausgelöst wurden. Die Zellen wurden anschließend bei 1200 rpm und 4 °C für 6 Minuten zentrifugiert. Das Pellet wurde in PBS resuspendiert, über einen 30 µm Filter gegeben und bei 1600 rpm und 4 °C für 6 Minuten zentrifugiert. Das Zellpellet konnte nun im entsprechenden Medium in Lösung genommen werden und bis zur Weiterverarbeitung auf Eis gelagert werden.

### 3.2.4 Isolation von Zellen mittels MACS

Für die *magnetic-activated cell sorting* (MACS) Isolation von unterschiedlichen Zellpopulationen aus Milzen bzw. aus dem Knochenmark wurden entsprechende *MicroBeads* der Firma Miltenyi Biotec verwendet. Bei der Durchführung der Isolationen wurden die vom Hersteller zur Verfügung gestellten Protokolle befolgt. Um die Reinheit der isolierten Zellen zu ermitteln, wurde nach der abgeschlossenen Isolation ein MACS-Check durchgeführt. Hierfür wurden etwa 500.000 Zellen verwendet, die wie unter 3.3.1 beschrieben extrazellulär gefärbt und am FACS Canto II gemessen wurden.

#### Isolation von CD19<sup>+</sup> B-Zellen

Zunächst wurde, wie unter 3.2.3.1 beschrieben, die Milz präpariert und eine Einzelzellsuspension hergestellt, woraufhin die Zellzahl bestimmt wurde (unter 3.2.5 beschrieben). Anschließend wurden die Zellen in 90 µl MACS Puffer pro 10<sup>7</sup> Zellen aufgenommen und 10 µl der CD19 *MicroBeads* pro 10<sup>7</sup> Zellen wurden zugegeben. Diese wurden nun für 10 Minuten bei 4 °C inkubiert. In der Zwischenzeit wurde eine LS-Säule im magnetischen Feld eines MACS-Separators platziert und mit 3 ml MACS Puffer equilibriert. Nach Ablauf der Inkubationszeit der Zellen mit den *MicroBeads* wurde die Zellsuspension auf die LS-Säule gegeben. Nachdem die Flüssigkeit komplett in die LS-Säule gesickert war, wurde sie mit 3 ml MACS Puffer gewaschen. Anschließend wurde die LS-Säule vom MACS-Separator entfernt und auf eine 15 ml Röhre gesetzt. Daraufhin wurden 5 ml MACS Puffer auf die LS-Säule pipettiert und mithilfe des bei den Säulen enthaltenen Stempels wurde der Puffer durch die Säule gedrückt, wodurch die CD19<sup>+</sup> Zellen aus der Säule in die 15 ml Röhre gespült wurden. Die isolierten Zellen wurden bei 1600 rpm und 4 °C für 6 Minuten zentrifugiert, woraufhin das Zellpellet im entsprechenden Medium in Lösung genommen wurde und bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert wurde.

#### Isolation von CD49b<sup>+</sup> (DX5) Zellen

Wie unter 3.2.3.4 beschrieben, wurde das Knochenmark präpariert und eine Einzelzellsuspension der Zellen hergestellt, woraufhin die Zellzahl bestimmt werden konnte (unter 3.2.5 beschrieben). Die Zellen wurden in 90 µl MACS Puffer pro 10<sup>7</sup> Zellen

aufgenommen und 10 µl der CD49b (DX5) *MicroBeads* pro  $10^7$  Zellen wurden zugegeben. Diese wurden anschließend für 15 Minuten bei 4 °C inkubiert. Die Zellen wurden durch die Zugabe von 1-2 ml MACS Puffer pro  $10^7$  Zellen und eine darauffolgende Zentrifugation bei 1600 rpm und 4 °C für 6 Minuten gewaschen. Bis zu  $10^8$  Zellen konnten in 500 µl MACS Puffer resuspendiert werden. Für die Isolation wurde nun eine LS-Säule im magnetischen Feld eines MACS-Separators platziert und mit 3 ml MACS Puffer equilibriert, woraufhin die Zellsuspension auf die LS-Säule gegeben wurde. Die Säule wurde drei Mal mit jeweils 3 ml MACS-Puffer gewaschen, wobei darauf geachtet werden musste, dass der neue Waschschrift erst dann erfolgte, wenn die Flüssigkeit komplett in die LS-Säule gesickert war. Anschließend wurde die LS-Säule vom MACS-Separator entfernt und auf eine 15 ml Röhre gesetzt. Daraufhin wurden 5 ml MACS Puffer auf die LS-Säule pipettiert und mithilfe des bei den Säulen enthaltenen Stempels wurde der Puffer durch die Säule gedrückt, wodurch die CD49b<sup>+</sup> Zellen aus der Säule in die 15 ml Röhre gespült wurden. Die isolierten Zellen wurden bei 1600 rpm und 4 °C für 6 Minuten zentrifugiert, woraufhin das Zellpellet im entsprechenden Medium in Lösung genommen wurde und bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert wurde.

### 3.2.5 Bestimmung der Lebendzellzahl mittels Neubauer-Zählkammer

Zur Bestimmung der Lebendzellzahl von isolierten Zellen wurde der Farbstoff Trypanblau verwendet. Dieser polyanionische Farbstoff färbt Zellen durch die Bindung an Zellproteine im Inneren der Zellen blau. Da der Farbstoff nicht membrangängig ist, werden nur tote Zellen angefärbt, während vitale Zellen mit einer intakten Zellmembran ungefärbt bleiben [136].

Zur Bestimmung der Lebendzellzahl von Zellsuspensionen, die Erythrozyten enthielten, wie beispielsweise Milzzellsuspensionen, wurde die Türks Lösung zum Färben der Zellen eingesetzt. In der Lösung ist Essigsäure vorhanden, welche bei der Zählung störende Erythrozyten hämolysiert. Der in der Lösung enthaltene Farbstoff Gentianaviolett färbt Leukozytenkerne leicht violett an, wodurch sie für die Zählung sichtbar werden [137, 138].

Zur Bestimmung der Lebendzellzahl wurden 10 µl Zellsuspension mit 10 µl Trypanblau bzw. 10 µl Türks Lösung versetzt. Davon wurden 10 µl auf die Zählkammer gegeben

und die ungefärbten weiß erscheinenden Zellen bzw. die leicht violett erscheinenden Zellen bei Färbung mit Türks Lösung, unter einem Lichtmikroskop ausgezählt. Es wurden dabei zwei schräg gegenüberliegende Quadranten ausgezählt. Betrug die Zahl der ausgezählten Zellen weniger als 100, wurden zusätzlich die restlichen zwei Quadranten ausgezählt. Die Zellzahl lässt sich folgendermaßen berechnen:

$$\frac{\text{Zellzahl}}{\text{ml}} = \frac{\text{Zellzahl in } x \text{ Quadranten}}{x} * \text{Verdünnungsfaktor} * 10^4$$

**Abbildung 8: Berechnung der Lebendzellzahl.** Dargestellt ist die Formel für die Berechnung der Lebendzellzahl nach Auszählung der lebenden Zellen mittels Neubauer-Zählkammer.

### 3.2.6 Stimulation und Aktivierung von isolierten Zellen in einer Zellkultur

Für das Ansetzen einer Zellkultur und die vorangehende Aufarbeitung der Organe und Isolation der Zellen wurden ausschließlich sterile Medien und sterile Verbrauchsgegenstände verwendet. Zusätzlich wurde unter einer Sterilbank gearbeitet, um eine Kontamination der Zellkultur zu vermeiden.

#### Zellkultur von CD19<sup>+</sup> B-Zellen

CD19<sup>+</sup> B-Zellen wurden wie unter 3.2.4 beschrieben isoliert und nach der letzten Zentrifugation in 1 ml MLR-Medium resuspendiert. Anschließend wurde die Zellzahl bestimmt (wie unter 3.2.5 beschrieben) und die Zellen konnten auf 3 Mio. Zellen pro ml eingestellt werden. Die für die Aktivierung der Zellen verwendeten Stimulanzen wurden in MLR-Medium verdünnt. Hierfür wurde CSC mit einer Konzentration von 200 µg/ml, CpG mit einer Konzentration von 1 nM, αCD40 mit einer Konzentration von 1 µg/ml und Lipopolysaccharid (LPS) mit einer Konzentration von 1 µg/ml verwendet. Als Kontrolle diente reines MLR-Medium. Die Zellkultur wurde in einer 96 Well Platte mit U-Boden angesetzt, da in der U-Boden Form ein besserer Kontakt zwischen Zellen und Stimulanzen möglich ist. Zunächst wurden die Wells im äußeren Rand der 96 Well Platte mit jeweils 200 µl PBS gefüllt, um einer Verdunstung der Proben vorzubeugen. Anschließend wurden in die entsprechenden Wells jeweils 100 µl der Stimulanzen und 300.000 CD19<sup>+</sup> B-Zellen in 100 µl pipettiert. Die Platten wurden für 4 bis

5 Tage bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank inkubiert. Daraufhin wurde der Zellkultur-Überstand abgenommen, um die Konzentration der Zytokine IL-6 und IL-10 (beschrieben unter 3.2.7) zu bestimmen. Dieser wurde bis zur weiteren Verwendung im ELISA bei -20 °C gelagert. Zusätzlich wurde die Aktivierung und differenzielle Expression von Oberflächenrezeptoren der Zellen durch FACS-Analyse (beschrieben unter 3.3.1) untersucht.

### **Restimulation von Milzzellen mit MOG-Peptid**

Im Zuge der Versuchsenden von EAE Experimenten wurden wie unter 3.2.3.1 beschrieben, sterile Einzelzellsuspensionen der Milzen hergestellt, welche in MLR-Medium aufgenommen wurden. Nachdem die Milzzellen gezählt wurden (beschrieben unter 3.2.5), wurden diese auf eine Zellzahl von 8 Mio. Zellen pro ml eingestellt. Zur Restimulation der Milzzellen wurde MOG<sub>35-55</sub>-Peptid verwendet, welches in einer Konzentration von 20 µg/ml (verdünnt in MLR-Medium) eingesetzt wurde. Als Kontrolle diente reines MLR-Medium. Die Zellkultur wurde in einer 24-Well Platte angesetzt. In die entsprechenden Wells wurden jeweils 250 µl des MOG<sub>35-55</sub>-Peptids bzw. MLR-Mediums und zusätzlich 2 Mio. Milzzellen in 250 µl gegeben. Die Platten wurden für 3 Tage bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank inkubiert. Daraufhin wurde der Zellkultur-Überstand abgenommen, um die Konzentration der Zytokine IL-3, IL-6, IL-10, IL-17 und IFN<sub>γ</sub> (beschrieben unter 3.2.7) zu bestimmen. Dieser wurde bis zur weiteren Verwendung im ELISA bei -20 °C gelagert.

### **Zellkultur von CD49b<sup>+</sup> (DX5) Zellen**

Aus dem Knochenmark wurden CD49b<sup>+</sup> Zellen isoliert (beschrieben unter 3.2.4), die nach der letzten Zentrifugation in 1 ml MLR-Medium resuspendiert wurden. Die Zellzahl wurde wie unter 3.2.5 beschrieben bestimmt, woraufhin die Zellen auf 0,5 Mio. Zellen pro ml eingestellt wurden. Die für die Kultur verwendeten Stimulanzen wurden in MLR-Medium verdünnt, während als Kontrolle reines MLR-Medium diente. CSC wurde mit einer Konzentration von 10 µg/ml, αIgE mit einer Konzentration von 1 µg/ml und IL-3 mit einer Konzentration von 25 ng/ml eingesetzt. Die Zellkultur wurde in einer 96 Well Platte mit U-Boden angesetzt, in welcher zunächst die Wells im äußeren Rand mit jeweils 200 µl PBS gefüllt wurden, um einer Verdunstung der Proben vorzubeugen.

Anschließend wurden in die entsprechenden Wells jeweils 100 µl der Stimulanzen und 50.000 CD49b<sup>+</sup> Zellen in 100 µl pipettiert. Die Platten konnten nun für 24 Stunden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank inkubiert werden. Daraufhin wurde der Zellkultur-Überstand abgenommen, um die Konzentration der Zytokine IL-4 und IL-6 (beschrieben unter 3.2.7) zu bestimmen. Dieser wurde bis zur weiteren Verwendung im ELISA bei -20 °C gelagert.

### **3.2.7 Konzentrationsbestimmung von Zytokinen und Immunglobulinen mittels ELISA**

Beim *enzyme linked immuno sorbent assay* (ELISA) handelt es sich um einen sensitiven Assay zum qualitativen und quantitativen Nachweis eines Analyten. Hierbei wird ein für den Analyten spezifischer Antikörper verwendet, welcher direkt oder indirekt an ein Enzym gekoppelt ist. Dieses Enzym kann ein zugegebenes Substrat verstoffwechseln, wodurch ein detektierbares Signal entsteht, welches luminometrisch, kolorimetrisch oder fluorimetrisch erfasst werden kann [139, 140].

Die Konzentrationsbestimmungen von IL-3, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17 und IFN<sub>γ</sub> wurden mit Hilfe der DuoSet-ELISA von R&D durchgeführt. Für die Konzentrationsbestimmung von IgE wurde ein ELISA Kit von Biolegend verwendet, während für IgM ein Kit von Invitrogen verwendet wurde. Für die Detektion von MOG<sub>35-55</sub>-spezifischen Antikörpern wurde ein selbstständig entwickelter und optimierter ELISA durchgeführt. Bei der Durchführung der ELISA wurden weitestgehend die von den Herstellern zur Verfügung gestellten Protokolle befolgt, wobei Anpassungen bezüglich der eingesetzten Volumina pro Well bzw. der Inkubationszeiten erfolgten. Die vorgenommenen Änderungen hatten keinen Einfluss auf die Verlässlichkeit oder die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse.

Die verwendeten Verdünnungen und Konzentrationen sind in Tabelle 14 aufgeführt.

#### **Konzentrationsbestimmung von IL-3, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, IFN<sub>γ</sub> und IgE**

Zunächst wurde eine 96-Well Platte mit F-Boden mit dem *Capture Antibody* mit einer Verdünnung von 1:120 (bzw. 1:180 bei IL-3 und 1:200 bei IgE) in PBS (bzw. *Coating Puffer* bei IgE) mit 60 µl/Well über Nacht bei RT (bzw. bei 4 °C bei IgE) inkubiert. Am



nächsten Tag wurde die Platte durch dreimaliges Einfüllen und anschließendes Absaugen mit 300 µl/Well Waschpuffer gewaschen, wobei nach dem letzten Schritt eine vollständige Entleerung der Wells durch Invertieren und Ausklopfen der Platte erfolgte. Anschließend wurden die Wells mit 200 µl/Well 1 % *bovine serum albumin* (BSA) in PBS für 1 h bei RT blockiert. Nach der Durchführung eines weiteren Waschschrilles wurden die Proben und Standards mit jeweils 60 µl/Well auf die Platte gegeben und für 2 h bei RT inkubiert. Diese wurden dabei mit 1 % BSA/PBS verdünnt. Zur späteren Ermittlung einer Standarddeichkurve wurde vom Standard eine 1:2 Verdünnungsreihe in 1 % BSA/PBS mit insgesamt 7 Werten angefertigt. Zusätzlich diente ein Wert mit ausschließlich 1 % BSA/PBS als Blank. Nach der Inkubationszeit wurde ein weiterer Waschschrill durchgeführt. Anschließend erfolgte die Inkubation der Platte mit dem *Detection Antibody* mit einer Verdünnung von 1:60 (bzw. 1:180 bei IL-3 und 1:200 bei IgE) in 1 % BSA/PBS mit 60 µl/Well für 1 h bei RT. Es erfolgte ein weiterer Waschschrill. Danach wurden die Wells mit jeweils 60 µl Streptavidin-HRP B mit einer Verdünnung von 1:40 (bzw. Streptavidin-HRP A mit einer Verdünnung von 1:200 bei IL-3 und Avidin-HRP mit einer Verdünnung von 1:1000 bei IgE) in 1 % BSA/PBS für 20 Minuten (bzw. 30 Minuten bei IgE) bei RT im Dunklen inkubiert. Nach der Durchführung eines letzten Waschschrilles, wurde zur Detektion 100 µl/Well TMB, bestehend aus TMB Substrat A und TMB Substrat B in einem Verhältnis von 1:1, verwendet. Dieses wurde für 20 Minuten bei RT im Dunklen inkubiert. Um die Umsetzung des Substrates zu stoppen, wurden 50 µl 12,5 % Schwefelsäure (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) zu den Wells gegeben. Die Absorption der einzelnen Wells der Platte konnte anschließend mit Hilfe des Tecan-Mikroplattenreaders bei einer Wellenlänge von 450 nm und einer Referenzwellenlänge von 540 nm (bzw. 570 nm bei IgE) bestimmt werden.

### **Konzentrationsbestimmung von IgM**

Die Inkubation der Wells einer 96-Well Platte mit F-Boden mit dem *Capture Antibody* erfolgte mit einer Verdünnung von 1:250 in PBS mit 60 µl/Well über Nacht bei 4 °C. Am nächsten Tag wurde die Platte durch dreimaliges Einfüllen und anschließendes Absaugen mit 300 µl/Well Waschpuffer gewaschen, wobei nach dem letzten Schritt eine vollständige Entleerung der Wells durch Invertieren und Ausklopfen der Platte erfolgte. Die Wells wurden anschließend mit 250 µl/Well *Blocking Buffer* (1:10 Verdünnung des *Assay Buffer A Concentrate 20x* in vollentsalztem Wasser) für 2 h bei RT

blockiert. Zur späteren Ermittlung einer Standarddeichkurve wurde vom Standard eine 1:2 Verdünnungsreihe in *Assay Buffer A (1x)* mit insgesamt 7 Werten angefertigt. Zusätzlich diente ein Wert mit ausschließlich *Assay Buffer A (1x)* als Blank. Der Standard wurde dabei mit destilliertem Wasser gelöst und anschließend für 10-30 Minuten bis zur Verwendung in der Verdünnungsreihe bei RT inkubiert. Nach der Durchführung eines weiteren Waschschruttes wurden die Proben und der Standard mit jeweils 60 µl/Well auf die Platte gegeben und für 2 h bei RT inkubiert. Die Proben wurden dabei mit *Assay Buffer A (1x)* verdünnt. Nach der Inkubationszeit wurde ein weiterer Waschschrut durchgeföhrt. Anschließend erfolgte die Inkubation der Platte mit dem *Detection Antibody* mit einer Verdünnung von 1:250 in *Assay Buffer A (1x)* mit 60 µl/Well für 1 h bei RT. Nach der Durchführung eines letzten Waschschruttes wurden die Wells mit jeweils 100 µl Substrat Fertiglösung für 15 Minuten bei RT im Dunklen inkubiert. Zum Abstoppen der Substratumsetzung wurden 50 µl 12,5 % Schwefelsäure (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) zu den Wells gegeben, woraufhin die Absorption der einzelnen Wells der Platte mit Hilfe des Tecan-Mikroplattenreaders bei einer Wellenlänge von 450 nm und einer Referenzwellenlänge von 570 nm bestimmt wurde.

### **Konzentrationsbestimmung von MOG<sub>35-55</sub>-spezifischen Immunglobulinen**

Zunächst wurde eine 96-Well Platte mit F-Boden mit 10 µg/ml MOG<sub>35-55</sub>-Peptid in PBS mit 60 µl/Well über Nacht bei 4 °C *gecoatet*. Am Nächsten Tag wurden die Wells durch Invertierung der Platte ausgeschüttet. Anschließend wurden die Wells mit 200 µl/Well 2 % BSA/PBS für 2 h bei RT blockiert. Nach der Inkubationszeit wurde die Platte durch dreimaliges Einfüllen und anschließendes Absaugen mit 300 µl/Well Waschpuffer gewaschen, wobei nach dem letzten Schrit eine vollständige Entleerung der Wells durch Invertieren und Ausklopfen der Platte erfolgte. Danach wurden die Proben mit jeweils 60 µl/Well auf die Platte gegeben und für 2 h bei RT inkubiert. Nach der Durchführung eines weiteren Waschschruttes wurden die Wells mit dem Detektionsantikörper *rabbit-anti-mouse immunglobulins/HRP P0260* mit einer Verdünnung von 1:2000 in 2 % BSA/PBS mit 60 µl/Well für 1 h bei RT im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurde die Platte erneut gewaschen und 100 µl 2,2'-Azino-di(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure) (ABTS) pro Well zugegeben. Nach einer Inkubation von 20-30 Minuten im

Dunklen wurde die Absorption der einzelnen Wells der Platte mit Hilfe des Tecan-Mikroplattenreaders bei einer Wellenlänge von 405 nm und einer Referenzwellenlänge von 490 nm bestimmt.

**Tabelle 14: Im ELISA verwendete Verdünnungen und Konzentrationen.** Dargestellt sind die Verdünnungen und Konzentrationen der jeweiligen *Capture* und *Detection Antibodies*, sowie die Konzentrationen des Start- und End-Wertes der Standards der verwendeten ELISAs.

<b>ELISA</b>	<b>Standard (Start / Ende)</b>	<b>Konzentration <i>Capture Anti- body</i> (Stock / verwendet)</b>	<b>Konzentration <i>Detection Anti- body</i> (Stock / verwendet)</b>	<b>Verdünnung der Proben</b>
IL-3	500 pg/ml / 7,81 pg/ml	360 µg/ml / 2 µg/ml	18 µg/ml / 100 ng/ml	1:3
IL-4	500 pg/ml / 7,81 pg/ml	480 µg/ml / 4 µg/ml	12 µg/ml / 200 ng/ml	1:3
IL-6	500 pg/ml / 7,81 pg/ml	240 µg/ml / 2 µg/ml	4,5 µg/ml / 75 ng/ml	1:3
IL-10	2000 pg/ml / 31,25 pg/ml	480 µg/ml / 4 µg/ml	15 µg/ml / 250 ng/ml	1:3
IL-17	1000 pg/ml / 15,63 pg/ml	240 µg/ml / 2 µg/ml	3 µg/ml / 50 ng/ml	1:3
IFN $\gamma$	2000 pg/ml / 31,25 pg/ml	480 µg/ml / 4 µg/ml	12 µg/ml / 200 ng/ml	1:30
IgE	10n g/ml / 0,16 ng/ml	vom Hersteller nicht angegeben	vom Hersteller nicht angegeben	1:300 – 1:1.500
IgM	25 ng/ml / 0,39 ng/ml	vom Hersteller nicht angegeben	vom Hersteller nicht angegeben	1:100.000
MOG	-	50 mg/ml / 10 µg/ml	1,3 mg/ml / 650 ng/ml	1:10

### 3.2.8 Depletion von IgE aus Plasma

Bei Streptavidin Sepharose handelt es sich um ein Medium der Affinitätschromatographie zur Aufreinigung von biotinylierten Biomolekülen, bei welcher Streptavidin an Sepharose immobilisiert wurde [141].

Um IgE aus 1 ml Plasma komplett zu entfernen, wurden jeweils 300 µl Streptavidin Sepharose mit 300 µg Biotin anti-Maus IgE bzw. mit PBS als Kontrolle beladen und für eine Stunde auf einem Rotator mit 25 rpm bei RT inkubiert. Daraufhin wurde die beladene Sepharose fünf Mal durch Zentrifugation bei 2000 rpm und 4 °C für 4 Minuten und anschließendes Resuspendieren mit PBS gewaschen. Jeweils 1 ml Plasma wurde mit 150 µl anti-Maus IgE-beladener Streptavidin Sepharose bzw. 150 µl PBS-beladener Streptavidin Sepharose als Kontrolle für eine Stunde auf einem Rotator mit 25 rpm bei RT inkubiert. Die Sepharose wurde durch Zentrifugation bei 2000 rpm und 4 °C für 4 Minuten entfernt, indem das als Überstand vorhandene Plasma anschließend in ein neues Reagiergefäß überführt wurde. Das Plasma wurde ein weiteres Mal mit 150 µl anti-Maus IgE-beladener Streptavidin Sepharose bzw. 150 µl PBS-beladener Streptavidin Sepharose als Kontrolle für eine Stunde auf einem Rotator mit 25 rpm bei RT inkubiert. Die Sepharose wurde abermals durch Zentrifugation bei 2000 rpm und 4 °C für 4 Minuten entfernt. Das behandelte Plasma wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

### 3.3 Durchflusszytometrische Zellsortierung

Die Methode der Durchflusszytometrie wurde verwendet, um sowohl die Anzahl an Zellen als auch deren Charakterisierung hinsichtlich Struktur, Größe, Expression von Oberflächenmarkern und intrazellulärer Zusammensetzung aus Einzelzellsuspensionen bestimmen zu können. Da hierfür Fluorochrom-gekoppelte Antikörper verwendet werden, die an spezifische Antigene auf der Oberfläche bzw. im Inneren von Zellen binden, wird die Technik auch als *fluorescence activated cell sorting* (Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung, FACS) bezeichnet. Neben der Messung der Bindung von Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern, basiert die FACS-Analyse ebenfalls auf der Messung von spezifischen Streulichteigenschaften von Zellen.

Das Durchflusszytometer lässt sich in das Flüssigkeitssystem, das optische System und das elektronische System unterteilen. Das Flüssigkeitssystem ist dafür verantwortlich, dass die in einer Trägerflüssigkeit enthaltenen markierten Zellen mittels hydrodynamischer Fokussierung einzeln durch die vom Gerät erzeugten Laserstrahlen geleitet und angeregt werden, wodurch charakteristische Streu- und Fluoreszenzsignale erzeugt werden. Durch die im optischen System des Durchflusszytometers enthaltenen Filter und Spiegel werden die emittierten Strahlungen unterschiedlicher Wellenlänge voneinander getrennt und deren Signale durch *photo multiplier tubes* (PMT) verstärkt. Mit Hilfe des elektrischen Systems werden diese in elektronische Signale umgewandelt. Durch die Anregung der Zellen mit dem blauen Laser wird sowohl das Vorwärtsstreulicht (*forward scatter*, FSC), welches bei 180° gemessen wird, als auch das Seitwärtsstreulicht (*side scatter*, SSC), welches bei 90° gemessen wird, ermittelt. Dabei liefert das Vorwärtsstreulicht Informationen über die Zellgröße, während das Seitwärtsstreulicht Informationen über die Granularität der Zelle liefert. Fluoreszenzsignale der an die Zelle gebundenen Fluorochrome werden ebenfalls durch das Seitwärtsstreulicht detektiert. Die Intensität des Signals (mittlere Fluoreszenzintensität, MFI) ist direkt proportional zur Zahl der an Antigene gebundenen Fluorochrom-konjugierten Antikörper und somit zur Anzahl an durch die Zelle exprimierten Antigenen [142-144].

### 3.3.1 Extrazelluläre Färbung zur FACS-Analyse

Es wurden je nach Versuchsaufbau entweder Zellen, die zuvor in einer Zellkultur stimuliert wurden (beschrieben unter 3.2.6) oder Einzelzellsuspensionen aus präparierten Organen (beschrieben unter 3.2.1 und 3.2.3) für eine FACS-Analyse extrazellulär gefärbt. Hierfür wurden die Einzelzellsuspensionen, die aus den zu analysierenden Organen hergestellt wurden, mit jeweils 100 µl in FACS-Röhrchen überführt. Dabei wurden ein halbes Gehirn, 1/10 bis 1/30 der Milz (je nach Größe des Organs), ein komplettes Rückenmark bzw. 100 µl vom Blut verwendet. Zur Färbung von stimulierten Zellen wurden die Zellen eines kompletten Wells angefärbt, wobei zunächst 180 µl des Zellkulturüberstands abgenommen wurden und bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert wurden.

### **Direkte extrazelluläre Färbung**

Zunächst wurde eine extrazelluläre Färbung mit Fluorochrom-konjugierten Antikörpern mit einer Inkubationszeit von 15 Minuten bei 4 °C im Dunklen durchgeführt. Die in den jeweiligen Versuchen verwendeten Antikörper und Verdünnungen sind in Tabelle 15 dargestellt. Die Färbung wurde durch das Waschen der Zellen mit 4 ml 0,9 % NaCl (bzw. 200 µl PBS bei der Färbung in einer Platte) abgestoppt. Die Zellen wurden bei 1600 rpm und 4 °C für 6 Minuten (bzw. 2400 rpm und 4 °C für 5 Minuten bei der Färbung in einer Platte) zentrifugiert, der Überstand abgesaugt (bzw. abgekippt bei der Färbung in einer Platte) und die Zellen resuspendiert. Die in der Platte gefärbten Zellen wurden nun mit 100 µl PBS in FACS-Röhrchen überführt. Bei den Zellsuspensionen, die Erythrozyten enthielten, wurde anschließend eine Erythrozyten-Lyse durchgeführt, da diese in der FACS-Analyse stören würden. Zu diesem Zweck wurden zu den Milz- und Blutzellen jeweils 1 ml *FACS Lysing Solution* zugegeben, gevortext und für 10 Minuten bei RT im Dunklen inkubiert. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 3 ml 0,9 % NaCl und eine darauffolgende Zentrifugation bei 1600 rpm und 4 °C für 6 Minuten abgestoppt. Die Blutproben wurden ein weiteres Mal unter gleichen Bedingungen mit 4 ml 0,9 % NaCl gewaschen, da in den Proben sonst zu viele tote Erythrozyten verbleiben würden. Nachdem der Überstand abgesaugt wurde, konnten zu allen Proben 20 µl *Counting Beads* zugegeben werden. Die gefärbten Zellen konnten anschließend am FACS Canto II gemessen werden. Zellen aus dem Gehirn bzw. dem Rückenmark wurden für 90 Sekunden aufgenommen, während die restlichen Zellen für jeweils 60 Sekunden gemessen wurden.

### **Extrazelluläre Färbung mit sekundärem Antikörper R0439**

Zur Färbung der Zellen unter Verwendung des Antikörpers *Polyclonal Rabbit Anti-Mouse Immunoglobulins/RPE, Rabbit F(ab')<sub>2</sub>* (R0439), welcher alle auf der Zelle vorhandenen Immunglobuline anfärbt, mussten die Zellen zunächst drei Mal gewaschen werden. Es wurden 4 ml 0,9 % NaCl zu den Zellen gegeben, welche anschließend bei 1600 rpm und 4 °C für 6 Minuten zentrifugiert wurden. Nach Absaugen des Überstandes nach dem dritten Waschschrift konnten die Zellen mit dem PE-konjugierten Antikörper R0439 gefärbt werden. Die Inkubationszeit hierfür betrug 30 Minuten bei 4 °C

im Dunklen. Nach erfolgter Inkubation wurden die Zellen mit 4 ml 0,9 % NaCl gewaschen und erneut unter gleichen Bedingungen zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Daraufhin wurde zu den Zellen *Normal Mouse Serum* mit einer Verdünnung von 1:10 gegeben und für 15 Minuten bei 4 °C im Dunklen inkubiert. Als nächster Schritt erfolgte die extrazelluläre Färbung der Zellen direkt, ohne einen weiteren Waschschritt. Es wurde wie unter 3.3.1 Direkte extrazelluläre Färbung weiter verfahren.

**Tabelle 15: In der FACS-Analyse verwendete Fluorochrom-konjugierte Antikörper und Verdünnungen.** Dargestellt sind die für die FACS-Färbung verwendeten Antikörper samt der konjugierten Fluorochrome, sowie die eingesetzten Verdünnungen.

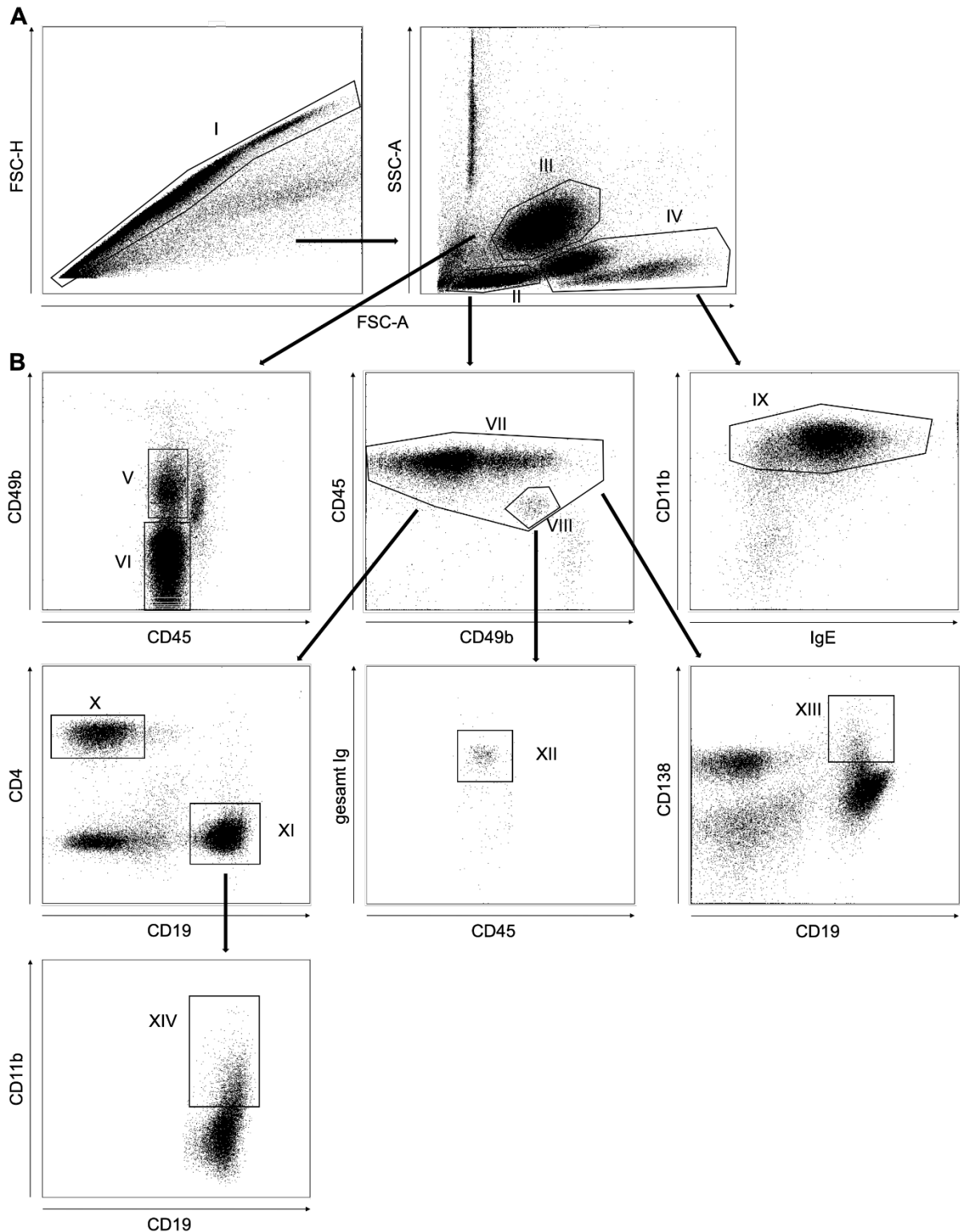
Antikörper	Fluorochrom	Verdünnung
CD45	V500	1:100
CD49b	eF450	1:100
IgE	FITC	1:100
CD11b	PE-Cy7	1:200
R0439	PE	1:100
CD19	PerCp-Cy5.5	1:100
CD4	APC eFluor 780	1:100
CD138	APC	1:200

### 3.3.2 Quantifizierung durchflusszytometrischer Analysen

Für die Vergleichbarkeit von Zellpopulationen innerhalb eines Versuches wurden die Zellsuspensionen immer gleich lange und mit derselben Durchflussrate am Durchflusszytometer aufgenommen, um die Anzahl an Zellen in Abhängigkeit der Zellen im gesamten Organ bestimmen zu können. Die Auswertung erfolgte in dem Programm FACSDiva von BD, in welchem die Daten als korrelierte Zweiparameterdarstellung in einem *Dot Plot* (Punktediagramm) dargestellt wurden. Hierbei steht jeder abgebildete Punkt für eine Zelle mit den zwei dargestellten Eigenschaften. Zur Quantifizierung wur-

den die Zellpopulationen durch *Gates* eingegrenzt. In Abbildung 9A ist die Grundlegende Gating-Strategie dargestellt, die für jeden Versuchsaufbau, egal mit welchen Fluorochrom-konjugierten Antikörpern gefärbt wurde, gleich durchgeführt wurde. Zunächst wurden Zell-Dupletten ausgeschlossen (Abbildung 9, I), woraufhin Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten identifiziert werden konnten (Abbildung 9, II, III und IV). Auf diesem Gating basierend konnten je nach Fragestellung weitere Unterpopulationen identifiziert werden, was exemplarisch an einem Beispiel in Abbildung 9B gezeigt wurde. Aus dem Gate der Granulozyten konnte durch eine unterschiedlich starke Expression des Markers CD49b eine Unterscheidung von Eosinophilen Granulozyten (Abbildung 9B, V) und Neutrophilen Granulozyten (Abbildung 9B, VI) getroffen werden. Basierend auf dem Monozyten Gate konnten CD11b<sup>+</sup> Monozyten identifiziert werden (Abbildung 9B, IX). Ausgehend vom Lymphozyten Gate konnten zunächst CD45<sup>+</sup> Lymphozyten (Abbildung 9B, VII) eingegrenzt werden. Daraufhin erfolgte durch die Marker CD4 und CD19 eine Abgrenzung von CD4<sup>+</sup> T-Zellen (Abbildung 9B, X) und CD19<sup>+</sup> B-Zellen (Abbildung 9B, XI). B-Zellen konnten weiter differenziert werden in CD11b<sup>+</sup> B-Zellen (Abbildung 9B, XIV). Basierend auf den CD45<sup>+</sup> Lymphozyten konnten außerdem CD138<sup>+</sup> B-Zellen (Abbildung 9B, XIII) eingegrenzt werden. Innerhalb der CD45<sup>+</sup> Lymphozyten konnte eine Population identifiziert werden, welche etwas weniger CD45 auf ihrer Zelloberfläche besaß (Abbildung 9B, VIII). Durch eine Darstellung dieser Zellen zusammen mit gesamt Ig gefärbten Zellen, konnten die Basophilen abgegrenzt werden (Abbildung 9B, XII).





**Abbildung 9: Gatingstrategie.** (A) Gate I: Eliminierung von Zell-Dupletten, Gate II: Eingrenzung von Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten. (B) Repräsentative FACS Dot Plots der Blutprobe einer Kontroll-Maus mit EAE am Versuchsende. Gate V: Identifikation von Eosinophilen Granulozyten durch erhöhte CD49b Expression, Gate VI: Eingrenzung von Neutrophilen Granulozyten durch eine niedrige Expression an CD49b, Gate VII: CD45<sup>+</sup> Lymphozyten, Gate VIII: CD45<sup>+</sup> Lymphozyten mit leicht verminderter Expression von CD45, Gate IX: Abgrenzung von CD11b<sup>+</sup> Monozyten basieren auf Gate IV, Gate X: Identifikation von CD4<sup>+</sup> T-Zellen, Gate XI: Eingrenzung von CD19<sup>+</sup> B-Zellen, Gate XII: Identifikation von Basophilen, basierend auf Gate VIII, Gate XIII: Identifikation von CD138<sup>+</sup> B-Zellen, Gate XIV: Erfassung von CD11b<sup>+</sup> B-Zellen, basierend auf Gate XI.

### 3.4 Statistische Auswertung

Alle aus den FACS-Analysen erhaltenen Daten wurden mittels der FACS-Diva Software 8.0.2 analysiert und in Zahlenwerte umgewandelt, während alle Berechnungen mit Microsoft Excel durchgeführt wurden. Die statistische Auswertung und alle Graphen wurden mit GraphPad Prism 8.0.1 erstellt. Die Mittelwerte der Versuchsgruppen wurden dabei als arithmetisches Mittel  $\pm$  *Standard Error of the Mean* (SEM) dargestellt. Zur Bestimmung von statistischen Signifikanzen zwischen zwei Gruppen wurde bei Normalverteilung ein zweiseitiger ungepaarter T-Test durchgeführt. Für Mehrfachvergleiche wurde ein Einfaktorieller bzw. ein Zweifaktorieller ANOVA mit Dunnett's oder Bonferroni's post-hoc-Tests verwendet. Als Signifikanzniveau wurde ein Wert von 0,05 angenommen (\* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ ; \*\*\*\* =  $p < 0,0001$ ).

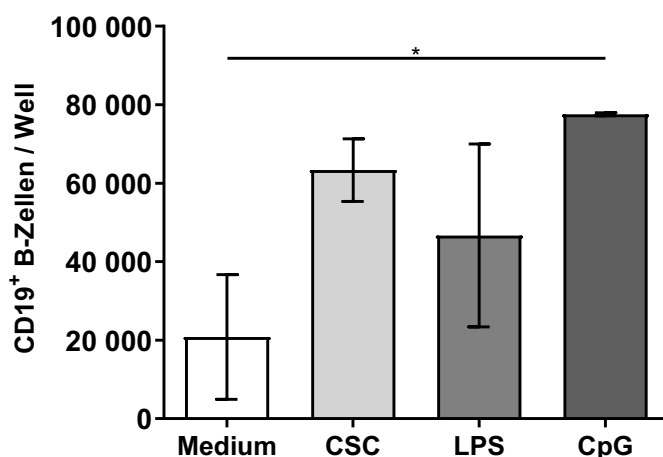
## 4. Ergebnisse

### 4.1 Einfluss von CSC auf B-Zellen *in vitro*

Anhand von aus Milzen von BI/6N Mäusen isolierten B-Zellen konnte der Einfluss von CSC *in vitro* untersucht werden. Hierfür wurden die Zellen mit CSC und weiteren Stimulanzen für 4 bis 5 Tage kultiviert. Anschließend konnten die stimulierten B-Zellen mittels FACS-Analyse auf eine mögliche Proliferation oder Modulation von Oberflächenrezeptoren getestet werden bzw. konnte mittels ELISA die Sekretion von Zytokinen im Zellkulturüberstand bestimmt werden.

#### 4.1.1 Proliferation von B-Zellen

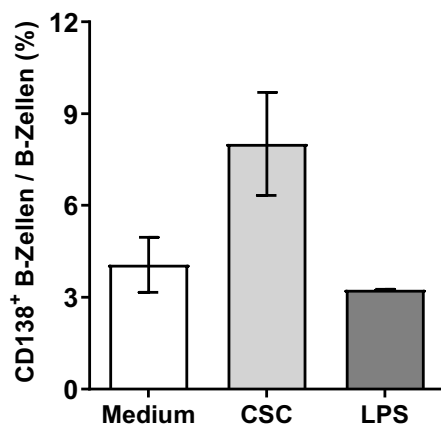
Wurden naive B-Zellen für 5 Tage mit CSC stimuliert, stieg die detektierte Zellzahl auf  $63.357 \pm 11.251$  (Kontrolle  $20.800 \pm 5.642,5$ ) (Abbildung 10). Gleichermäßen bewirkte die Stimulation mit LPS und CpG eine Erhöhung B-Zellen. LPS konnte die Anzahl an B-Zellen auf  $46.600 \pm 16.485,5$  erhöhen, während nach Stimulation mit CpG  $77.500 \pm 248$  B-Zellen vorhanden waren.



**Abbildung 10: Proliferation von B-Zellen nach Stimulation mit CSC für 5 Tage.** Aus der Milz einer naiven BI/6N Maus wurden B-Zellen mittels MACS isoliert und anschließend für 5 Tage mit Medium, mit CSC (200 µg/ml), mit LPS (1 µg/ml) bzw. mit CpG (1 nM) bei 37 °C im Brutschrank kultiviert. Anschließend erfolgte eine Färbung mit Fluorochrom-konjugierten Antikörpern und eine FACS-Analyse. Dargestellt ist der Mittelwert der gemessenen CD19<sup>+</sup> B-Zellen ± SEM (n = 2). Statistische Auswertung mit einseitigem ANOVA. \* = p < 0,05; \*\* = p < 0,01; \*\*\* = p < 0,001; \*\*\*\* = p < 0,0001.

### 4.1.2 Modulation von Oberflächenrezeptoren auf B-Zellen

Die Veränderung der Expression von Oberflächenrezeptoren durch eine Stimulation von naiven B-Zellen mit CSC, LPS bzw. CpG für 4 Tage ist in Abbildung 11 dargestellt. Die Stimulation von B-Zellen mit CSC erhöhte den Anteil an CD138<sup>+</sup> B-Zellen innerhalb der B-Zellen auf  $8,01 \pm 1,19$  % (Kontrolle  $4,07 \pm 0,64$  %), während die Stimulation mit LPS nicht zu einer Erhöhung des prozentualen Anteils von CD138<sup>+</sup> B-Zellen führte ( $3,24 \pm 0,02$  %).

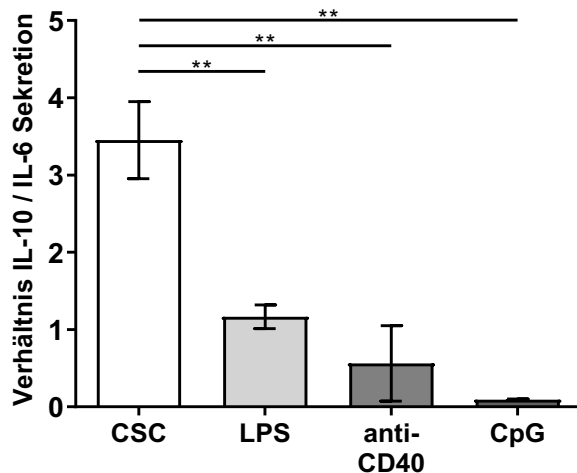


**Abbildung 11: Modulation von CD138 auf B-Zellen nach Stimulation für 4 Tage.** Aus der Milz einer naiven B1/6N Maus wurden B-Zellen mittels MACS isoliert und anschließend für vier Tage mit Medium, CSC (200 µg/ml) bzw. LPS (1 µg/ml) bei 37 °C im Brutschrank kultiviert. Anschließend erfolgte eine Färbung mit Fluorochrom-konjugierten Antikörpern und eine FACS-Analyse. Dargestellt ist der Mittelwert des prozentualen Anteils der CD138<sup>+</sup> B-Zellen an den gesamten B-Zellen ± SEM (n = 2). Statistische Auswertung mit einseitigem ANOVA. \* = p < 0,05; \*\* = p < 0,01; \*\*\* = p < 0,001; \*\*\*\* = p < 0,0001.

### 4.1.3 Sekretion von Zytokinen durch B-Zellen

Das Verhältnis der Sekretion von antiinflammatorischen zu proinflammatorischen Zytokinen einer Zelle kann einen Hinweis darauf geben, ob diese einen regulatorischen Phänotyp, oder umgekehrt, besitzt [145]. Der Zellkulturüberstand von naiven B-Zellen, die für 4 Tage mit CSC, LPS, αCD40, oder CpG stimuliert wurden, wurde auf die Sekretion der Zytokine IL-10 und IL-6 untersucht. In Abbildung 12 ist das Verhältnis der Konzentrationen von IL-10 und IL-6 im Zellkulturüberstand dargestellt. Es ist zu erkennen, dass nach Stimulation mit CSC ein IL-10 / IL-6-Verhältnis von  $3,45 \pm 0,35$  vorhanden ist. Die Stimulation mit LPS führte zu einem Wert von  $1,17 \pm 0,11$  und die

Stimulation mit  $\alpha$ CD40 erzielte ein Verhältnis von  $0,56 \pm 0,34$ . Das geringste Zytokin-Verhältnis mit  $0,09 \pm 0,01$  war durch die Stimulation der B-Zellen mit CpG zu erkennen.



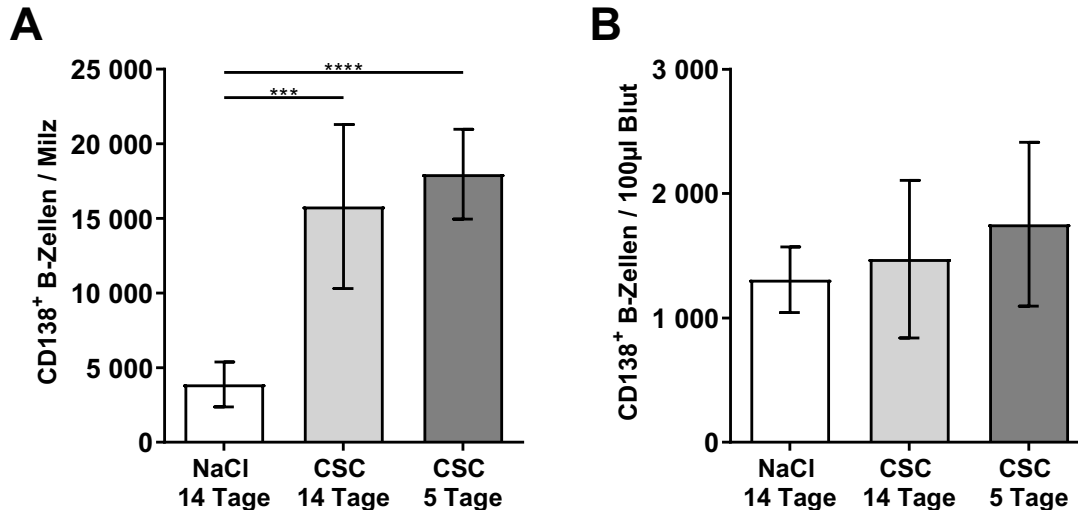
**Abbildung 12: Sekretion von IL-6 und IL-10 durch B-Zellen.** Aus der Milz einer naiven Bl/6N Maus wurden B-Zellen mittels MACS isoliert und anschließend für 4 Tage mit CSC (200  $\mu$ g/ml), LPS (1  $\mu$ g/ml),  $\alpha$ CD40 (1  $\mu$ g/ml) bzw. CpG (1 nM) bei 37 °C im Brutschrank kultiviert. Anschließend wurde der Zellkulturüberstand gewonnen, in welchem die Zytokinkonzentrationen von IL-6 und IL-10 mittels ELISA bestimmt wurden. Dargestellt ist das Verhältnis der IL-10 Konzentration zur IL-6 Konzentration  $\pm$  SEM (n = 2). Statistische Auswertung mit einseitigem ANOVA. \* = p < 0,05; \*\* = p < 0,01; \*\*\* = p < 0,001; \*\*\*\* = p < 0,0001.

## 4.2 Einfluss von CSC auf B-Zellen *in vivo*

Neben dem Einfluss einer CSC-Stimulation auf B-Zellen *in vitro*, sollten ebenfalls die Effekte von CSC im *in vivo* System untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden naive Bl/6N Mäuse täglich für 14 Tage mit NaCl oder CSC (10 mg / Injektion) bzw. für 5 Tage mit CSC (10 mg / Injektion) i.p. behandelt. Am darauffolgenden Tag wurde den Mäusen Blut entnommen und die Milzen präpariert. Anschließend konnten die *in vivo* stimulierten B-Zellen mittels FACS-Analyse auf eine mögliche Modulation von Oberflächenrezeptoren getestet werden bzw. konnte mittels ELISA die Sekretion von Immunglobulinen ins Plasma bestimmt werden.

### 4.2.1 Modulation von Oberflächenrezeptoren

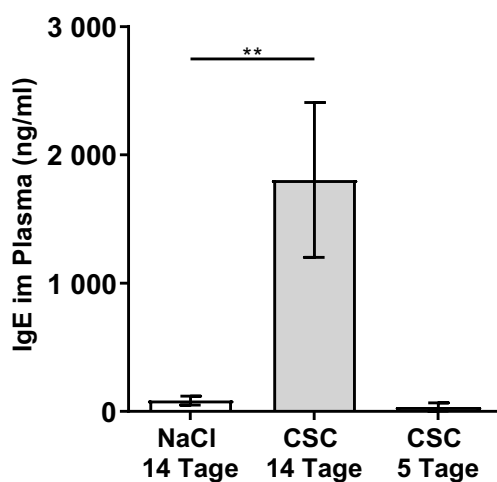
Die Veränderung der Expression des Oberflächenmarkers CD138 nach der Behandlung von naiven Bl/6N Mäusen mit NaCl bzw. CSC für 14 bzw. 5 Tage ist in Abbildung 13 dargestellt. Es ist zu erkennen, dass die Anzahl der CD138<sup>+</sup> B-Zellen in der Milz gleichermaßen sowohl durch die Behandlung der Mäuse mit CSC für 5 Tage als auch für 14 Tage signifikant anstieg (Abbildung 13A). Die Anzahl der CD138<sup>+</sup> B-Zellen in der Milz erhöhte sich von  $3.880,2 \pm 613,4$  (NaCl) auf  $15.796,7 \pm 2.454,5$  (14 Tage CSC) bzw.  $17.961,9 \pm 1.229,8$  CD138<sup>+</sup> B-Zellen (5 Tage CSC). Im Blut zeigte sich hingegen ein anderes Bild als in der Milz (Abbildung 13B). Unabhängig davon, ob die Mäuse mit NaCl oder mit CSC behandelt wurden, blieb die Anzahl der CD138<sup>+</sup> B Zellen etwa auf dem gleichen Level. Durch die Injektion von NaCl waren  $1.307,1 \pm 107,9$  CD138<sup>+</sup> B-Zellen in 100  $\mu$ l Blut vorhanden, während die Anzahl an CD138<sup>+</sup> B-Zellen nach der Injektion von CSC für 14 Tage  $1.472,7 \pm 258,7$  betrug. Nach der Behandlung mit CSC für 5 Tage waren  $1.753,2 \pm 268,6$  CD138<sup>+</sup> B-Zellen in 100  $\mu$ l Blut vorhanden.



**Abbildung 13: Modulation der Expression von CD138 durch CSC.** Naive Bl/6N Mäuse wurden täglich für 14 Tage mit NaCl oder CSC (10 mg / Injektion) bzw. für 5 Tage mit CSC (10 mg / Injektion) i.p. behandelt. Am darauffolgenden Tag wurde den Mäusen Blut abgenommen, sowie die Milz präpariert. Anschließend erfolgte eine Färbung mit Fluorochrom-konjugierten Antikörpern und eine FACS-Analyse. (A) Anzahl an CD138<sup>+</sup> B-Zellen in der Milz. (B) Anzahl an CD138<sup>+</sup> B-Zellen in 100  $\mu$ l Blut. Dargestellt ist der Mittelwert  $\pm$  SEM (n = 6). Statistische Auswertung mit einseitigem ANOVA. \* = p < 0,05; \*\* = p < 0,01; \*\*\* = p < 0,001; \*\*\*\* = p < 0,0001.

### 4.2.2 Sekretion von Immunglobulinen ins Plasma

Die Sekretion von IgE ins Plasma nach Stimulation von B-Zellen *in vivo* mit CSC bzw. NaCl ist in Abbildung 14 dargestellt. Nach der Behandlung der Mäuse mit NaCl waren  $85 \pm 20,1$  ng/ml IgE im Plasma vorhanden, während die Injektion von CSC für 5 Tage zu einer Konzentration von  $34,9 \pm 18,6$  ng/ml IgE im Plasma führte. Durch die Behandlung der Mäuse mit CSC für 14 Tage wurde die Konzentration an IgE im Plasma im Vergleich zur NaCl-Kontrolle signifikant auf  $1.803,9 \pm 427,2$  ng/ml IgE erhöht.



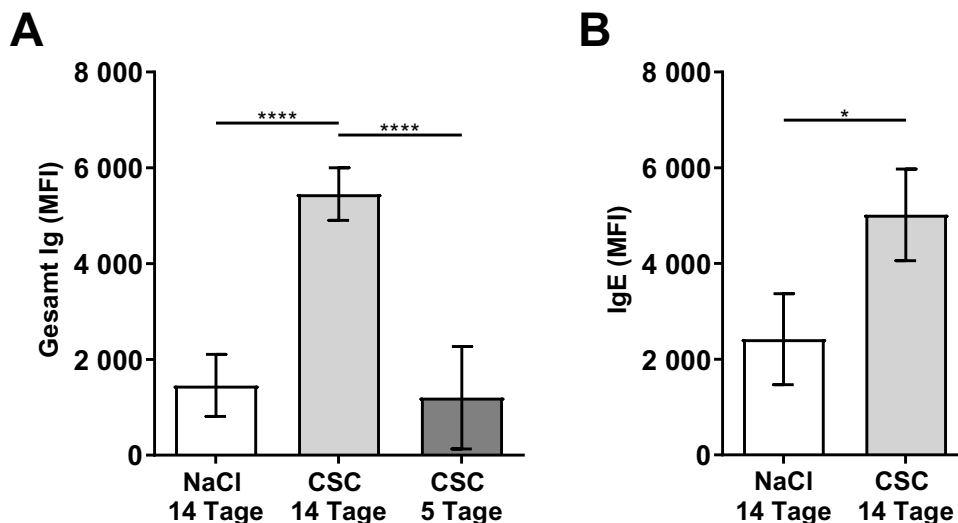
**Abbildung 14: Sekretion von IgE ins Plasma.** Naive Bl/6N Mäuse wurden täglich für 14 Tage mit NaCl oder CSC (10 mg / Injektion) bzw. für 5 Tage mit CSC (10 mg / Injektion) i.p. behandelt. Am darauffolgenden Tag wurde den Mäusen Blut entnommen, aus welchem Plasma gewonnen wurde. Die Sekretion von IgE ins Plasma wurde mittels ELISA bestimmt. Dargestellt ist der Mittelwert der Konzentration von IgE  $\pm$  SEM ( $n = 3$ ). Statistische Auswertung mit einseitigem ANOVA. \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ ; \*\*\*\* =  $p < 0,0001$ .

### 4.3 Einfluss von CSC auf Basophile *in vivo*

Zusätzlich zu den Effekten von CSC auf B-Zellen, sollte ebenfalls der Einfluss einer Stimulation mit CSC auf Basophile *in vivo* analysiert werden. Zu diesem Zweck wurden naive Bl/6N Mäuse täglich für 14 Tage mit NaCl oder CSC (10 mg / Injektion) bzw. für 5 Tage mit CSC (10 mg / Injektion) i.p. behandelt. Am darauffolgenden Tag konnten die Milzen und das Knochenmark präpariert werden. Anschließend konnten die *in vivo* stimulierten B-Zellen mittels FACS-Analyse auf eine mögliche Modulation von Oberflächenrezeptoren getestet werden. Zusätzlich wurden aus dem Knochenmark isolierte CD49b<sup>+</sup> Zellen stimuliert und anschließend deren Aktivierung mittels ELISA bestimmt.

### 4.3.1 Modulation der IgE-Bindung

Die Veränderung der Bindung von sekretierten Igs auf Basophilen in der Milz, nach Behandlung der Mäuse mit NaCl bzw. mit CSC ist in Abbildung 15 dargestellt. Die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) der gesamten auf der Zelloberfläche vorhandenen Igs stieg durch die Behandlung der Mäuse mit CSC für 14 Tage auf  $5.451,3 \pm 206,8$  (NaCl  $1.455,7 \pm 245,1$ ) an (Abbildung 15A). Durch die Injektion von CSC für 5 Tage lag die MFI des gesamt Ig bei  $1.202,1 \pm 404,6$ . Die MFI von IgE auf Basophilen erhöhte sich von  $2.420 \pm 548,1$  bei NaCl-Behandlung auf  $5.017,3 \pm 553,2$  bei Behandlung mit CSC für 14 Tage (Abbildung 15B).



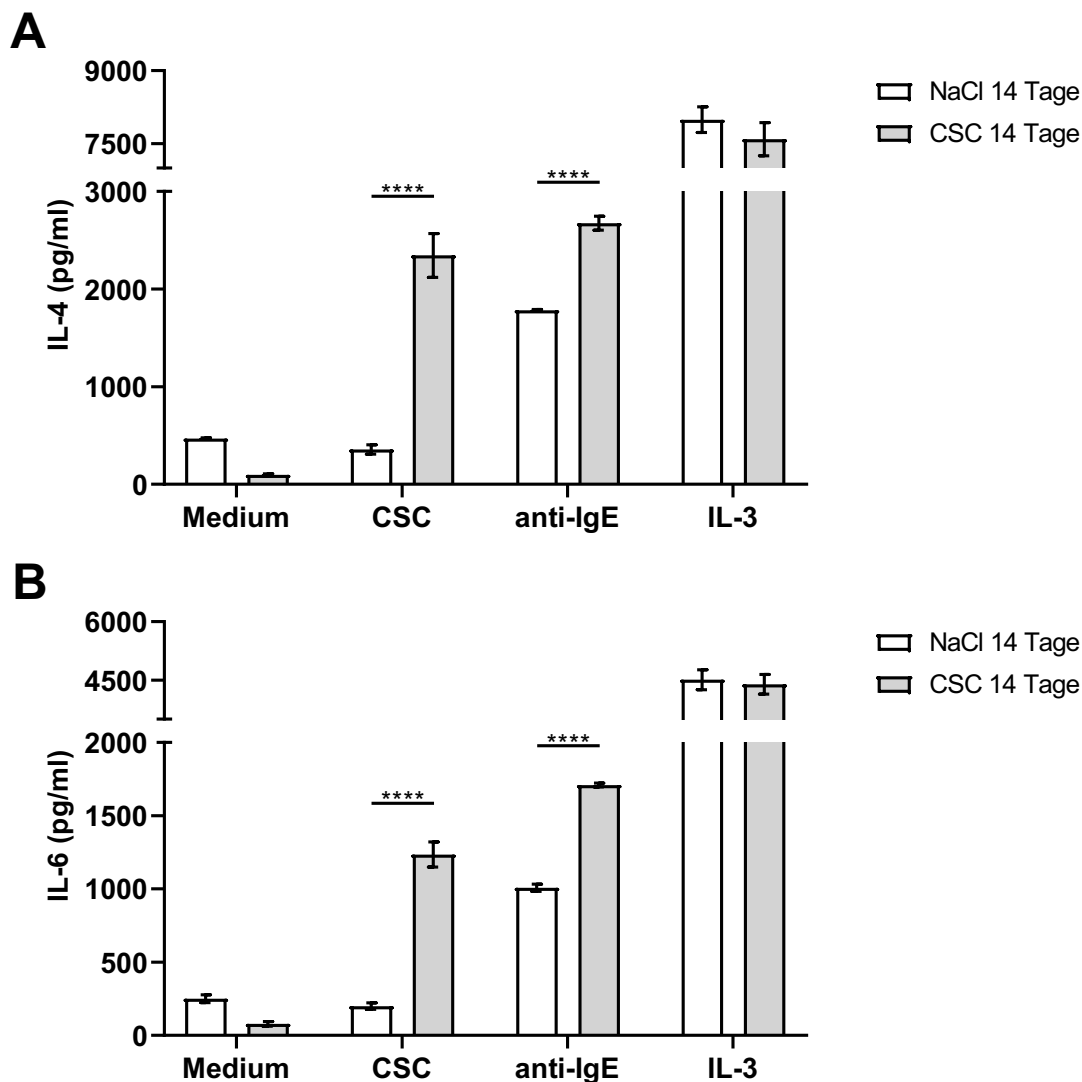
**Abbildung 15: Modulation der IgE-Bindung von Basophilen.** Naive BI/6N Mäuse wurden täglich für 14 Tage mit NaCl oder CSC (10 mg / Injektion) bzw. für 5 Tage mit CSC (10 mg / Injektion) i.p. behandelt. Am darauffolgenden Tag wurde die Milz präpariert. Anschließend erfolgte eine Färbung mit Fluorochrom-konjugierten Antikörpern und eine FACS-Analyse. (A) Mittlere Fluoreszenzintensität von gesamt Ig auf Basophilen (n = 7). (B) Mittlere Fluoreszenzintensität von IgE auf Basophilen (n = 3). Dargestellt ist der Mittelwert des Medianwertes  $\pm$  SEM. Statistische Auswertung bei (A) mit einseitigem ANOVA und bei (B) mit ungepaartem zweiseitigen T-Test. \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ ; \*\*\*\* =  $p < 0,0001$ .

### 4.3.2 Stimulation von CD49b<sup>+</sup> Zellen aus dem Knochenmark

Da aktivierte CD49b<sup>+</sup> Zellen, welche vor allem aus NK-Zellen und Basophilen bestehen, IL-4 und IL-6 sekretieren, wurde die erfolgreiche Stimulation von CD49b<sup>+</sup> Zellen mittels ELISA erfasst. Hierfür wurden aus dem Knochenmark isolierte CD49b<sup>+</sup> Zellen für 24 Stunden mit CSC,  $\alpha$ IgE oder IL-3 kultiviert und anschließend deren Sekretion von IL-4 und IL-6 in den Zellkulturüberstand bestimmt (Abbildung 16). CD49b<sup>+</sup> Zellen



sekretierten nur deutliche Mengen an IL-4 bzw. IL-6 nach Stimulation mit CSC, wenn die isolierten Zellen aus Mäusen stammten, die vorher für 14 Tage mit CSC behandelt wurden ( $357,6 \pm 28$  pg/ml IL-4 nach NaCl-Behandlung im Vergleich zu  $2.345 \pm 129,9$  pg/ml IL-4 nach CSC-Behandlung bzw.  $199,9 \pm 12,5$  pg/ml IL-6 nach NaCl-Behandlung im Vergleich zu  $1.235,1 \pm 49,4$  pg/ml IL-6 nach CSC-Behandlung). Die Stimulation der CD49b<sup>+</sup> Zellen mit  $\alpha$ IgE zeigte ebenfalls eine verstärkte Zytokin-Produktion, wenn die aktivierten Zellen aus Mäusen mit CSC-Vorbehandlung stammten. Die Stimulation durch  $\alpha$ IgE führte zu einer Sekretion von  $1.782,5 \pm 5,4$  pg/ml IL-4 bzw.  $1.008 \pm 14,7$  pg/ml IL-6 bei CD49b<sup>+</sup> Zellen, die aus NaCl-behandelten Mäusen stammten, während sie zu einer Sekretion von  $2.674,8 \pm 41,9$  pg/ml IL-4 bzw.  $1.709,6 \pm 7,4$  pg/ml IL-6 führte, wenn die stimulierten CD49b<sup>+</sup> Zellen aus Mäusen stammten, die für 14 Tage mit CSC behandelt wurden. Die Stimulierung von CD49b<sup>+</sup> Zellen durch IL-3 bzw. durch Medium zeigte keine signifikanten Unterschiede der beiden Vorbehandlungen, wobei IL-3 generell zu einer starken Aktivierung der CD49b<sup>+</sup> Zellen führte ( $7.593 \pm 197,3$  bis  $7.994,7 \pm 152,8$  pg/ml IL-4 bzw.  $4.394,8 \pm 144,5$  bis  $4.511,6 \pm 146,7$  pg/ml IL-6).



**Abbildung 16: Sekretion der Zytokine IL-4 und IL-6 durch CD49b<sup>+</sup> Zellen aus dem Knochenmark.** Naive BI/6N Mäuse wurden täglich für 14 Tage mit NaCl oder CSC (10 mg / Injektion) i.p. behandelt. Am darauffolgenden Tag wurde das Knochenmark präpariert und daraus CD49b<sup>+</sup> Zellen isoliert und anschließend für 24 Stunden mit Medium, mit CSC (10 µg/ml), mit αIgE (1 µg/ml) bzw. mit IL-3 (25 ng/ml) stimuliert und bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Die Sekretion von IL-4 bzw. IL-6 in den Zellkulturüberstand wurde mittels ELISA bestimmt. (A) Konzentration von IL-4 im Zellkulturüberstand. (B) Konzentration von IL-6 im Zellkulturüberstand. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM (n = 3). Statistische Auswertung mit zweiseitigem ANOVA. \* = p < 0,05; \*\* = p < 0,01; \*\*\* = p < 0,001; \*\*\*\* = p < 0,0001.

#### 4.4 Wirkweise von CSC im Maus-Modell der EAE

Neben den Effekten von CSC *in vivo* in naiven Mäusen sollte ebenfalls der Einfluss von CSC unter den Bedingungen einer inflammatorischen Autoimmunkrankheit untersucht werden. Zur Untersuchung dieser Fragestellung wurde das Modell der MOG<sub>35-55</sub>-induzierten EAE verwendet. Es wird vermutet, dass die Stimulation mit CSC B-Zellen in Richtung eines regulatorischen Phänotyps lenkt. Daher sollte mit Hilfe

dieses Modells untersucht werden, in welchem Maße und durch den Einfluss welcher Zellen bzw. welcher produzierten Proteine oder Botenstoffe eine Behandlung von EAE-immunisierten Mäusen mit CSC zu einer Unterdrückung der Krankheit führt.

#### **4.4.1 Behandlung mit CSC**

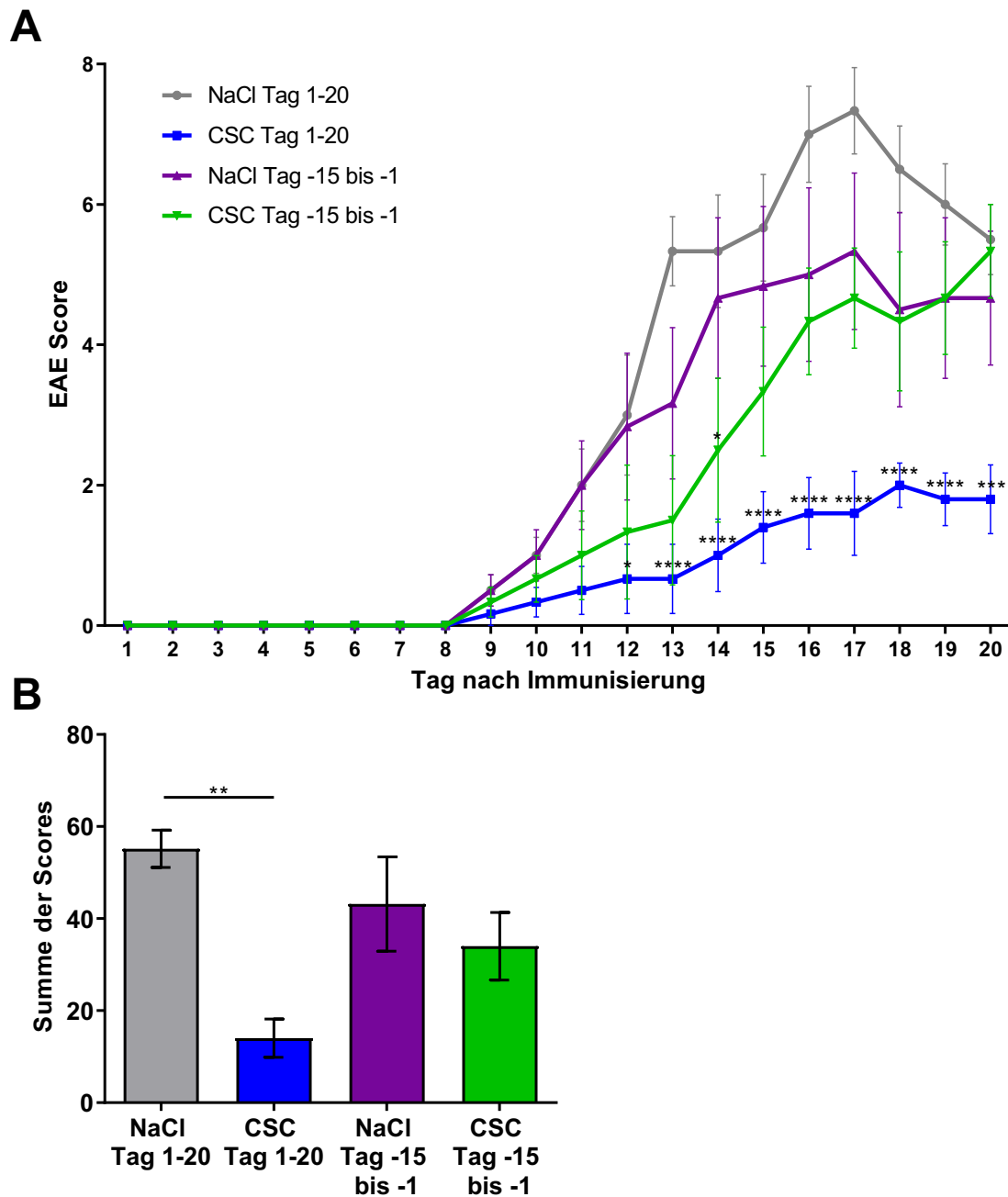
Zunächst wurden mit MOG<sub>35-55</sub>-immunisierte Mäuse durch eine direkte Applikation von CSC behandelt. Hierfür wurde den Mäusen 10 mg CSC i.p. injiziert. Die Injektion fand täglich und je nach Versuchsaufbau in unterschiedlichen Zeiträumen statt.

##### **4.4.1.1 Behandlung mit CSC vor und nach Immunisierung**

Naive Bl/6N Mäuse wurden durch s.c. Injektion von MOG<sub>35-55</sub>-Peptid zusammen mit CFA an Tag 0 immunisiert. Zur Untersuchung des direkten Einflusses der CSC-Behandlung während des Krankheitsverlaufes wurden die Mäuse durchgehend von Tag 1 bis Tag 20 mit CSC (direkte CSC-Behandlung) bzw. mit NaCl (direkte NaCl-Behandlung) als Kontrolle behandelt. Zwei weitere Gruppen wurden mit CSC bzw. mit NaCl als Kontrolle von Tag -15 bis Tag -1 (CSC-Vorbehandlung bzw. NaCl-Vorbehandlung) behandelt. Diese Gruppen dienen der Fragestellung, ob eine Behandlung mit CSC vor der Immunisierung einen positiven Effekt auf die Entwicklung der Krankheit haben könnte.

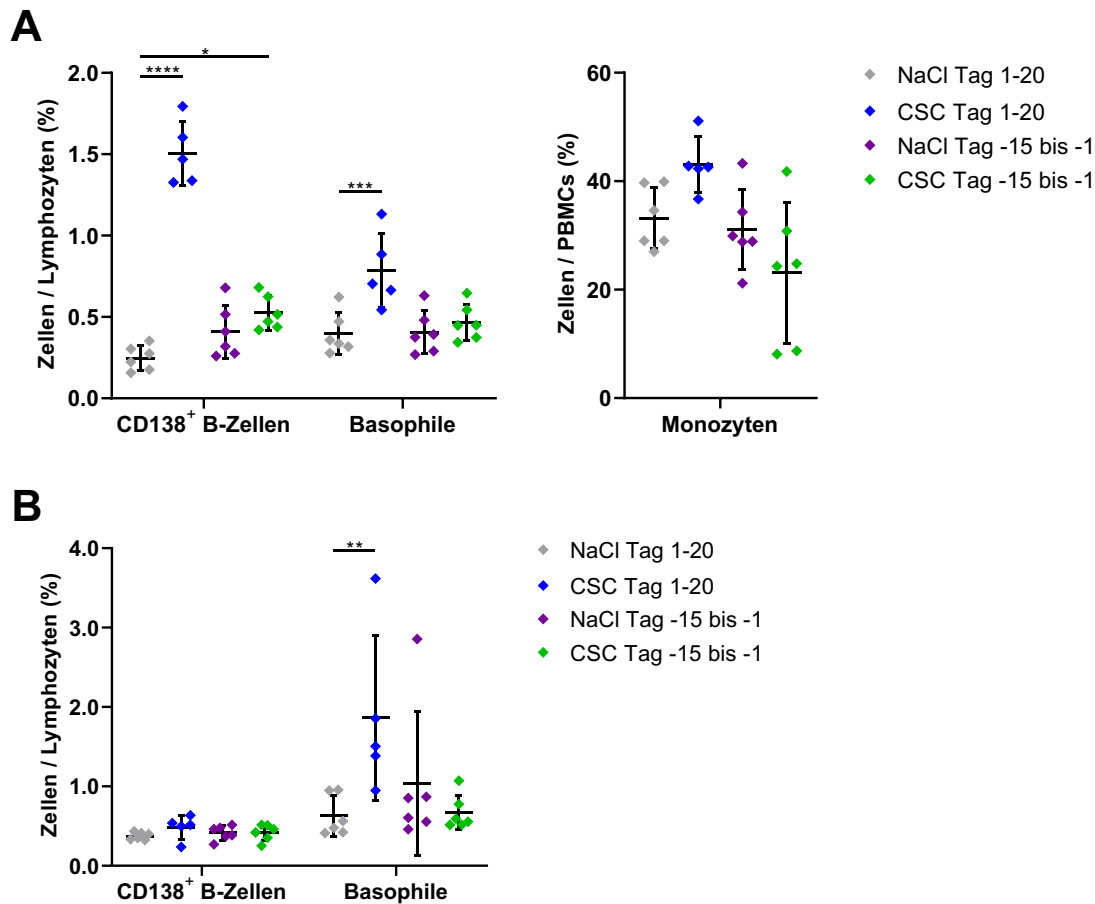
Der Verlauf der klinischen Symptome der EAE ist in Abbildung 17A dargestellt. Die ersten Symptome erschienen 9 Tage nach Immunisierung und steigerten sich bis etwa Tag 17, wobei anschließend ein leichter Abfall bzw. keine weitere Steigung erkennbar waren. Die direkte Behandlung der Mäuse mit CSC zeigte eine hochsignifikante Verbesserung des klinischen Scores von  $5,5 \pm 0,5$  (Tag 20) bis  $7,3 \pm 0,6$  (Tag 17) in der Kontrolle auf etwa  $1,6 \pm 0,6$  (Tag 17) bis  $1,8 \pm 0,5$  (Tag 20). Die Vorbehandlung mit CSC zeigte über den Zeitverlauf lediglich eine leichte Verbesserung des Scores im Vergleich zur Kontrolle, welcher sich jedoch gegen Ende des Experiments wieder an die Kontrolle anglich. Wurde die Summe der Scores während des Experiments betrachtet, wurde durch die direkte Behandlung mit CSC ( $14 \pm 4,2$ ) eine deutliche Ver-

besserung im Vergleich zur Kontrolle ersichtlich ( $55,2 \pm 4,1$ ), während die Vorbehandlung mit CSC ( $34 \pm 7,3$ ) nur eine leichte Verbesserung der klinischen Scores bedingte (Abbildung 17B).



**Abbildung 17: Klinischer EAE Score von Mäusen mit CSC-Behandlung vor und nach Immunisierung.** Naive Bl/6N Mäuse wurden von Tag -15 bis -1 bzw. von Tag 1 bis 20 täglich mit NaCl bzw. mit CSC (10 mg / Injektion) i.p. behandelt. Die Immunisierung mit MOG<sub>35-55</sub> erfolgte an Tag 0. (A) Klinische Symptome der EAE (EAE Score) wurden täglich erhoben. (B) Summe der täglichen EAE Scores (Tag 1 bis 20). Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM (n = 6). Statistische Auswertung bei (A) mit zweiseitigem ANOVA und (B) mit einseitigem ANOVA. Dabei wurde die CSC-Gruppe immer mit der zugehörigen NaCl-Gruppe verglichen. \* = p < 0,05; \*\* = p < 0,01; \*\*\* = p < 0,001; \*\*\*\* = p < 0,0001.

Am Versuchsende an Tag 21 wurden den Mäusen unterschiedliche Organe entnommen, damit die enthaltenen Zellen mittels FACS-Analyse untersucht werden konnten.

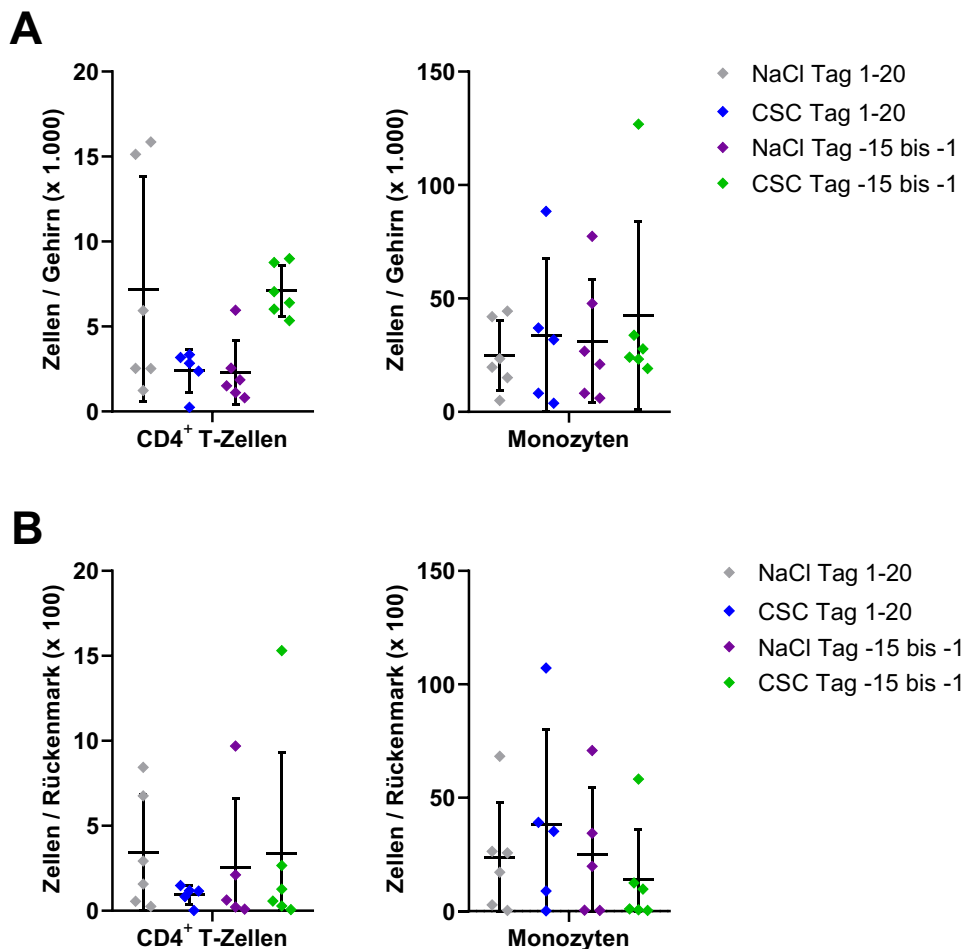


**Abbildung 18: Analyse der Zellen in Milz und Blut nach EAE mit CSC-Behandlung vor und nach Immunisierung.** Naive BI/6N Mäuse wurden von Tag -15 bis -1 bzw. von Tag 1 bis 20 täglich mit NaCl bzw. mit CSC (10 mg / Injektion) i.p. behandelt. Die Immunisierung mit MOG<sub>35-55</sub> erfolgte an Tag 0. Präparation von Milz und Blut an Tag 21 mit anschließender Färbung mit Fluorochrom-konjugierten Antikörpern und FACS-Analyse. (A) Prozentualer Anteil an Zellen bezogen auf Lymphozyten in der Milz. (B) Prozentualer Anteil an Zellen bezogen auf Lymphozyten im Blut. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM (n = 6). Statistische Auswertung mit einseitigem bzw. zweiseitigem ANOVA. Dabei wurde die CSC-Gruppe immer mit der zugehörigen NaCl-Gruppe verglichen. \* = p < 0,05; \*\* = p < 0,01; \*\*\* = p < 0,001; \*\*\*\* = p < 0,0001.

Die direkte Behandlung mit CSC führte zu einer Erhöhung des Anteils an CD138<sup>+</sup> B-Zellen in der Milz auf  $1,51 \pm 0,09$  % (Kontrolle  $0,25 \pm 0,03$  %), während die CSC-Vorbehandlung zu einer Erhöhung auf  $0,53 \pm 0,04$  % führte (Abbildung 18A). Der Anteil der Basophilen an den Lymphozyten in der Milz konnte sich durch die Injektion von CSC für 20 Tage von  $0,4 \pm 0,05$  % in der Kontrolle auf  $0,79 \pm 0,1$  % fast verdoppeln. Ein leichter Anstieg des Anteils an Monozyten bezogen auf PBMCs war zudem durch

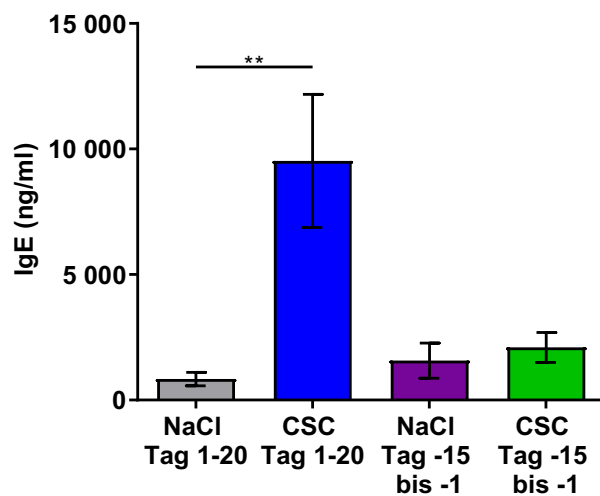
die direkte Behandlung mit CSC zu erkennen. Im Gegensatz zur Milz zeigte sich im Blut kein Anstieg der  $CD138^+$  B-Zellen durch die Injektion von CSC (Abbildung 18B), wohingegen die Basophilen ein ähnliches Bild wie in der Milz zeigten. Diese stiegen von  $0,63 \pm 0,1$  % in der Kontrolle auf  $1,86 \pm 0,46$  % durch direkte CSC-Behandlung an.

Ebenfalls wurden die Zellen aus dem Gehirn und dem Rückenmark mittels FACS-Analyse untersucht (Abbildung 19). Es zeigten sich weder in der Anzahl an  $CD4^+$  T-Zellen, noch in der Anzahl an Monozyten signifikante Unterschiede in den beiden Organen.



**Abbildung 19: Analyse der Zellen in Gehirn und Rückenmark nach EAE mit CSC-Behandlung vor und nach Immunisierung.** Naive Bl/6N Mäuse wurden von Tag -15 bis -1 bzw. von Tag 1 bis 20 täglich mit NaCl bzw. mit CSC (10 mg / Injektion) i.p. behandelt. Die Immunisierung mit MOG<sub>35-55</sub> erfolgte an Tag 0. Präparation von Gehirn und Rückenmark an Tag 21 mit anschließender Färbung mit Fluorochrom-konjugierten Antikörpern und FACS-Analyse. (A) Anzahl an Zellen im Gehirn. (B) Anzahl an Zellen im Rückenmark. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM (n = 6). Statistische Auswertung mit einseitigem ANOVA. Dabei wurde die CSC-Gruppe immer mit der zugehörigen NaCl-Gruppe verglichen. \* = p < 0,05; \*\* = p < 0,01; \*\*\* = p < 0,001; \*\*\*\* = p < 0,0001.

Aus dem am Versuchsende entnommenen Blut wurde zusätzlich Plasma gewonnen, um die Konzentration von sekretierten Immunglobulinen bestimmen zu können. Die direkte Behandlung der EAE-Mäuse mit CSC führte zu einer starken Erhöhung der Sekretion von IgE ins Plasma (Abbildung 20). So erhöhte sich die Konzentration von IgE von  $838 \pm 267,1$  ng/ml in der Kontrolle auf  $9.529 \pm 2.650,9$  ng/ml. Die Vorbehandlung mit CSC führte zu keiner Erhöhung der IgE-Konzentration im Plasma.

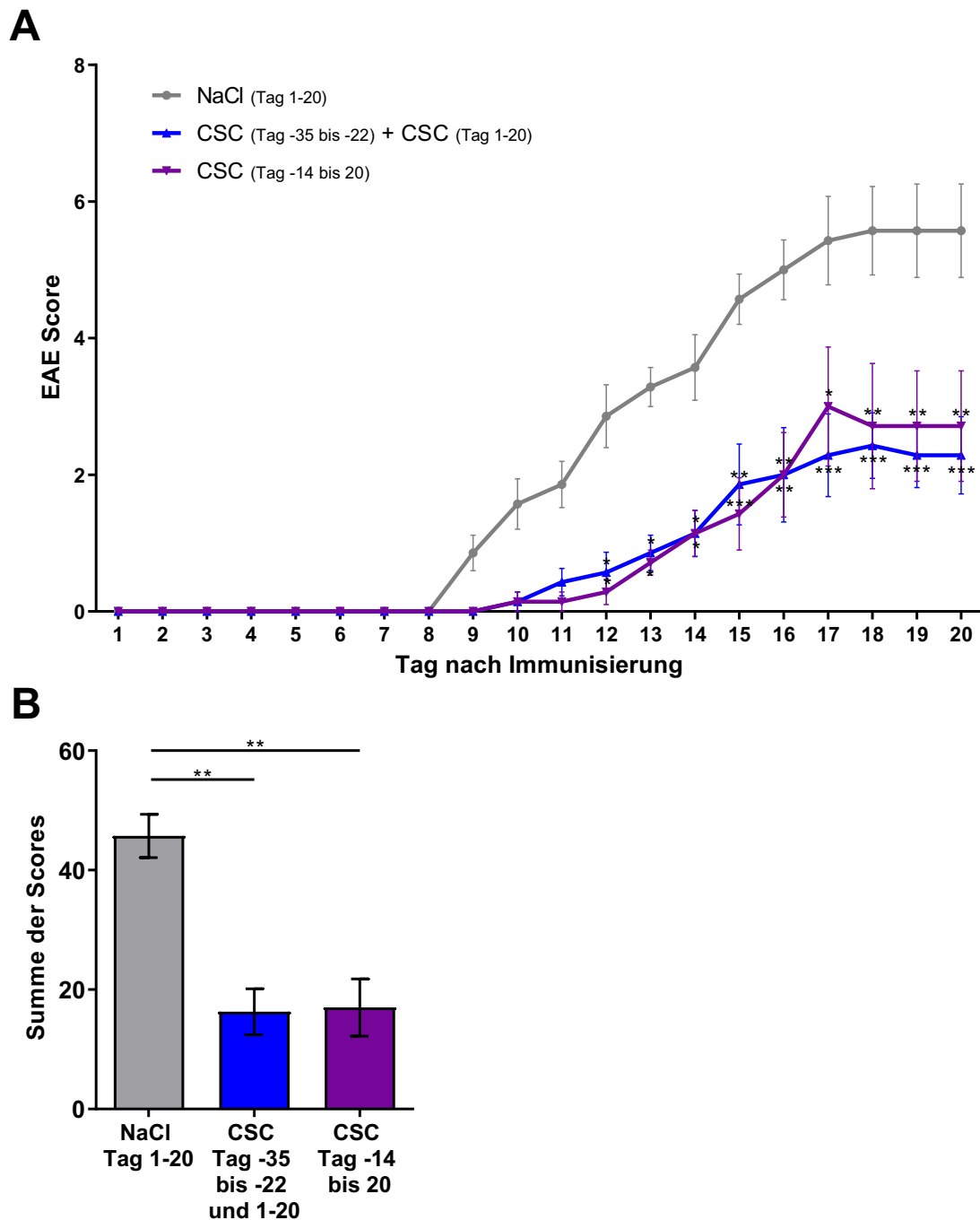


**Abbildung 20: Konzentrationsbestimmung von IgE im Plasma nach EAE mit CSC-Behandlung vor und nach Immunisierung.** Naive Bl/6N Mäuse wurden von Tag -15 bis -1 bzw. von Tag 1 bis 20 täglich mit NaCl bzw. mit CSC (10 mg / Injektion) i.p. behandelt. Die Immunisierung mit MOG<sub>35-55</sub> erfolgte an Tag 0. Blutabnahme an Tag 21 mit anschließender Isolation von Plasma. Konzentrationsbestimmung von IgE im Plasma mittels ELISA. Dargestellt sind die Mittelwerte der IgE Konzentration  $\pm$  SEM (n = 6). Statistische Auswertung mit einseitigem ANOVA. Dabei wurde die CSC-Gruppe immer mit der zugehörigen NaCl-Gruppe verglichen. \* = p < 0,05; \*\* = p < 0,01; \*\*\* = p < 0,001; \*\*\*\* = p < 0,0001.

#### 4.4.1.2 Behandlung mit CSC in unterschiedlichen Zeitfenstern

Nachdem die direkte Applikation von CSC während des EAE-Verlaufes von Tag 1-20 und als Vorbehandlung von Tag -15 bis -1 getestet wurde, sollte zudem eine Behandlung mit CSC in weiteren Zeiträumen durchgeführt werden. Zu diesem Zweck wurden sowohl eine längere Behandlungsdauer als auch eine Behandlung in zwei Zeiträumen mit einer ersten Behandlung und einem zweiten *Boost* durchgeführt. Dies diente der Fragestellung, ob eine solche Behandlung die EAE noch effektiver unterdrücken kann, als eine Behandlung von Tag 1-20. Somit ergab sich eine Gruppe, die von Tag -35 bis -22 mit CSC behandelt wurde und anschließend ein weiteres Mal von Tag 1-20 (zweimalige CSC-Behandlung), eine weitere Gruppe, welcher CSC von Tag -14 bis 20 (einmalige CSC-Behandlung) injiziert wurde und eine Kontrollgruppe, die NaCl von

Tag 1-20 (NaCl-Behandlung) appliziert bekam. An Tag 0 wurden naive BI/6N Mäuse durch s.c. Injektion von MOG<sub>35-55</sub>-Peptid zusammen mit CFA immunisiert.

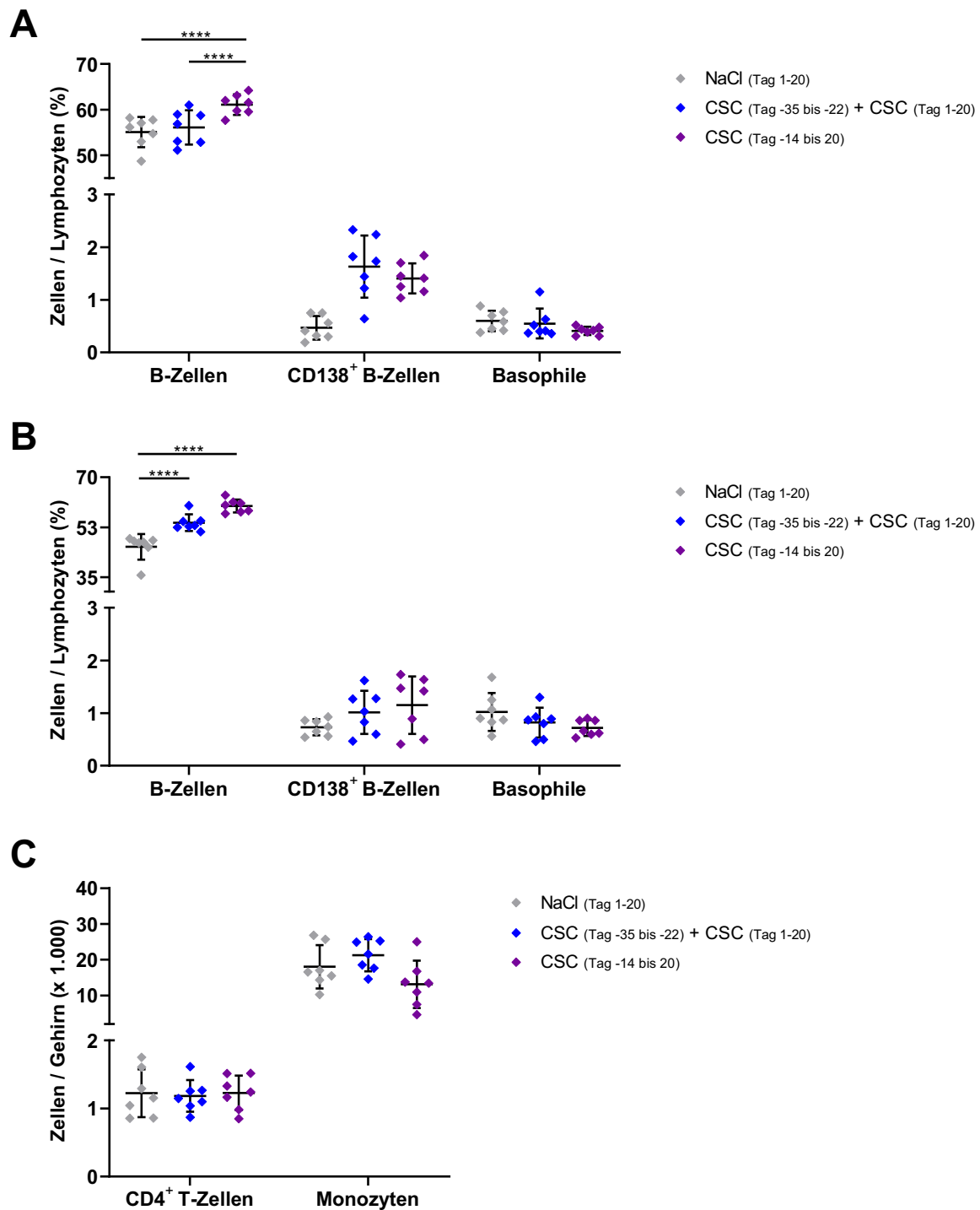


**Abbildung 21: Klinischer EAE Score von Mäusen mit CSC-Behandlung in unterschiedlichen Zeitfenstern.** Naive BI/6N Mäuse wurden in unterschiedlichen Zeitfenstern (Tag 1 bis 20, Tag -35 bis -22 bzw. Tag -14 bis 20) täglich mit NaCl bzw. mit CSC (10 mg / Injektion) i.p. behandelt. Die Immunisierung mit MOG<sub>35-55</sub> erfolgte an Tag 0. (A) Klinische Symptome der EAE (EAE Score) wurden täglich erhoben. (B) Summe der täglichen EAE Scores (Tag 1 bis 20). Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM (n = 7). Statistische Auswertung bei (A) mit zweiseitigem ANOVA und (B) mit einseitigem ANOVA. Dabei wurde die zwei Gruppen mit CSC-Behandlung jeweils mit der Gruppe NaCl Tag 1 bis 20 verglichen. \* = p < 0,05; \*\* = p < 0,01; \*\*\* = p < 0,001; \*\*\*\* = p < 0,0001.



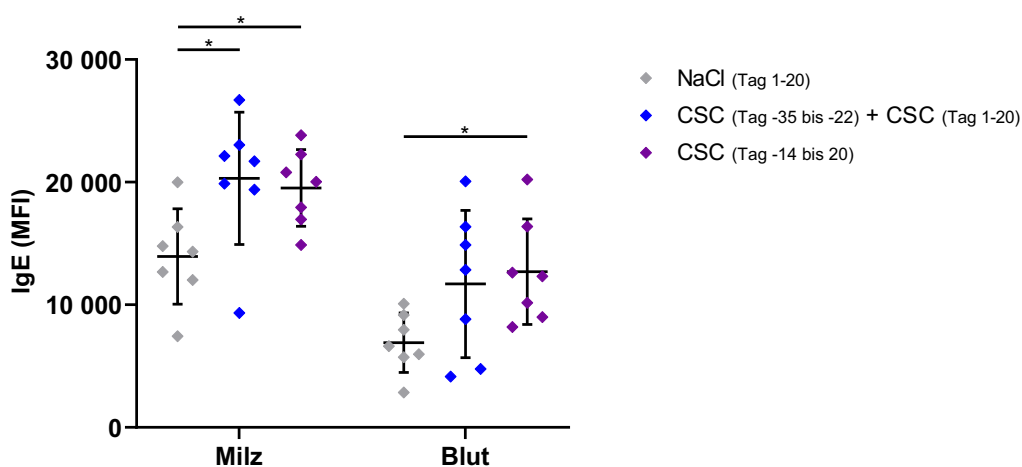
Abbildung 21 zeigt den Verlauf des klinischen EAE Scores. Die ersten Symptome erschienen 9 Tage nach Immunisierung und steigerten sich bis etwa Tag 17. Anschließend war ein leichter Abfall bzw. keine weitere Steigung erkennbar. Sowohl die einmalige Behandlung mit CSC als auch die zweimalige Behandlung mit CSC verbesserten den Score der EAE signifikant im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 21A). Somit fielen die Scores am Tag 20 von  $5,6 \pm 0,69$  bei der Kontrolle auf  $2,7 \pm 0,81$  bei einmaliger CSC-Behandlung und  $2,3 \pm 0,57$  bei zweimaliger CSC-Behandlung ab. Die Summe der Scores über den Verlauf des Experiments hinweg zeigte ein ähnliches Bild (Abbildung 21B). Hier kam es zu einer signifikanten Verbesserung des klinischen Scores durch die CSC-Behandlung beider Gruppen.

Der Versuch wurde an Tag 21 nach Immunisierung beendet. Daraufhin wurden den Mäusen unterschiedliche Organe entnommen, damit die enthaltenen Zellen mittels FACS-Analyse untersucht werden konnten. Die einmalige Behandlung mit CSC führte zu einer Erhöhung des Anteils an B-Zellen in der Milz auf  $61,12 \pm 0,85$  % (Kontrolle  $55,1 \pm 1,26$  %). Die zweimalige Behandlung mit CSC hingegen bedingte keine Erhöhung des Anteils an B-Zellen (Abbildung 22A). Der Anteil an  $CD138^+$  B-Zellen stieg durch beide Gruppen mit CSC-Behandlung nur leicht an, während kein Unterschied im Anteil an Basophilen bezogen auf die gesamten Lymphozyten in der Milz zu erkennen war. Im Blut führten beide Behandlungen mit CSC zu einer Erhöhung des Anteils an B-Zellen (von  $45,66 \pm 1,69$  % in der Kontrolle auf  $54,1 \pm 1,12$  % bei zweimaliger CSC-Behandlung bzw. auf  $59,96 \pm 0,87$  % bei einmaliger Behandlung mit CSC) (Abbildung 22B). Die Expression von  $CD138^+$  durch B-Zellen und der Anteil an Basophilen wurde nicht verändert innerhalb der drei Versuchsgruppen. Bei der Anzahl an Monozyten und  $CD4^+$  T-Zellen im Gehirn waren keine Unterschiede zur Kontrolle festzustellen (Abbildung 22C).



**Abbildung 22: Analyse der Zellen in Milz, Blut und Gehirn nach EAE mit CSC-Behandlung in unterschiedlichen Zeitfenstern.** Naive Bl/6N Mäuse wurden in unterschiedlichen Zeitfenstern (Tag 1 bis 20, Tag -35 bis -22 bzw. Tag -14 bis 20) täglich mit NaCl bzw. mit CSC (10 mg / Injektion) i.p. behandelt. Die Immunisierung mit MOG<sub>35-55</sub> erfolgte an Tag 0. Präparation von Milz, Blut und Gehirn an Tag 21 mit anschließender Färbung mit Fluorochrom-konjugierten Antikörpern und FACS-Analyse. (A) Prozentualer Anteil an Zellen bezogen auf Lymphozyten in der Milz. (B) Prozentualer Anteil an Zellen bezogen auf Lymphozyten im Blut. (C) Anzahl an Zellen im Gehirn. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM (n = 7). Statistische Auswertung mit zweiseitigem ANOVA. Dabei wurden alle Gruppen miteinander verglichen. \* = p < 0,05; \*\* = p < 0,01; \*\*\* = p < 0,001; \*\*\*\* = p < 0,0001.

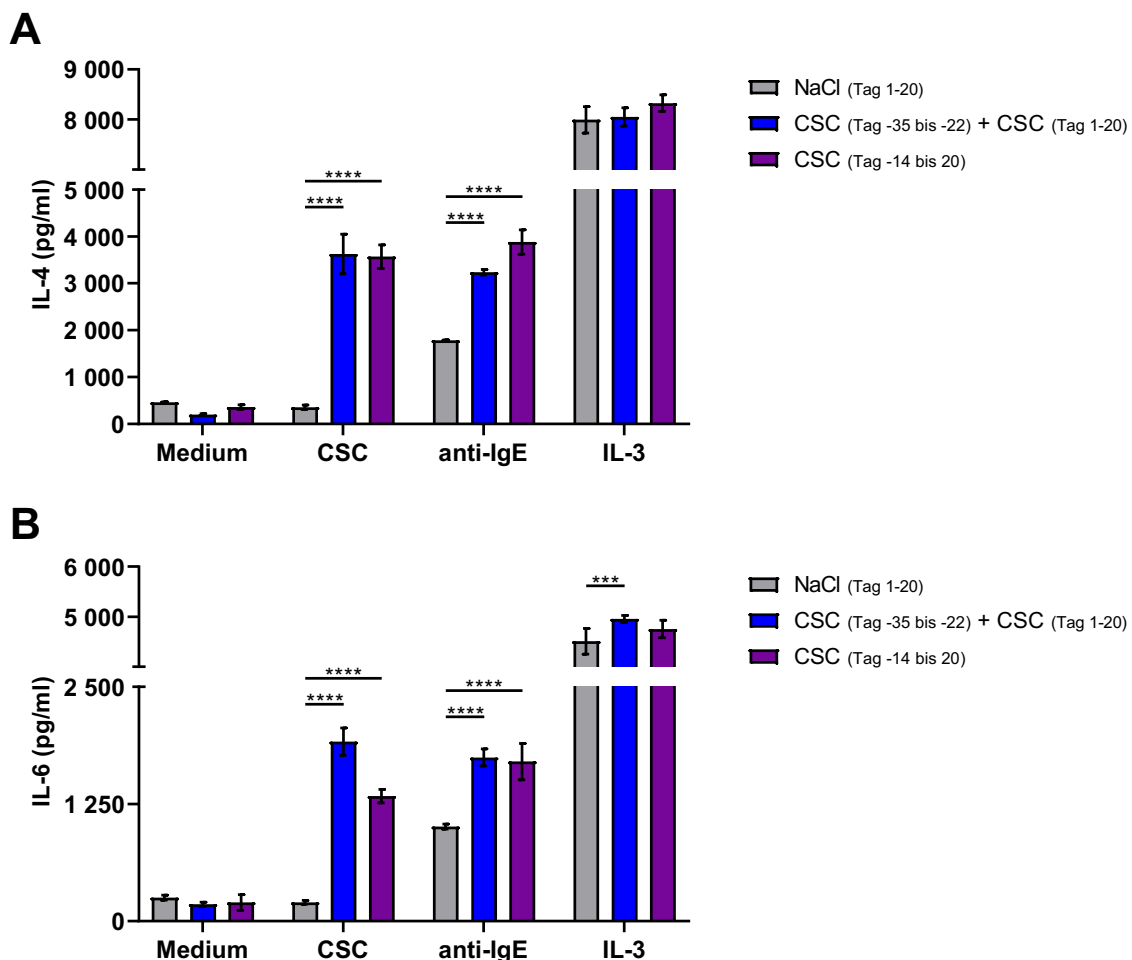
Die MFI von IgE auf Basophilen in der Milz stieg durch beide CSC-Behandlungen an (Abbildung 23). Dabei erhöhte sich die MFI von IgE von  $13.944 \pm 1.470,6$  (Kontrolle) auf  $20.309 \pm 2.039,7$  bei Basophilen aus Mäusen mit zweimaliger Behandlung mit CSC und auf  $19.527 \pm 1.180,8$  bei Basophilen aus Mäusen mit einmaliger Behandlung mit CSC. Ein ähnliches Bild zeigten auch die Basophilen im Blut. Dort stieg die MFI von IgE von  $6.910 \pm 916,1$  (Kontrolle) auf  $11.698 \pm 2.271,1$  (zweimalige Behandlung mit CSC) und auf  $12.698 \pm 1.624,5$  (einmalige CSC-Behandlung) an.



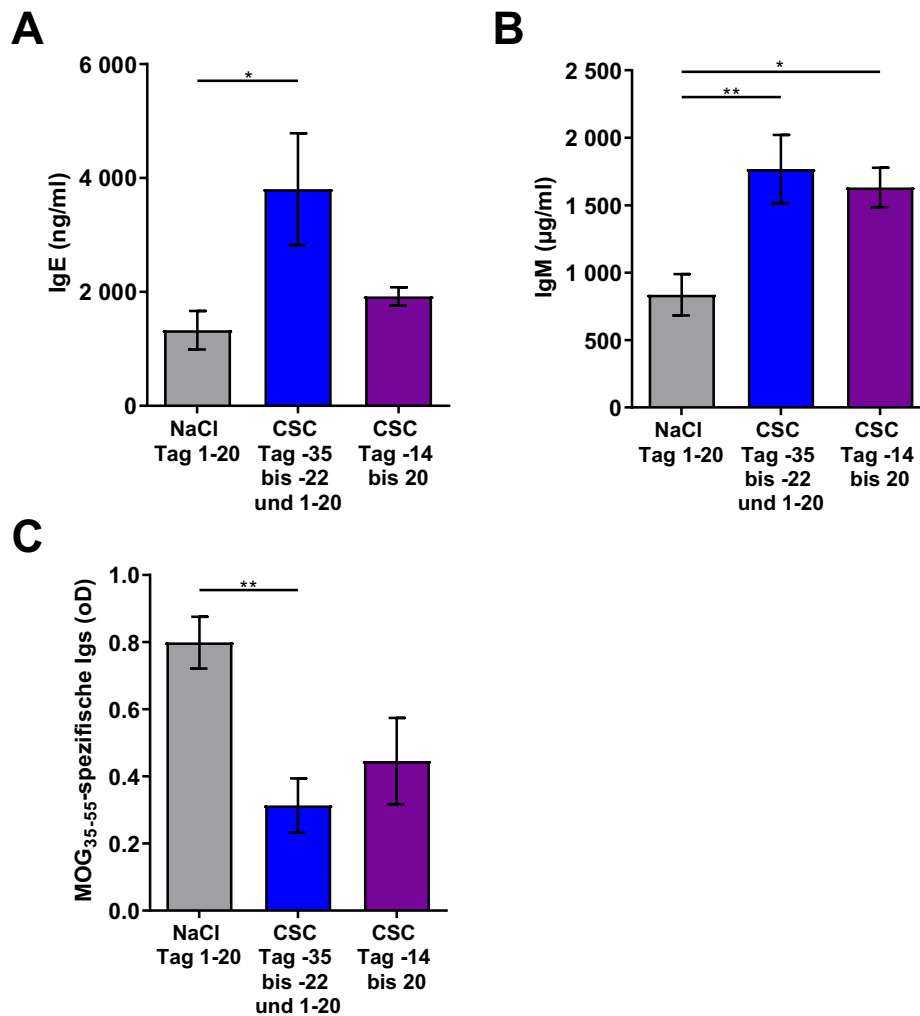
**Abbildung 23: Analyse des IgE Medians auf Basophilen nach EAE mit CSC-Behandlung in unterschiedlichen Zeitfenstern.** Naive Bl/6N Mäuse wurden in unterschiedlichen Zeitfenstern (Tag 1 bis 20, Tag -35 bis -22 bzw. Tag -14 bis 20) täglich mit NaCl bzw. mit CSC (10 mg / Injektion) i.p. behandelt. Die Immunisierung mit MOG<sub>35-55</sub> erfolgte an Tag 0. Präparation von Milz und Blut an Tag 21 mit anschließender Färbung mit Fluorochrom-konjugierten Antikörpern und FACS-Analyse. Gezeigt ist der IgE Median auf Basophilen. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM (n = 7). Statistische Auswertung mit zweiseitigem ANOVA. Dabei wurden alle Gruppen miteinander verglichen. \* = p < 0,05; \*\* = p < 0,01; \*\*\* = p < 0,001; \*\*\*\* = p < 0,0001.

Am Versuchsende wurde den Mäusen das Knochenmark entnommen, um daraus CD49b<sup>+</sup> Zellen zu isolieren, die für 24 Stunden stimuliert wurden. Anschließend wurde deren Sekretion von IL-4 und IL-6 in den Zellkulturüberstand mittels ELISA bestimmt. CD49b<sup>+</sup> Zellen wurden nur durch CSC aktiviert, wenn die Mäuse vorher mit CSC behandelt wurden (Abbildung 24). Hierbei stieg die IL-4 Konzentration von  $357,6 \pm 28$  pg/ml und die IL-6 Konzentration von  $199,9 \pm 12,5$  pg/ml in der Kontrolle auf  $3.626,8 \pm 245,3$  pg/ml IL-4 und  $1.914,9 \pm 83,8$  pg/ml IL-6 bei zweimaliger Behandlung mit CSC und auf  $3.570,1 \pm 146,4$  pg/ml IL-4 und  $1.333,9 \pm 40,9$  pg/ml IL-6 bei einmaliger Behandlung mit CSC an. Ebenfalls ließen sich die Zellen durch  $\alpha$ IgE besser aktivieren, wenn diese aus Mäusen stammten, die mit CSC behandelt wurden ( $3.237 \pm$

33,2 pg/ml IL-4 und  $1.746 \pm 52,5$  pg/ml IL-6 bei zweimaliger CSC-Behandlung bzw.  $3.882,5 \pm 149$  pg/ml IL-4 und  $1.701,5 \pm 113,2$  pg/ml IL-6 bei einmaliger CSC-Behandlung) im Vergleich zu Zellen aus Kontrollmäusen mit einer Konzentration von  $1.782,5 \pm 5,4$  pg/ml IL-4 bzw.  $1.008 \pm 14,7$  pg/ml IL-6. Durch die Stimulation mit IL-3 wurden die CD49b<sup>+</sup> Zellen am stärksten aktiviert. Es wurde durch die Kontrolle IL-4 mit einer Konzentration von  $7.994,7 \pm 152,8$  pg/ml und IL-6 mit einer Konzentration von  $4.511,6 \pm 146,7$  pg/ml ausgeschüttet, während durch die beiden Gruppen mit CSC-Behandlung ähnlich viel ( $8.050,4 \pm 105$  bis  $8.324,6 \pm 95,8$  pg/ml IL-4 und  $4.754,4 \pm 100,3$  bis  $4.956 \pm 41,2$  pg/ml IL-6) sekretiert wurde.



**Abbildung 24: Sekretion von IL-4 und IL-6 durch CD49b<sup>+</sup> Zellen nach EAE mit CSC-Behandlung in unterschiedlichen Zeitfenstern.** Naive BI/6N Mäuse wurden in unterschiedlichen Zeitfenstern (Tag 1 bis 20, Tag -35 bis -22 bzw. Tag -14 bis 20) täglich mit NaCl bzw. mit CSC (10 mg / Injektion) i.p. behandelt. Die Immunisierung mit MOG<sub>35-55</sub> erfolgte an Tag 0. Präparation von Knochenmark und Isolation von CD49b<sup>+</sup> Zellen an Tag 21. Die Stimulation erfolgte mit CSC (10 µg/ml), αIgE (1 µg/ml) und IL-3 (25 ng/ml) für 24 Stunden bei 37 °C im Brutschrank. Die Konzentrationen von IL-4 und IL-6 im Zellkulturüberstand wurden mittels ELISA getestet. (A) Konzentration von IL-4 im Zellkulturüberstand. (B) Konzentration von IL-6 im Zellkulturüberstand. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM (n = 3). Statistische Auswertung mit zweiseitigem ANOVA. Dabei wurden alle Gruppen miteinander verglichen. \* = p < 0,05; \*\* = p < 0,01; \*\*\* = p < 0,001; \*\*\*\* = p < 0,0001.



**Abbildung 25: Konzentrationsbestimmung von IgE, IgM und MOG<sub>35-55</sub>-spezifischen Igs im Plasma nach EAE mit CSC-Behandlung in unterschiedlichen Zeitfenstern.** Naive BI/6N Mäuse wurden in unterschiedlichen Zeitfenstern (Tag 1 bis 20, Tag -35 bis -22 bzw. Tag -14 bis 20) täglich mit NaCl bzw. mit CSC (10 mg / Injektion) i.p. behandelt. Die Immunisierung mit MOG<sub>35-55</sub> erfolgte an Tag 0. Blutabnahme an Tag 21 mit anschließender Isolation von Plasma. Konzentrationsbestimmung im Plasma mittels ELISA. (A) Konzentration von IgE im Plasma. (B) Konzentration von IgM im Plasma. (C) Konzentration von MOG<sub>35-55</sub>-spezifischen Igs im Plasma. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM (n = 7). Statistische Auswertung mit einseitigem ANOVA. Dabei wurden die Gruppen mit der Kontrolle (NaCl) verglichen. \* = p < 0,05; \*\* = p < 0,01; \*\*\* = p < 0,001; \*\*\*\* = p < 0,0001.

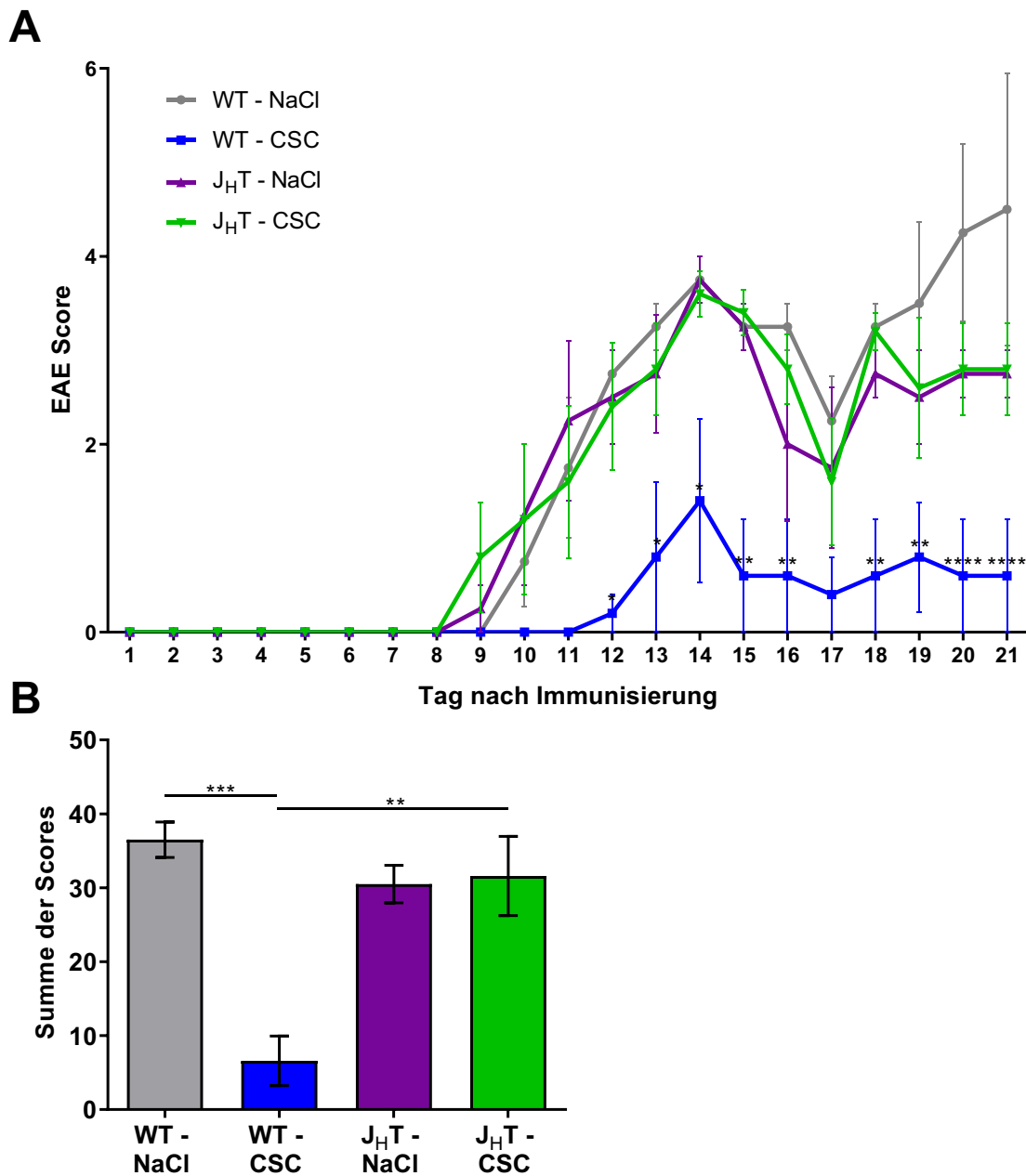
Durch beide Behandlungen mit CSC stieg die Konzentration von IgE im Plasma der Versuchstiere an (Abbildung 25A). Dabei stieg die Konzentration von  $1.324,7 \pm 338,2$  ng/ml in der Kontrolle auf  $3.802,9 \pm 981,4$  ng/ml durch die zweimalige Behandlung mit CSC bzw. auf  $1.919,8 \pm 161,1$  ng/ml durch die einmalige Behandlung mit CSC an. Zudem wurde durch beide CSC-Behandlungen mehr IgM ins Plasma der Versuchstiere sekretiert (Abbildung 25B). Die gemessene Konzentration erhöhte sich von  $836,3 \pm 153,5$  pg/ml (Kontrolle) auf  $1.767,3 \pm 153,9$  pg/ml (2x CSC) bzw.  $1.631,6 \pm$

145,8 pg/ml (1x CSC). Die optische Dichte (oD) der gemessenen MOG<sub>35-55</sub>-spezifischen Igs im Plasma war in der Kontrolle am höchsten (Abbildung 25C). Diese lag bei einer oD von  $0,8 \pm 0,08$ , während die oD durch zweimalige Behandlung mit CSC auf  $0,31 \pm 0,08$  und bei einmaliger Behandlung mit CSC auf  $0,45 \pm 0,13$  absank.

#### 4.4.1.3 Behandlung von B-Zell-defizienten Mäusen mit CSC

Da viele *in vitro* und *in vivo* Experimente darauf hinwiesen, dass CSC B-Zellen sowohl aktivieren als auch deren Expression von Oberflächenmolekülen modulieren kann, wurde in einer Vorarbeit innerhalb der Arbeitsgruppe ein EAE-Experiment in B-Zell-defizienten Mäusen durchgeführt. Dies diente der Untersuchung der Fragestellung, ob CSC auch in Abwesenheit von B-Zellen den Krankheitsverlauf einer EAE verbessern kann. Es wurden sowohl *wildtyp* Mäuse als auch B-Zell-defiziente J<sub>H</sub>T-Mäuse mit CSC bzw. mit NaCl als Kontrolle von Tag 1-20 behandelt. Die Immunisierung durch s.c. Injektion von MOG<sub>35-55</sub>-Peptid zusammen mit CFA erfolgte an Tag 0.

Der Verlauf der klinischen Symptome ist anhand des EAE Scores in Abbildung 26A dargestellt. Die ersten Symptome erschienen 9 Tage nach Immunisierung und steigerten sich bis etwa Tag 14, wobei anschließend ein leichter Abfall erkennbar war. An Tag 18 stiegen die Symptome der EAE wieder etwas an. Die Behandlung von *wildtyp* Mäusen mit CSC führte zu einer signifikanten Verbesserung des EAE Scores auf  $0,6 \pm 0,6$  im Vergleich zur Kontrolle mit einem Score von  $4,5 \pm 1,4$  (Tag 21). Wurden J<sub>H</sub>T-Mäuse mit CSC behandelt, hatte dies keinen Einfluss auf den klinischen Score, der bei  $2,8 \pm 0,5$  verlief, ebenso wie der Score der zugehörigen Kontrolle ( $2,8 \pm 0,25$ ). Bei Betrachtung der Summe der EAE Scores über den Verlauf des Experiments zeigt sich ein ähnliches Bild (Abbildung 26B). Sowohl die Behandlung von J<sub>H</sub>T-Mäusen mit NaCl, als auch mit CSC ergab eine Score-Summe auf etwa der gleichen Höhe ( $30,5 \pm 2,5$  bei NaCl bzw.  $31,6 \pm 5,4$  bei CSC), wie eine Behandlung von *wildtyp* Mäusen mit NaCl ( $36,5 \pm 2,4$ ). Die Behandlung von *wildtyp* Mäusen mit CSC verminderte die Score-Summe signifikant im Vergleich zur Kontrolle auf  $6,6 \pm 3,4$ .



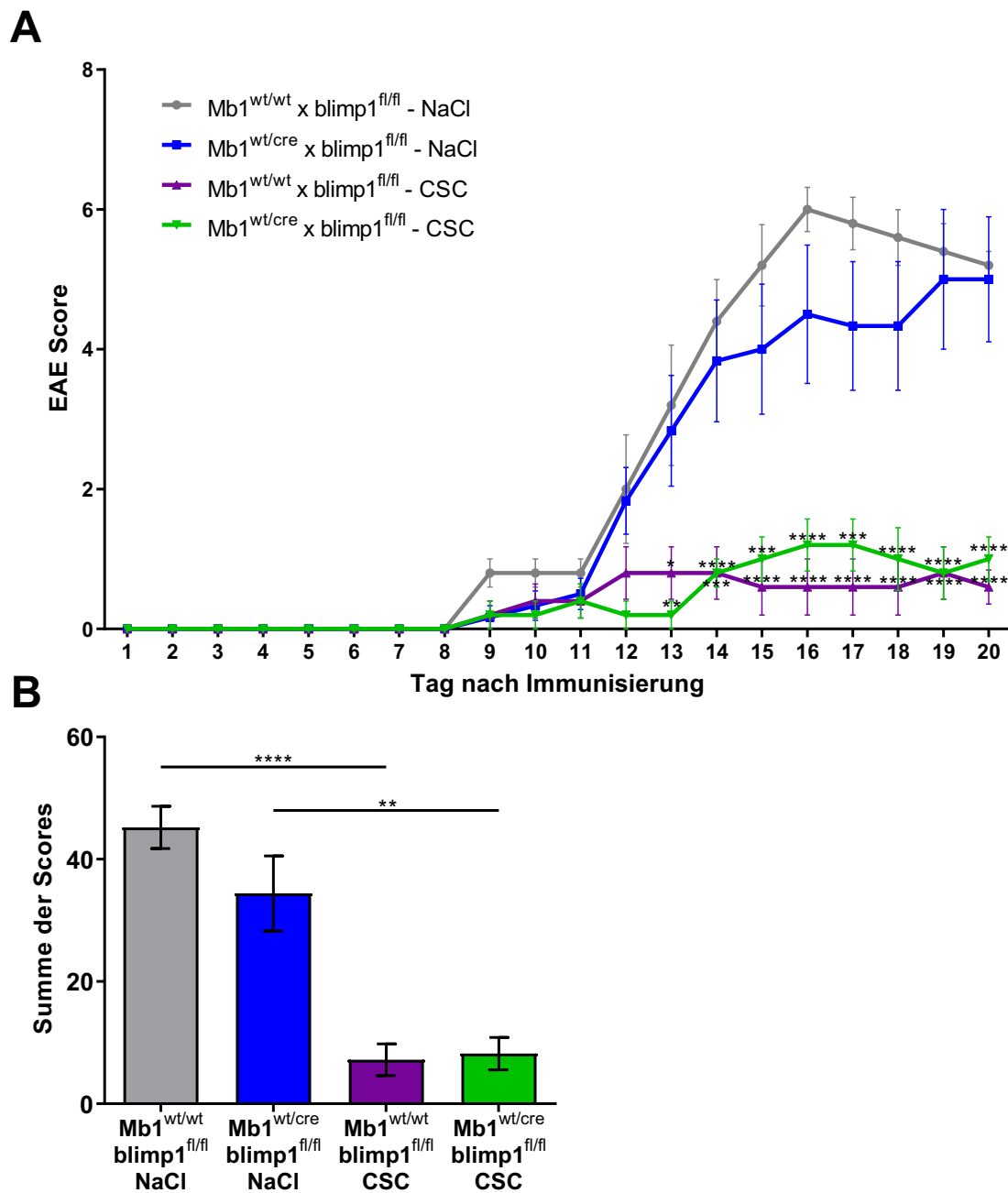
**Abbildung 26: Klinischer EAE Score von B-Zell-defizienten Mäusen mit CSC-Behandlung.** J<sub>H</sub>T-Mäuse bzw. naive Bl/6N Mäuse als Kontrolle wurden von Tag 1 bis 20 täglich mit NaCl bzw. mit CSC (10 mg / Injektion) i.p. behandelt. Die Immunisierung mit MOG<sub>35-55</sub> erfolgte an Tag 0. (A) Klinische Symptome der EAE (EAE Score) wurden täglich erhoben. (B) Summe der täglichen EAE Scores (Tag 1 bis 20). Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM (n = 5). Statistische Auswertung bei (A) mit zweiseitigem ANOVA und (B) mit einseitigem ANOVA. Dabei wurde die CSC-Gruppe immer mit der zugehörigen NaCl-Gruppe verglichen, sowie die CSC-Gruppen miteinander. \* = p < 0,05; \*\* = p < 0,01; \*\*\* = p < 0,001; \*\*\*\* = p < 0,0001.

#### 4.4.1.4 Behandlung von Plasmazell-defizienten Mäusen mit CSC

Sowohl in *in vitro* als auch in *in vivo* Experimenten wurde beobachtet, dass durch die Stimulation mit CSC die Expression von CD138 durch B-Zellen hochreguliert wurde. Des Weiteren wurde publiziert, dass B-Zellen, die im Modell der Infektion mit *Salmonella typhimurium* eine regulatorische Funktion ausübten, neben der Sekretion von IL-10 vor allem durch die starke Expression von CD138 auf ihrer Zelloberfläche charakterisiert wurden [146]. Für die Bildung von reifen CD138<sup>+</sup> Plasmazellen ist der Transkriptionsfaktor Blimp-1 essentiell [147]. Daher sollte in einer Vorarbeit innerhalb der Arbeitsgruppe mit Hilfe von Mb1<sup>wt/cre</sup> x blimp1<sup>fl/fl</sup>-Mäusen, die keine Plasmazellen bilden können, untersucht werden, ob die krankheitsmindernden Effekte von CSC im Modell der EAE auf der Stimulation bzw. Bildung von Plasmazellen beruhen. Es wurden sowohl Mb1<sup>wt/cre</sup> x blimp1<sup>fl/fl</sup>-Mäuse als auch Mb1<sup>wt/wt</sup> x blimp1<sup>fl/fl</sup>-Mäuse als Kontrolle mit CSC bzw. mit NaCl von Tag 1-20 behandelt. Die Immunisierung durch s.c. Injektion von MOG<sub>35-55</sub>-Peptid zusammen mit CFA erfolgte an Tag 0.

Der Verlauf der klinischen Symptome der EAE ist in Abbildung 27A dargestellt. Die ersten Symptome erschienen 9 Tage nach Immunisierung und steigerten sich bis etwa Tag 16. Anschließend war bei einigen Gruppen ein leichter Abfall der Scores erkennbar. Die Behandlung von Mb1<sup>wt/wt</sup> x blimp1<sup>fl/fl</sup>-Mäusen mit CSC führte zu einer Verbesserung des Scores auf  $0,6 \pm 0,2$ , während die Kontrolle bei einem Score von  $5,2 \pm 0,2$  lag. Wurden stattdessen Mb1<sup>wt/cre</sup> x blimp1<sup>fl/fl</sup>-Mäuse mit CSC behandelt war ein ähnliches Bild erkennbar. Die CSC-Behandlung führte zu einem geringeren Score von  $1 \pm 0,3$ , im Vergleich zur Kontrolle ( $5 \pm 0,9$ ). Bei Betrachtung der Summe der Scores über den Zeitverlauf war deutlich zu erkennen, dass die CSC-Behandlung beider Mauslinien zu einer starken Verbesserung des Scores im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle führte (Abbildung 27B).



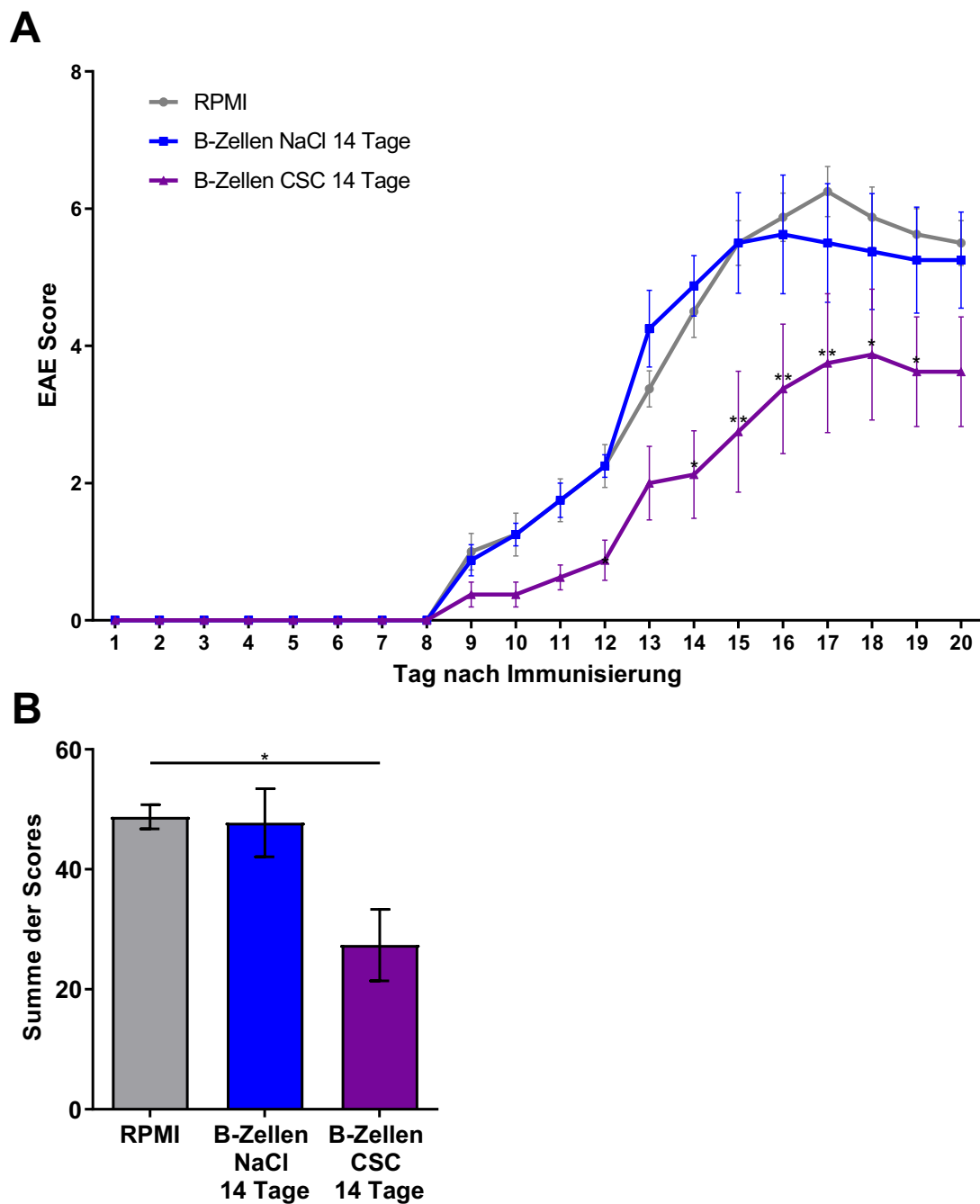


**Abbildung 27: Klinischer EAE Score von Plasmazell-defizienten Mäusen mit CSC-Behandlung.** Mb1<sup>wt/wt</sup> x blimp1<sup>fl/fl</sup>-Mäuse bzw. Mb1<sup>wt/cre</sup> x blimp1<sup>fl/fl</sup>-Mäuse wurden von Tag 1 bis 20 täglich mit NaCl bzw. mit CSC (10 mg / Injektion) i.p. behandelt. Die Immunisierung mit MOG<sub>35-55</sub> erfolgte an Tag 0. (A) Klinische Symptome der EAE (EAE Score) wurden täglich erhoben. (B) Summe der täglichen EAE Scores (Tag 1 bis 20). Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM (n = 6). Statistische Auswertung bei (A) mit zweiseitigem ANOVA und (B) mit einseitigem ANOVA. Dabei wurde die CSC-Gruppe immer mit der zugehörigen NaCl-Gruppe verglichen, sowie die CSC-Gruppen miteinander. \* = p < 0,05; \*\* = p < 0,01; \*\*\* = p < 0,001; \*\*\*\* = p < 0,0001.

#### 4.4.2 B-Zell-Transfer aus CSC-behandelten Mäusen

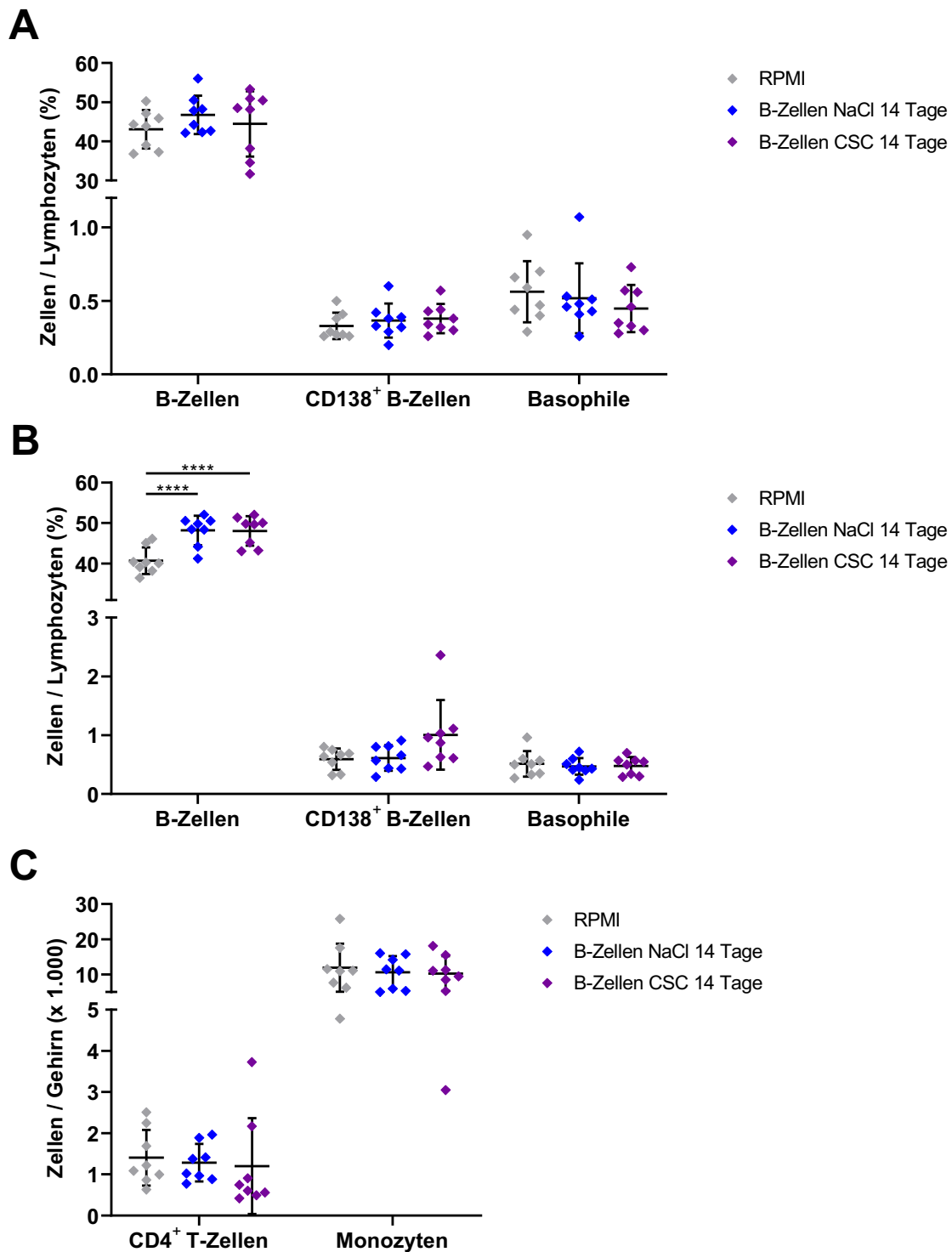
Da *in vitro* und *in vivo* gezeigt werden konnte, dass CSC einen Einfluss auf B-Zellen hat und ebenfalls im Modell der EAE demonstriert wurde, dass CSC in Abwesenheit von B-Zellen nicht zu einer Verbesserung des klinischen EAE Scores beitragen konnte, sollte in einem weiteren Experiment die Fragestellung bearbeitet werden, ob der direkte Transfer von CSC-aktivierten B-Zellen ebenfalls den Verlauf der EAE verbessern kann. Hierfür wurden naive B1/6N Mäuse täglich für 14 Tage mit NaCl bzw. mit CSC behandelt. Am darauffolgenden Tag wurden die Milzen entnommen und daraus B-Zellen isoliert, die anschließend an Tag 1, Tag 6 und Tag 10 i.v. in immunisierte Mäuse transferiert wurden (im Folgenden CSC-B-Zellen bzw. NaCl-B-Zellen genannt). Die Immunisierung durch s.c. Injektion von MOG<sub>35-55</sub>-Peptid zusammen mit CFA erfolgte an Tag 0.

Der Verlauf der klinischen Symptome ist anhand des EAE Scores in Abbildung 28A dargestellt. Die ersten Symptome erschienen 9 Tage nach Immunisierung und steigerten sich bis etwa Tag 17. Daraufhin war ein leichter Abfall des klinischen Scores erkennbar. MOG<sub>35-55</sub>-immunisierte Mäuse, welchen CSC-B-Zellen transferiert wurden, zeigten einen klinischen Score von  $3,6 \pm 0,8$ . Im Gegensatz dazu waren die Kontrollmäuse mit einem Score von  $5,5 \pm 0,3$  deutlich stärker erkrankt. Mäuse, die mittels Transfer von NaCl-B-Zellen behandelt wurden, zeigten einen klinischen Score, der mit  $5,3 \pm 0,7$  etwa auf Höhe der Kontrolle lag ( $5,5 \pm 0,3$ ). Bei Betrachtung der Summe der Scores über den Zeitverlauf lässt sich eine signifikante Verringerung der Scores durch den Transfer von CSC-B-Zellen ( $27,4 \pm 6$ ) im Vergleich zur Kontrolle ( $48,8 \pm 2$ ) erkennen (Abbildung 28B).



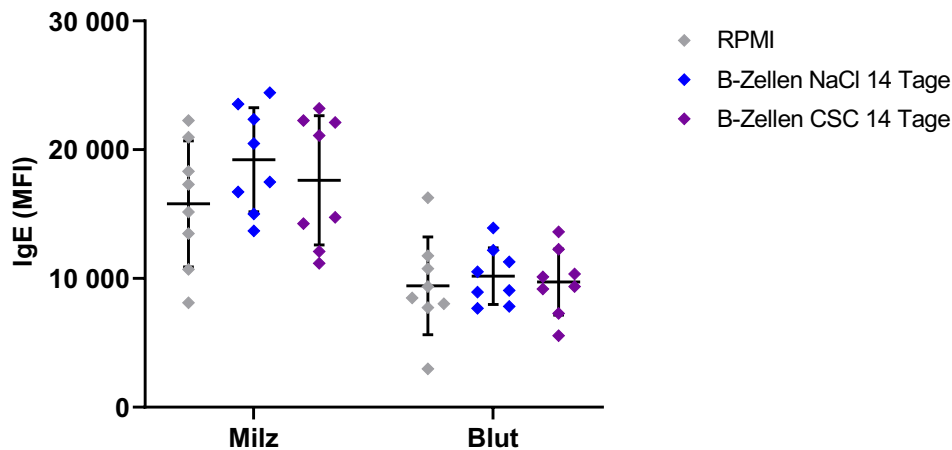
**Abbildung 28: Klinischer EAE Score von Mäusen nach B-Zell Transfer.** Naive Bl/6N Mäuse wurden für 14 Tage täglich mit NaCl bzw. mit CSC (10 mg / Injektion) i.p. behandelt. Anschließend wurden die Milzen entnommen und daraus CD19<sup>+</sup> B-Zellen isoliert. Diese B-Zellen bzw. RPMI-Medium als Kontrolle wurden EAE-immunisierten Mäusen an Tag 1, Tag 6 und Tag 10 i.v. injiziert. Die Immunisierung mit MOG<sub>35-55</sub> erfolgte an Tag 0. (A) Klinische Symptome der EAE (EAE Score) wurden täglich erhoben. (B) Summe der täglichen EAE Scores (Tag 1 bis 20). Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM ( $n = 8$ ). Statistische Auswertung bei (A) mit zweiseitigem ANOVA und (B) mit einseitigem ANOVA. Dabei wurden die Gruppen jeweils mit der Kontrolle (RPMI) verglichen. \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ ; \*\*\*\* =  $p < 0,0001$ .

Am Versuchsende an Tag 21 wurden den Mäusen unterschiedliche Organe entnommen, damit die enthaltenen Zellen mittels FACS-Analyse untersucht werden konnten. Die Behandlung, sowohl mit CSC-B-Zellen als auch mit NaCl-B-Zellen, führte zu keiner Veränderung des Anteils an B-Zellen, CD138<sup>+</sup> B-Zellen, oder Basophilen bezogen auf die insgesamt in der Milz vorhandenen Lymphozyten (Abbildung 29A). Der Anteil an CD138<sup>+</sup> B-Zellen und Basophilen in 100 µl Blut war in allen Gruppen vergleichbar (Abbildung 29B). Jedoch waren durch beide Transfers von B-Zellen signifikant mehr B-Zellen im Blut vorhanden. Der Anteil an B-Zellen bezogen auf die Lymphozyten erhöhte sich von  $40,7 \pm 1,2$  % (Kontrolle) auf  $48,2 \pm 1,29$  % bei Transfer von NaCl-B-Zellen bzw. auf  $48,1 \pm 1,29$  % bei Transfer von CSC-B-Zellen. Die Anzahl an Monozyten bzw. CD4<sup>+</sup> T-Zellen im Gehirn der Versuchstiere zeigte keine Unterschiede zwischen den drei Gruppen (Abbildung 29C).



**Abbildung 29: Zellanalyse in Milz, Blut und Gehirn nach EAE mit B-Zell Transfer.** Naive BI/6N Mäuse wurden für 14 Tage täglich mit NaCl bzw. mit CSC (10 mg / Injektion) i.p. behandelt. Anschließend wurden die Milzen entnommen und daraus CD19<sup>+</sup> B-Zellen isoliert. Diese B-Zellen bzw. RPMI-Medium als Kontrolle wurden EAE-immunisierten Mäusen an Tag 1, Tag 6 und Tag 10 i.v. injiziert. Die Immunisierung mit MOG<sub>35-55</sub> erfolgte an Tag 0. Präparation von Milz, Blut und Gehirn an Tag 21 mit anschließender Färbung mit Fluorochrom-konjugierten Antikörpern und FACS-Analyse. (A) Prozentualer Anteil an Zellen bezogen auf Lymphozyten in der Milz. (B) Prozentualer Anteil an Zellen bezogen auf Lymphozyten im Blut. (C) Anzahl an Zellen im Gehirn. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM (n = 8). Statistische Auswertung mit zweiseitigem ANOVA. Dabei wurden die Gruppen jeweils mit der Kontrolle (RPMI) verglichen. \* = p < 0,05; \*\* = p < 0,01; \*\*\* = p < 0,001; \*\*\*\* = p < 0,0001.

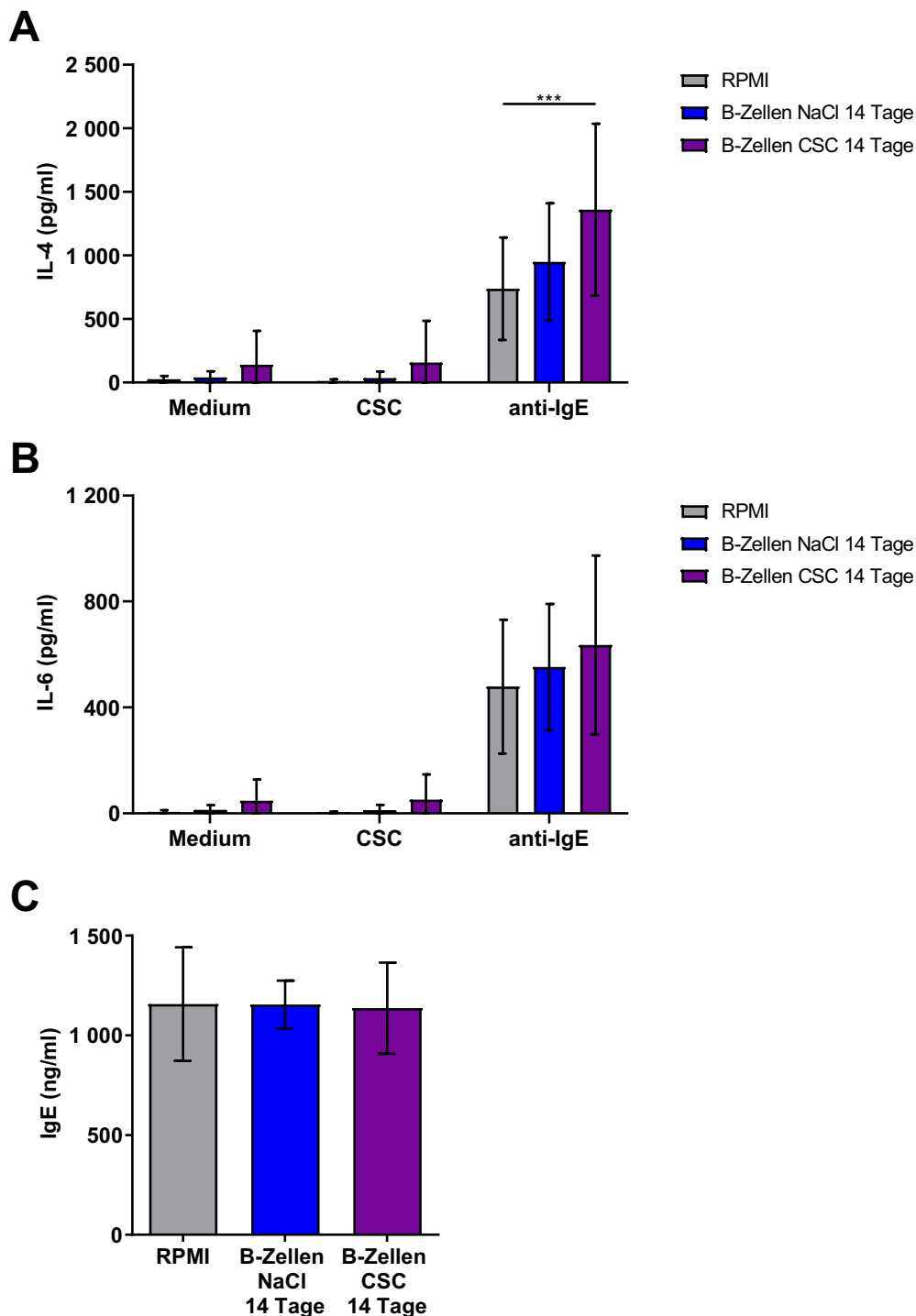
Am Versuchsende wurde durch FACS-Analyse der Median von IgE auf den Basophilen bestimmt (Abbildung 30). Der Transfer von B-Zellen führte weder in der Milz noch im Blut zu einer Erhöhung der MFI von IgE auf den Basophilen.



**Abbildung 30: Analyse des IgE Medians auf Basophilen nach EAE mit B-Zell Transfer.** Naive B1/6N Mäuse wurden für 14 Tage täglich mit NaCl bzw. mit CSC (10 mg / Injektion) i.p. behandelt. Anschließend wurden die Milzen entnommen und daraus CD19<sup>+</sup> B-Zellen isoliert. Diese B-Zellen bzw. RPMI-Medium als Kontrolle wurden EAE-immunisierten Mäusen an Tag 1, Tag 6 und Tag 10 i.v. injiziert. Die Immunisierung mit MOG<sub>35-55</sub> erfolgte an Tag 0. Präparation von Milz und Blut an Tag 21 mit anschließender Färbung mit Fluorochrom-konjugierten Antikörpern und FACS-Analyse. Gezeigt ist der IgE Median auf Basophilen. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM (n = 8). Statistische Auswertung mit zweiseitigem ANOVA. Dabei wurden alle Gruppen miteinander verglichen. \* = p < 0,05; \*\* = p < 0,01; \*\*\* = p < 0,001; \*\*\*\* = p < 0,0001.

Am Versuchsende wurde den Mäusen das Knochenmark entnommen, um daraus CD49b<sup>+</sup> Zellen zu isolieren, die für 24 Stunden stimuliert wurden, um anschließend deren Sekretion von IL-4 und IL-6 in den Zellkulturüberstand mittels ELISA zu bestimmen. Die Stimulation der CD49b<sup>+</sup> Zellen mit CSC führte zu keiner erhöhten Ausschüttung von IL-4 bzw. IL-6; die jeweiligen Konzentrationen lagen auf dem gleichen Level wie die der Kontrolle, die nur mit Medium inkubiert wurde (Abbildung 31A und 31B). Die Stimulation der Zellen mit αIgE führte zu einer deutlichen Aktivierung von CD49b<sup>+</sup> Zellen aller Versuchsgruppen. Die Sekretion von IL-4 erhöhte sich von 736,6 ± 142,4 pg/ml in der Kontrolle auf 1.359,4 ± 138,8 pg/ml bei Zellen aus der Gruppe, die CSC-B-Zellen transferiert bekamen.

Die Konzentration von IgE im Plasma der Versuchstiere zeigte keine Unterschiede und lag zwischen 1.136,3 ± 228,8 und 1.155,9 ± 284,7 ng/ml (Abbildung 31C).



**Abbildung 31: Sekretion der Zytokine IL-4 und IL-6 durch CD49b<sup>+</sup> Zellen in den Zellkulturüberstand bzw. Sekretion von IgE ins Plasma nach EAE mit B-Zell Transfer.** Naive BI/6N Mäuse wurden für 14 Tage täglich mit NaCl bzw. mit CSC (10 mg / Injektion) i.p. behandelt. Anschließend wurden die Milzen entnommen und daraus CD19<sup>+</sup> B-Zellen isoliert. Diese B-Zellen bzw. RPMI-Medium als Kontrolle wurden EAE-immunisierten Mäusen an Tag 1, Tag 6 und Tag 10 i.v. injiziert. Die Immunisierung mit MOG<sub>35-55</sub> erfolgte an Tag 0. Präparation von Knochenmark und Isolation von CD49b<sup>+</sup> Zellen an Tag 21. Die Stimulation erfolgte mit CSC (10 µg/ml), αIgE (1 µg/ml) und IL-3 (25 ng/ml) für 24 Stunden bei 37 °C im Brutschrank. Blutentnahme mit anschließender Gewinnung von Plasma an Tag 21. Die Konzentrationen von IL-4 und IL-6 im Zellkulturüberstand bzw. von IgE im Plasma wurden mittels ELISA getestet. (A) Konzentration von IL-4 im Zellkulturüberstand. (B) Konzentration von IL-6 im Zellkulturüberstand. (C) Konzentration von IgE im Plasma. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM (n = 8). Statistische Auswertung mit einseitigem bzw. zweiseitigem ANOVA. Dabei wurden die Gruppen mit der Kontrolle verglichen. \* = p < 0,05; \*\* = p < 0,01; \*\*\* = p < 0,001; \*\*\*\* = p < 0,0001.

#### 4.4.3 Plasma-Transfer aus CSC-behandelten Mäusen

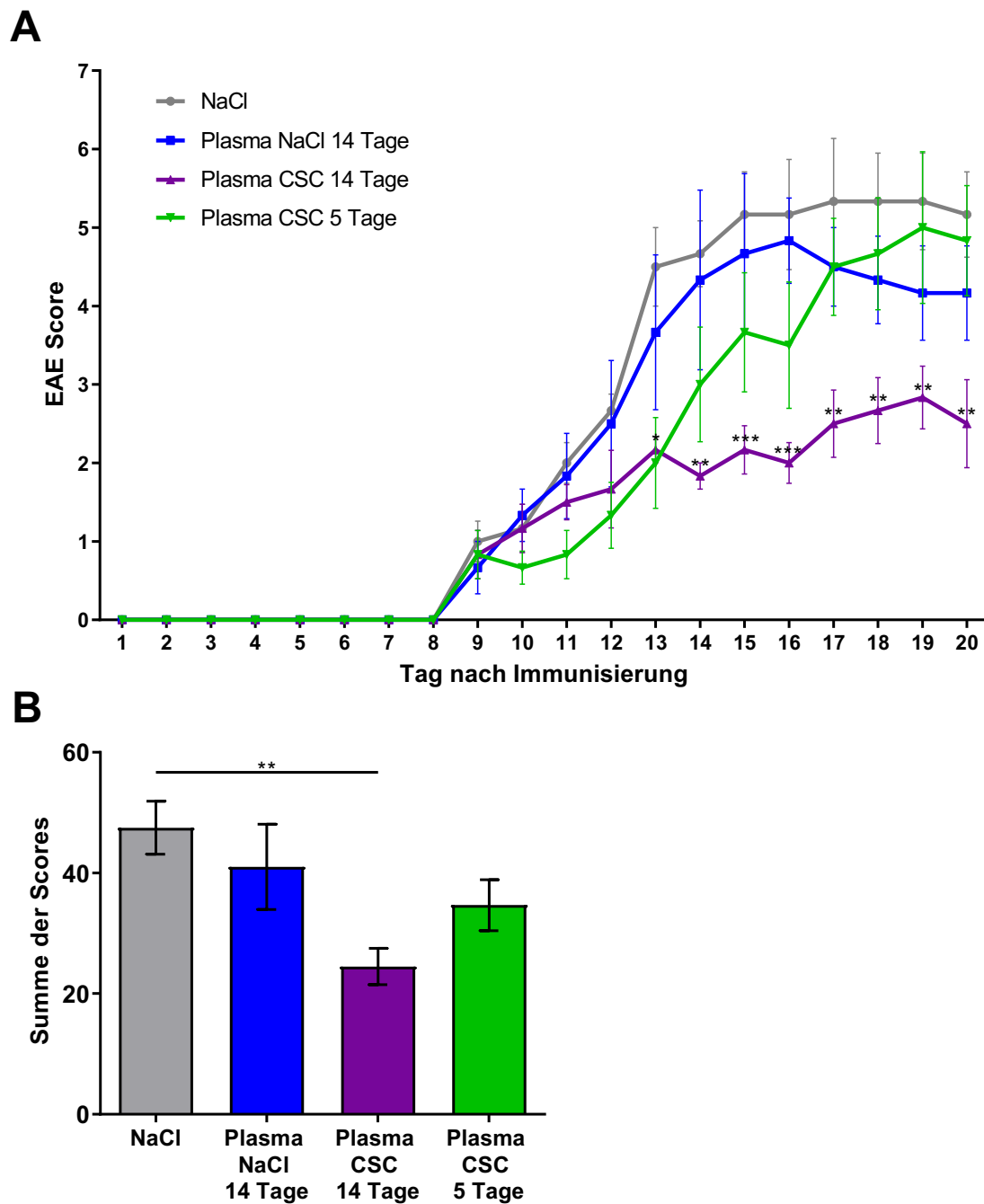
Der Transfer von CSC-behandelten B-Zellen konnte den klinischen Score der EAE verbessern. Somit wurde gezeigt, dass nicht nur die direkte Behandlung mit CSC den Verlauf der EAE verbessern kann, sondern dass auch der Transfer von im Vorhinein durch CSC-aktivierte B-Zellen den EAE Score auf eine CSC-indirekte Weise verbessert. Daher sollte in einem weiteren Versuchsaufbau untersucht werden, ob ebenfalls der Transfer von Plasma aus Mäusen, die mit CSC vorbehandelt wurden, den Verlauf der EAE verbessern kann.

##### 4.4.3.1 Transfer von Plasma aus 5 Tage und 14 Tage CSC-behandelten Mäusen

Um zu testen, ob CSC auf indirekte Weise, durch den Transfer von Plasma aus CSC-behandelten Mäusen, den Verlauf der EAE verbessern kann, wurde aus Spendermäusen Plasma gewonnen. Hierfür wurde naiven BI/6N Mäusen täglich für 5 Tage bzw. für 14 Tage CSC injiziert. Als Kontrolle diente die Injektion von NaCl für 14 Tage. Anschließend wurde den Mäusen Blut entnommen, aus welchem Plasma gewonnen wurde (im Folgenden 5 Tage CSC-Plasma, 14 Tage CSC-Plasma bzw. NaCl-Plasma genannt). Das Plasma wurde Mäusen mit induzierter EAE an Tag 1, Tag 8 und Tag 15 i.p. injiziert. An Tag 0 wurde hierfür die EAE durch s.c. Injektion von MOG<sub>35-55</sub>-Peptid zusammen mit CFA in naiven BI/6N Mäusen induziert.

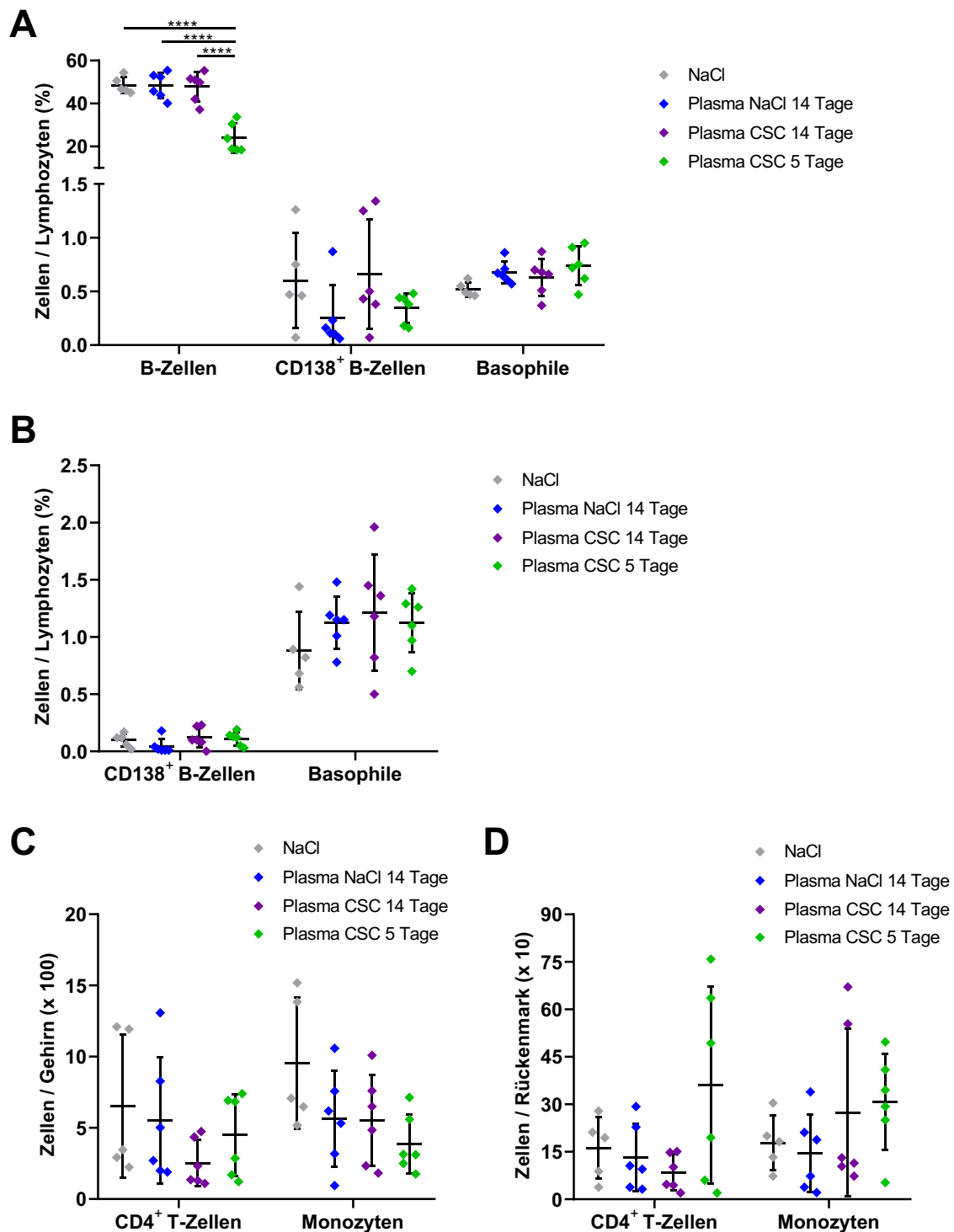
Der Verlauf der klinischen Symptome der EAE ist in Abbildung 32A dargestellt. Die ersten Symptome erschienen 9 Tage nach Immunisierung und steigerten sich bis etwa Tag 16. Daraufhin war ein leichter Abfall bzw. keine weitere Steigung erkennbar. Durch den Transfer von NaCl-Plasma verbesserte sich der Score mit  $4,2 \pm 0,6$  kaum im Vergleich zur Kontrolle ( $5,2 \pm 0,5$ ). Wurde 5 Tage CSC-Plasma transferiert, entwickelte sich der Score zunächst langsamer, stieg aber ab Tag 12 deutlich an und befand sich am Versuchsende mit  $4,8 \pm 0,7$  etwa auf der Höhe der Kontrolle ( $5,2 \pm 0,5$ ). Der Transfer von 14 Tage CSC-Plasma dagegen konnte den klinischen Score im Vergleich zur Kontrolle verbessern. Dieser stieg bis Tag 13 langsam an und verblieb dann bis zum Versuchsende auf einem Level bei  $2,5 \pm 0,6$ . Bei Betrachtung der Summe der Scores über den Zeitverlauf ist eine deutliche Reduktion von  $48 \pm 4,4$  (Kontrolle) auf  $25 \pm 3$  bei Transfer von 14 Tage CSC-Plasma und eine geringe Reduktion auf  $35 \pm 4,2$  bei Transfer von 5 Tage CSC-Plasma zu beobachten (Abbildung 32B).





**Abbildung 32: Klinischer EAE Score von Mäusen nach Plasma-Transfer.** Naive BI/6N Mäuse wurden für 5 Tage bzw. 14 Tage täglich mit NaCl bzw. mit CSC (10 mg / Injektion) i.p. behandelt. Anschließend wurde Blut entnommen und daraus das Plasma gewonnen. Das Plasma bzw. NaCl als Kontrolle wurde EAE-immunisierten Mäusen an Tag 1, Tag 8 und Tag 15 i.p. injiziert. Die Immunisierung mit MOG<sub>35-55</sub> erfolgte an Tag 0. (A) Klinische Symptome der EAE (EAE Score) wurden täglich erhoben. (B) Summe der täglichen EAE Scores (Tag 1 bis 20). Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM ( $n = 6$ ). Statistische Auswertung bei (A) mit zweiseitigem ANOVA und (B) mit einseitigem ANOVA. Dabei wurden die Gruppen jeweils mit der Kontrolle (NaCl) verglichen. \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ ; \*\*\*\* =  $p < 0,0001$ .

Am Versuchsende an Tag 21 wurden den Mäusen unterschiedliche Organe entnommen, damit die enthaltenen Zellen mittels FACS-Analyse untersucht werden konnten. Durch den Transfer von 5 Tage CSC-Plasma waren deutlich weniger B-Zellen bezogen auf die gesamten Lymphozyten ( $23,9 \pm 2,7 \%$ ) im Vergleich zur Kontrolle ( $48,6 \pm 1,7 \%$ ) in der Milz vorhanden (Abbildung 33A). Dagegen waren keine Unterschiede an  $CD138^+$  B-Zellen und Basophilen bezogen auf Lymphozyten in der Milz zu erkennen. Ebenfalls gab es keine deutlichen Unterschiede im Anteil an  $CD138^+$  B-Zellen und Basophilen bezogen auf die gesamten Lymphozyten im Blut (Abbildung 33B). Sowohl im Gehirn (Abbildung 33C) als auch im Rückenmark (Abbildung 33D) waren die Zellzahlen innerhalb einer Gruppe relativ zerstreut, weshalb keine deutlichen Unterschiede in der Anzahl an  $CD4^+$  T-Zellen bzw. Monozyten in beiden Organen erkennbar waren.



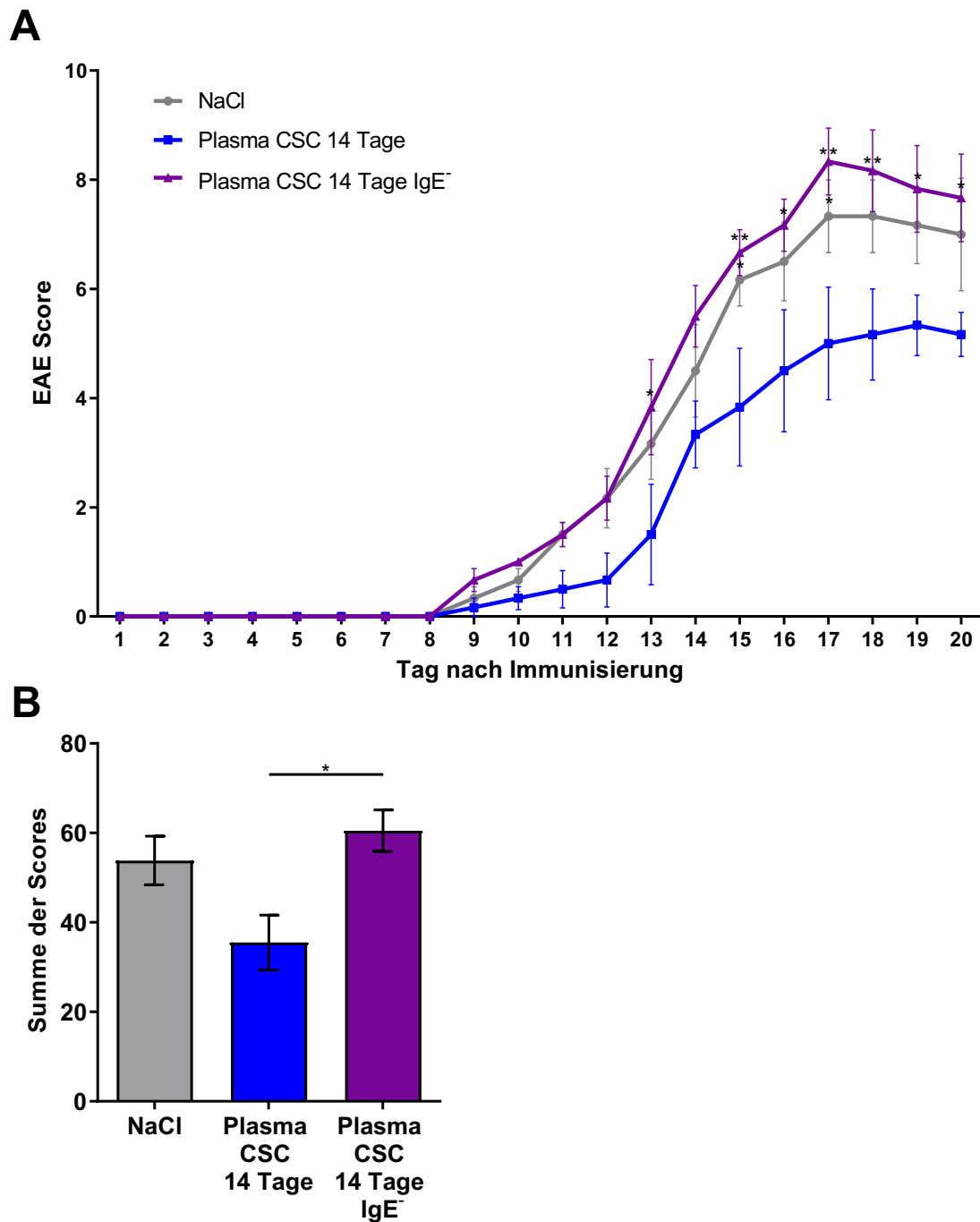
**Abbildung 33: Analyse der Zellen in Milz, Blut, Gehirn und Rückenmark nach EAE mit Plasma-Transfer.** Naive B1/6N Mäuse wurden für 5 Tage bzw. 14 Tage täglich mit NaCl bzw. mit CSC (10 mg / Injektion) i.p. behandelt. Anschließend wurde Blut entnommen und daraus das Plasma gewonnen. Das Plasma bzw. NaCl als Kontrolle wurde EAE-immunisierten Mäusen an Tag 1, Tag 8 und Tag 15 i.p. injiziert. Die Immunisierung mit MOG<sub>35-55</sub> erfolgte an Tag 0. Präparation von Milz, Blut, Gehirn und Rückenmark an Tag 21 mit anschließender Färbung mit Fluorochrom-konjugierten Antikörpern und FACS-Analyse. (A) Prozentualer Anteil an Zellen bezogen auf Lymphozyten in der Milz. (B) Prozentualer Anteil an Zellen bezogen auf Lymphozyten im Blut. (C) Anzahl an Zellen im Gehirn. (D) Anzahl an Zellen im Rückenmark. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM (n = 6). Statistische Auswertung mit zweiseitigem ANOVA. Dabei wurden alle Gruppen miteinander verglichen. \* = p < 0,05; \*\* = p < 0,01; \*\*\* = p < 0,001; \*\*\*\* = p < 0,0001.

#### 4.4.3.2 Transfer von IgE<sup>-</sup>-Plasma aus 14 Tage CSC-behandelten Mäusen

Ob das im Plasma von 14 Tage mit CSC-behandelten Mäusen vorhandene IgE zur Verbesserung des EAE Scores nach Plasma-Transfer beiträgt, sollte in einem weiteren Experiment untersucht werden. Es wurden naive Bl/6N Mäuse als Spender verwendet und täglich für 14 Tage mit CSC behandelt. Anschließend wurde den Mäusen Blut entnommen und daraus Plasma gewonnen. Aus einer Hälfte des Plasmas wurde daraufhin mittels Sepharose das IgE komplett entfernt. Die beiden Plasmen (im Folgenden IgE<sup>-</sup>-CSC-Plasma bzw. CSC-Plasma genannt) bzw. NaCl als Kontrolle wurden an Tag 1, Tag 8 und Tag 15 in EAE-immunisierte Mäuse i.p. injiziert. Die Immunisierung der Mäuse durch s.c. Injektion von MOG<sub>35-55</sub>-Peptid zusammen mit CFA erfolgte an Tag 0.

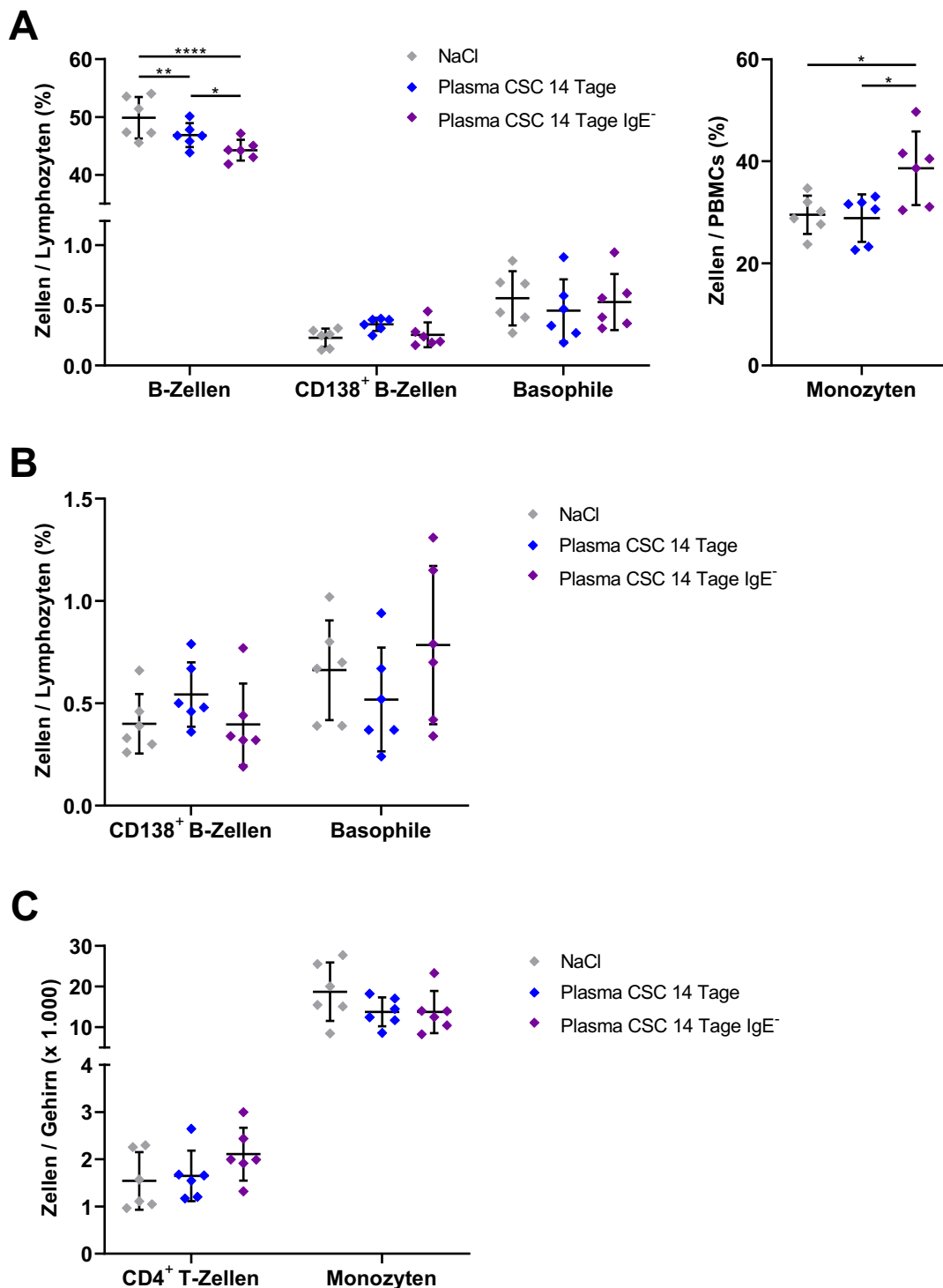
Nach der Entfernung von IgE aus dem Plasma wurde mittels ELISA die im Plasma verbliebene Konzentration an IgE bestimmt (Abbildung 36D). Es ist deutlich zu erkennen, dass IgE vollständig aus dem Plasma entfernt wurde, während das ursprüngliche Plasma eine IgE Konzentration von  $1.643,7 \pm 75,3$  ng/ml enthielt.

Der Verlauf der klinischen Symptome der EAE ist in Abbildung 34A dargestellt. Die ersten Symptome erschienen 9 Tage nach Immunisierung und steigerten sich bis etwa Tag 17. Ein leichter Abfall bzw. keine weitere Steigung war daraufhin erkennbar. Durch den Transfer von IgE<sup>-</sup>-CSC-Plasma entwickelte sich der Score sehr ähnlich verglichen mit der Kontrolle. Die Scores beider Gruppen befanden sich gegen Ende des Experiments bei  $7 \pm 1$  (Kontrolle) und  $7,7 \pm 0,4$  (IgE<sup>-</sup>-CSC-Plasma). Der Transfer von CSC-Plasma dagegen führte zu einer Verbesserung des klinischen Scores. Der Score stieg bis Tag 12 kaum an, anschließend wurden die Krankheitssymptome bis etwa Tag 17 stärker und stiegen bis zum Versuchsende auf  $5,2 \pm 0,8$  an. Bei Betrachtung der Summe der Scores über den Verlauf des Experiments wurde ein signifikanter Unterschied der Scores von Mäusen mit transferiertem CSC-Plasma ( $35,5 \pm 6,1$ ) und IgE<sup>-</sup>-CSC-Plasma ( $60,5 \pm 4,7$ ) deutlich (Abbildung 34B).



**Abbildung 34: Klinischer EAE Score von Mäusen nach Transfer von IgE<sup>-</sup> und IgE<sup>+</sup> Plasma.** Naive BI/6N Mäuse wurden für 14 Tage täglich mit CSC (10 mg / Injektion) i.p. behandelt. Anschließend wurde Blut entnommen und daraus das Plasma gewonnen. Aus einer Hälfte des Plasmas wurde anschließend IgE depletiert. Das Plasma bzw. NaCl als Kontrolle wurde EAE-immunisierten Mäusen an Tag 1, Tag 8 und Tag 15 i.p. injiziert. Die Immunisierung mit MOG<sub>35-55</sub> erfolgte an Tag 0. (A) Klinische Symptome der EAE (EAE Score) wurden täglich erhoben. (B) Summe der täglichen EAE Scores (Tag 1 bis 20). Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM (n = 6). Statistische Auswertung bei (A) mit zweiseitigem ANOVA und (B) mit einseitigem ANOVA. Dabei wurden alle Gruppen miteinander verglichen. \* = p < 0,05; \*\* = p < 0,01; \*\*\* = p < 0,001; \*\*\*\* = p < 0,0001.

Am Versuchsende an Tag 21 wurden den Mäusen unterschiedliche Organe entnommen, damit die enthaltenen Zellen mittels FACS-Analyse untersucht werden konnten. In der Milz sank der Anteil an B-Zellen bezogen auf die gesamten Lymphozyten von  $49,9 \pm 1,47$  % (Kontrolle) auf  $46,9 \pm 0,85$  % bei Transfer von CSC-Plasma bzw. auf  $44,3 \pm 0,73$  % bei Transfer von IgE<sup>-</sup>-CSC-Plasma, ab (Abbildung 35A). Der Anteil an CD138<sup>+</sup> B-Zellen und Basophilen bezogen auf die Lymphozyten in der Milz zeigten keine Unterschiede zwischen den Gruppen. Der Transfer von IgE<sup>-</sup>-CSC-Plasma führte zu einem erhöhten Anteil an Monozyten bezogen auf PBMCs ( $38,7 \pm 2,94$  %) verglichen mit der Kontrolle ( $29,5 \pm 1,53$  %). Im Blut war kein Unterschied im Anteil an CD138<sup>+</sup> B-Zellen und Basophilen im Vergleich zu den gesamten Lymphozyten zwischen den Gruppen erkennbar (Abbildung 35B). Zudem zeigten sich keine Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen bei der Anzahl an CD4<sup>+</sup> T-Zellen und Monozyten im Gehirn (Abbildung 35C).

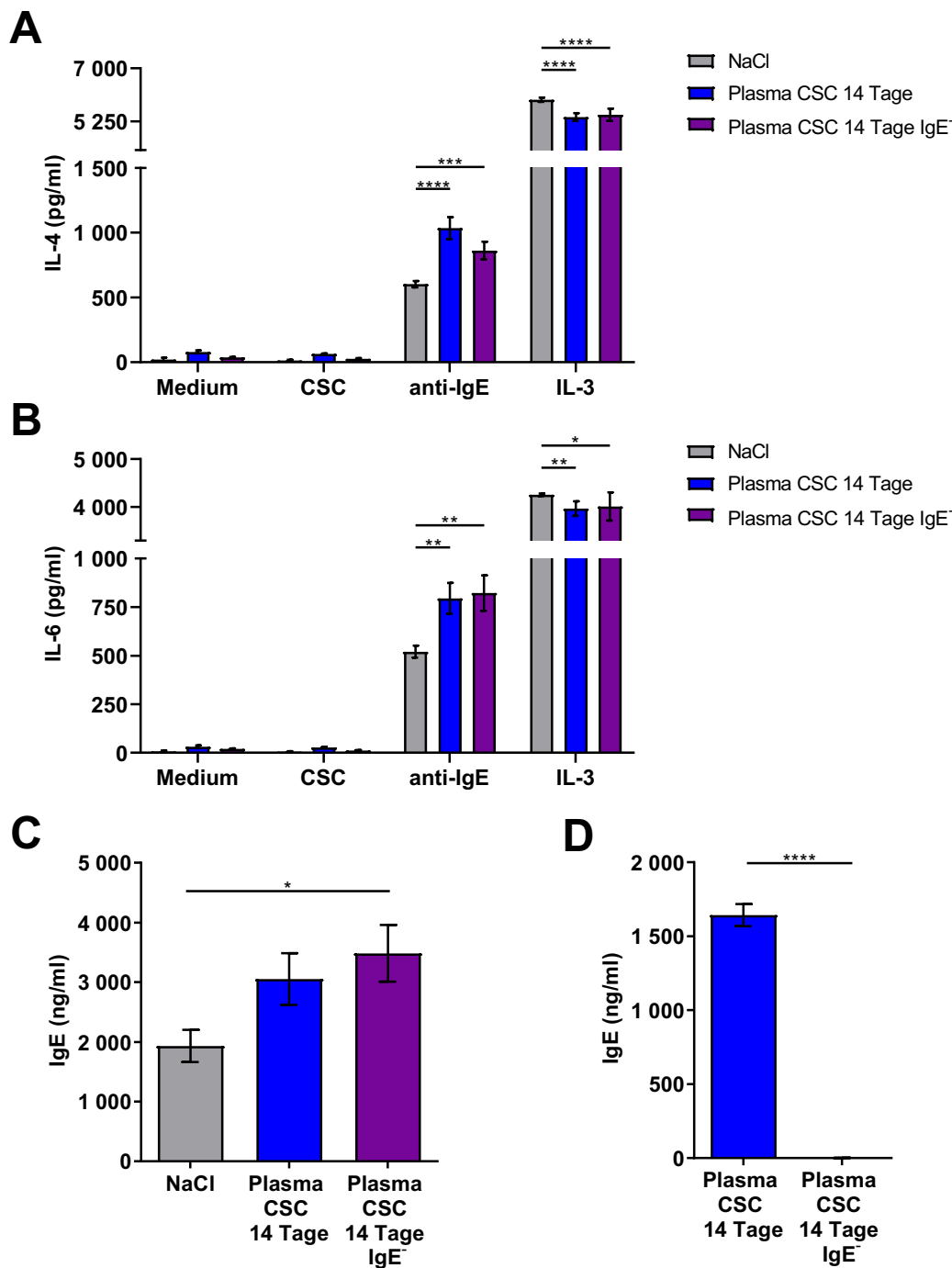


**Abbildung 35: Analyse der Zellen in Milz, Blut und Gehirn nach EAE mit Transfer von IgE<sup>-</sup> und IgE<sup>+</sup> Plasma.** Naive B1/6N Mäuse wurden für 14 Tage täglich mit CSC (10 mg / Injektion) i.p. behandelt. Anschließend wurde Blut entnommen und daraus das Plasma gewonnen. Aus einer Hälfte des Plasmas wurde anschließend IgE depletiert. Das Plasma bzw. NaCl als Kontrolle wurde EAE-immunisierten Mäusen an Tag 1, Tag 8 und Tag 15 i.p. injiziert. Die Immunisierung mit MOG<sub>35-55</sub> erfolgte an Tag 0. Präparation von Milz, Blut und Gehirn an Tag 21 mit anschließender Färbung mit Fluorochrom-konjugierten Antikörpern und FACS-Analyse. (A) Prozentualer Anteil an Zellen bezogen auf Lymphozyten bzw. PMBCs in der Milz. (B) Prozentualer Anteil an Zellen bezogen auf Lymphozyten im Blut. (C) Anzahl an Zellen im Gehirn. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM (n = 6). Statistische Auswertung mit einseitigem bzw. zweiseitigem ANOVA. Dabei wurden alle Gruppen miteinander verglichen. \* = p < 0,05; \*\* = p < 0,01; \*\*\* = p < 0,001; \*\*\*\* = p < 0,0001.

Am Versuchsende wurde den Mäusen das Knochenmark entnommen, um daraus CD49b<sup>+</sup> Zellen zu isolieren, die für 24 Stunden stimuliert wurden. Anschließend konnte deren Sekretion von IL-4 und IL-6 in den Zellkulturüberstand mittels ELISA bestimmt werden. Die Stimulation der CD49b<sup>+</sup> Zellen mit CSC führte zu keiner erhöhten Ausschüttung von IL-4 bzw. IL-6; die jeweiligen Konzentrationen lagen auf dem gleichen Level wie die der Kontrolle, die nur mit Medium inkubiert wurden (Abbildung 36A und 36B). Die Stimulation mit  $\alpha$ IgE führte zu einer deutlichen Aktivierung der Zellen, wobei durch den Transfer von Plasma mehr Zytokine ( $1.035,8 \pm 49,5$  pg/ml IL-4 und  $795 \pm 45,7$  pg/ml IL-6 bei CSC-Plasma und  $861,7 \pm 39,1$  pg/ml IL-4 und  $822,5 \pm 52,7$  pg/ml IL-6 bei IgE<sup>-</sup>-CSC-Plasma) ausgeschüttet wurden, als durch die Kontrolle ( $603 \pm 14,3$  pg/ml IL-4 und  $520,1 \pm 17,8$  pg/ml IL-6). Durch die Stimulierung mit IL-3 wurden die CD49b<sup>+</sup> Zellen am stärksten aktiviert. Es wurden durch die Kontrolle IL-4 mit einer Konzentration von  $5.963 \pm 41,5$  pg/ml und IL-6 mit einer Konzentration von  $4.256,6 \pm 15,1$  pg/ml ausgeschüttet, während durch die beiden Gruppen mit Plasma-Transfer etwas weniger Zytokine ( $5.392,3 \pm 75,4$  pg/ml IL-4 und  $3.969,4 \pm 88,1$  pg/ml IL-6 bei CSC-Plasma und  $5.469,2 \pm 114,7$  pg/ml IL-4 und  $4.014 \pm 168,7$  pg/ml IL-6 bei IgE<sup>-</sup>-CSC-Plasma) sekretiert wurden.

Durch beide Plasma-Transfers stieg die Konzentration von IgE im Plasma der Versuchstiere an (Abbildung 36C). Dabei stieg die Konzentration von  $1.931,4 \pm 270$  ng/ml (Kontrolle) auf  $3.054,1 \pm 431,9$  ng/ml durch den Transfer von CSC-Plasma bzw. auf  $3.484,7 \pm 474,5$  ng/ml durch den Transfer von IgE<sup>-</sup>-CSC-Plasma an.





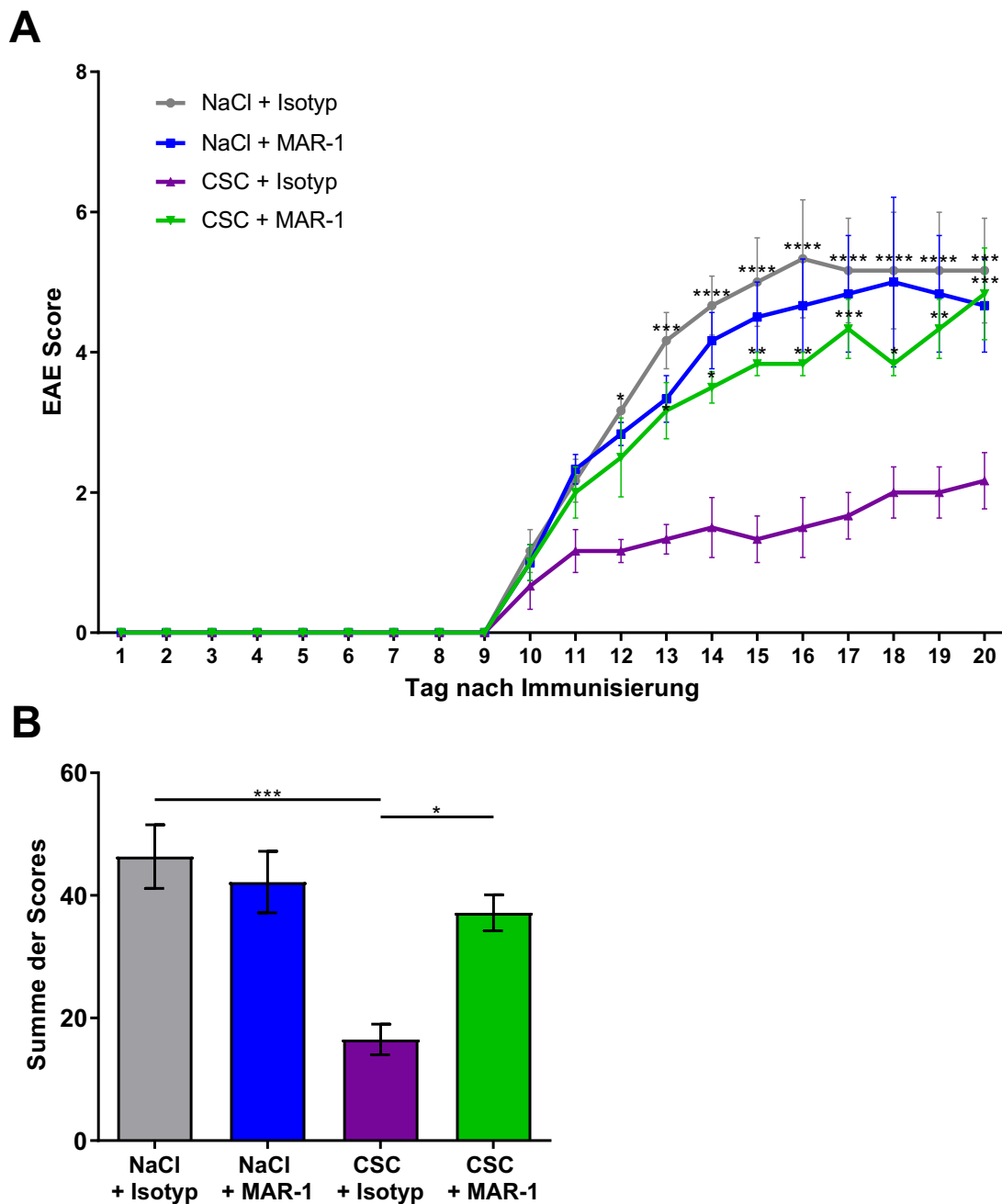
**Abbildung 36: Sekretion von IL-4 und IL-6 in den Zellkulturüberstand bzw. Sekretion von IgE ins Plasma nach EAE mit Transfer von IgE<sup>-</sup> und IgE<sup>+</sup> Plasma.** Naive BI/6N Mäuse wurden für 14 Tage täglich mit CSC (10 mg / Injektion) i.p. behandelt. Anschließend wurde Blut entnommen und daraus Plasma gewonnen. Aus einer Hälfte des Plasmas wurde IgE depletiert. Das Plasma bzw. NaCl als Kontrolle wurde EAE-immunisierten Mäusen an Tag 1, Tag 8 und Tag 15 i.p. injiziert. Die Immunisierung mit MOG<sub>35-55</sub> erfolgte an Tag 0. Präparation von Knochenmark und Isolation von CD49b<sup>+</sup> Zellen an Tag 21. Die Stimulation erfolgte mit CSC (10 µg/ml), αIgE (1 µg/ml) und IL-3 (25 ng/ml) für 24 Stunden bei 37 °C im Brutschrank. Blutentnahme mit Gewinnung von Plasma an Tag 21. Die Konzentrationen von IL-4 und IL-6 im Zellkulturüberstand bzw. von IgE im Plasma der Versuchstiere und der Spendertiere wurden mittels ELISA getestet. (A) Konzentration von IL-4 im Zellkulturüberstand. (B) Konzentration von IL-6 im Zellkulturüberstand. (C) Konzentration von IgE im Plasma der Versuchstiere (n = 6). (D) IgE im Plasma der Spendertiere. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM (n = 3). Statistische Auswertung bei (C) mit einseitigem bzw. bei (A) und (B) mit zweiseitigem ANOVA und bei (D) mit zweiseitigem ungepaartem T-Test. Dabei wurden die Gruppen mit der Kontrolle verglichen. \* = p < 0,05; \*\* = p < 0,01; \*\*\* = p < 0,001; \*\*\*\* = p < 0,0001.

#### 4.4.4 Depletion von Basophilen mit zusätzlicher Behandlung mit CSC

Da durch die Behandlung von Mäusen mit CSC viel IgE produziert wird und ebenfalls der IgE Median auf Basophilen ansteigt, sollte in einem weiteren Experiment der Einfluss von Basophilen auf die Wirkweise von CSC im Modell der EAE untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden in Mäusen mit einer induzierten EAE durch die Injektion des Antikörpers anti-mouse Fc $\epsilon$ R1 $\alpha$  (MAR-1) von Tag 5 bis 7 die Basophilen depletiert. Als Kontrolle diente die Injektion eines Isotyps. Durch die zusätzliche Injektion von CSC von Tag 1-20 konnte der Einfluss von Basophilen auf eine Verbesserung der EAE durch CSC Injektion analysiert werden (NaCl + Isotyp, NaCl + MAR-1, CSC + Isotyp, CSC + MAR-1). Die Immunisierung der Mäuse durch s.c. Injektion von MOG<sub>35-55</sub>-Peptid zusammen mit CFA erfolgte an Tag 0.

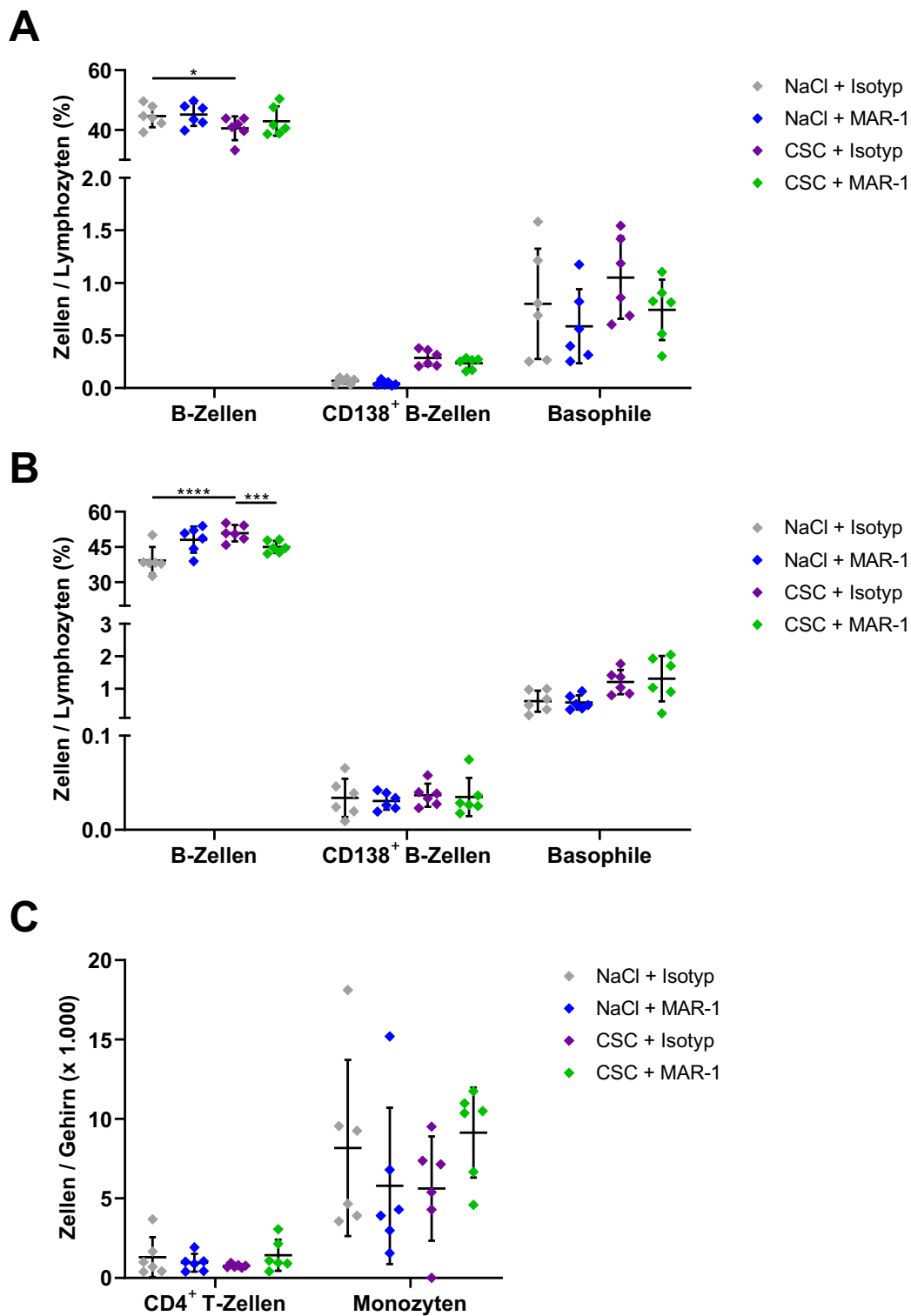
Nach der Injektion von MAR-1 wurde an Tag 8 mittels FACS-Analyse von wenigen entnommenen Tropfen Blut die verbliebene Menge an Basophilen bestimmt (Abbildung 39B). Die Behandlung mit NaCl + MAR-1 zeigte  $184,8 \pm 54,9$  verbliebene Basophile in 100  $\mu$ l Blut verglichen mit  $3079 \pm 630,8$  Basophilen bei der Behandlung mit NaCl + Isotyp. Gleichermaßen waren bei CSC + MAR-1 noch etwa  $132,7 \pm 35,7$  Basophile in 100  $\mu$ l Blut vorhanden, während sich durch CSC + Isotyp ca.  $2.965,5 \pm 402,8$  Basophile im Blut befanden.

Abbildung 37A zeigt den Verlauf der klinischen Symptome der EAE. Die ersten Symptome erschienen 9 Tage nach Immunisierung und steigerten sich bis etwa Tag 16. Daraufhin war ein leichter Abfall bzw. keine weitere Steigung erkennbar. Durch die Behandlung mit CSC + Isotyp stieg der Score nur leicht an und verblieb dann bis zum Versuchsende auf  $2,2 \pm 0,4$ . Die Kontrolle (NaCl + Isotyp) war mit einem Score von  $5,2 \pm 0,8$  signifikant höher im Vergleich zu CSC + Isotyp. Zudem war die Gruppe CSC + MAR-1 signifikant kränker, als CSC + Isotyp und verlief mit einem Score von  $4,8 \pm 0,7$  in etwa auf der Höhe von sowohl NaCl + Isotyp ( $5,2 \pm 0,8$ ) als auch NaCl + MAR-1 ( $4,7 \pm 0,7$ ). Bei Betrachtung der Summe der Scores über den Verlauf des Experiments ist erkennbar, dass CSC + Isotyp mit einem Gesamtscore von  $16,5 \pm 2,5$  den Krankheitsverlauf der EAE deutlich verbesserte im Vergleich zu NaCl + Isotyp ( $46,3 \pm 5,2$ ) und CSC + MAR-1 ( $37,2 \pm 2,9$ ) (Abbildung 37B).



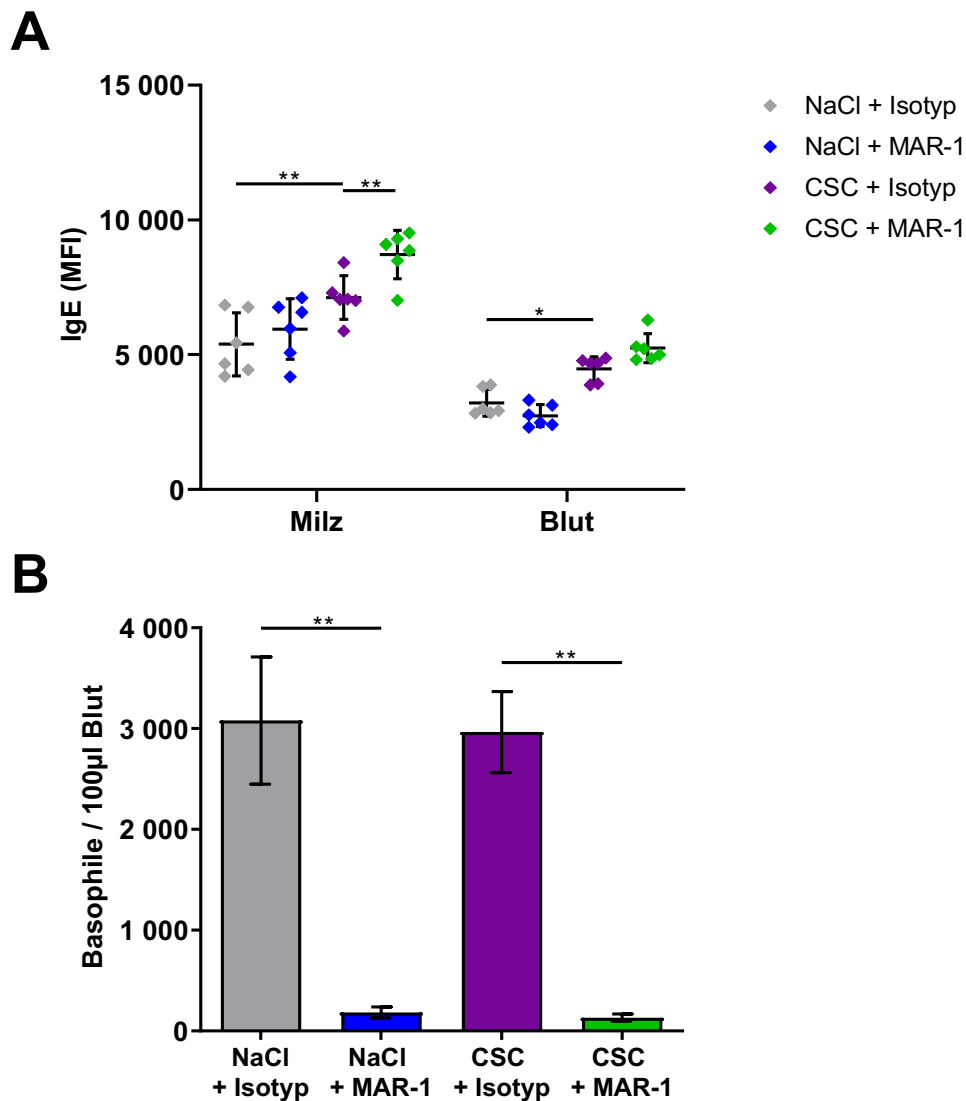
**Abbildung 37: Klinischer EAE Score von Mäusen mit Depletion von Basophilen und Behandlung mit CSC.** Naive B1/6N Mäuse wurden von Tag 1 bis 20 täglich mit NaCl bzw. mit CSC (10 mg / Injektion) i.p. behandelt. Durch die Injektion von MAR-1 (10 µg) an Tag 5 bis 7 (bzw. Isotyp als Kontrolle) wurden Basophile depletiert. Die Immunisierung mit MOG<sub>35-55</sub> erfolgte an Tag 0. (A) Klinische Symptome der EAE (EAE Score) wurden täglich erhoben. (B) Summe der täglichen EAE Scores (Tag 1 bis 20). Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM (n = 6). Statistische Auswertung bei (A) mit zweiseitigem ANOVA und (B) mit einseitigem ANOVA. Dabei wurden alle Gruppen mit CSC + Isotyp verglichen. \* = p < 0,05; \*\* = p < 0,01; \*\*\* = p < 0,001; \*\*\*\* = p < 0,0001.

Am Versuchsende an Tag 21 wurden den Mäusen unterschiedliche Organe entnommen, damit die enthaltenen Zellen mittels FACS-Analyse untersucht werden konnten. Der Anteil an B-Zellen bezogen auf die gesamten Lymphozyten in der Milz sank durch die Behandlung mit CSC + Isotyp auf  $40,6 \pm 1,6\%$  ab (Kontrolle  $44,6 \pm 1,5\%$ ) (Abbildung 38A). Der Anteil an  $CD138^+$  B-Zellen wurde durch beide CSC-Behandlungen nur leicht erhöht, während beim Anteil an Basophilen von den gesamten Lymphozyten kein Unterschied zwischen den Gruppen zu erkennen war. Im Blut dagegen stieg der Anteil an B-Zellen durch beide Behandlungen mit CSC im Vergleich zur Kontrolle an (Kontrolle  $39,3 \pm 2,3\%$ ; CSC + Isotyp  $50,9 \pm 1,4\%$ ; CSC + MAR-1  $45 \pm 1\%$ ). (Abbildung 38B). Bei  $CD138^+$  B-Zellen und Basophilen waren keine Unterschiede am Anteil an Lymphozyten zwischen den Gruppen erkennbar. Ebenfalls keinen Unterschied zwischen den Gruppen zeigte die Anzahl an  $CD4^+$  T-Zellen und Monozyten im Gehirn (Abbildung 38C).



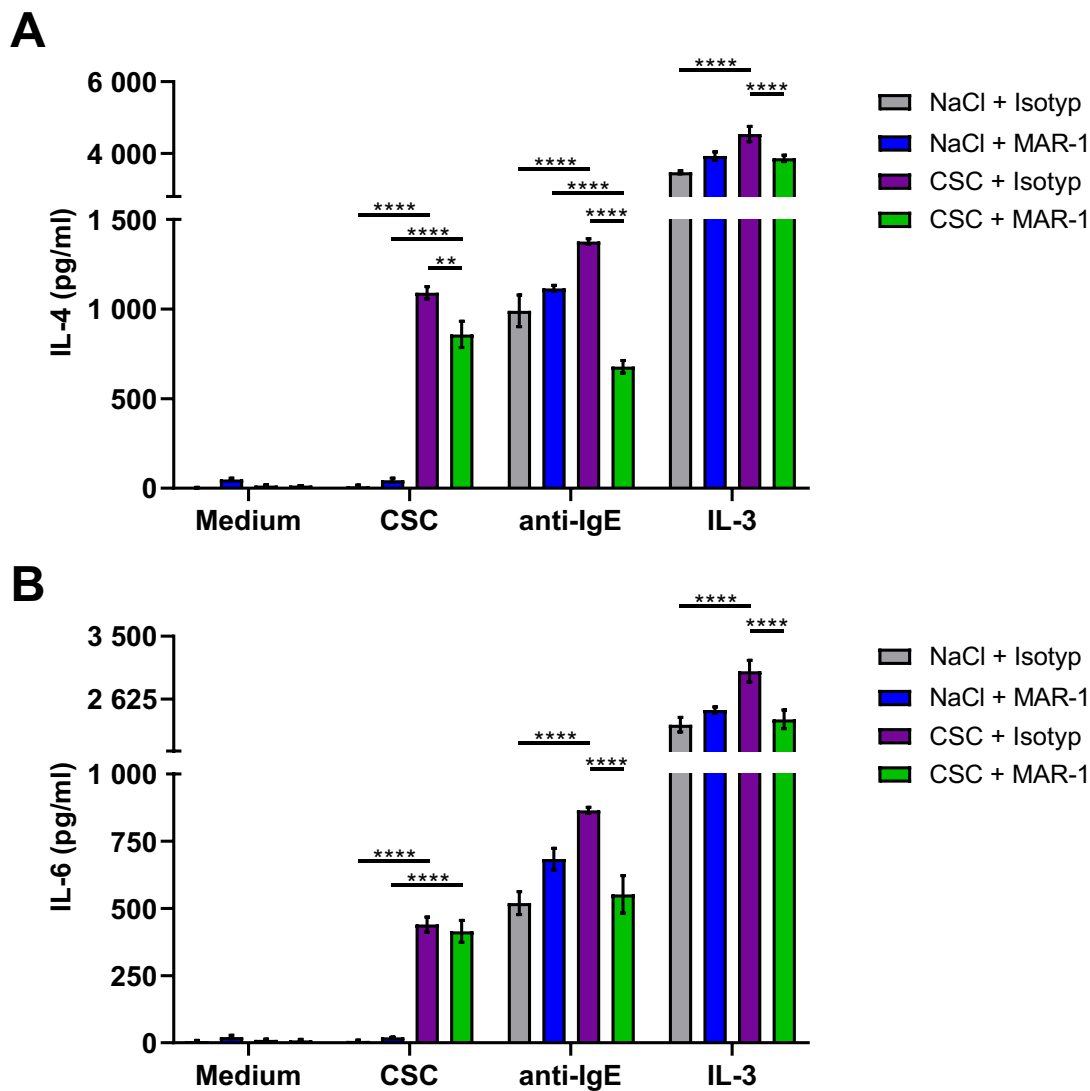
**Abbildung 38: Analyse der Zellen in Milz, Blut und Gehirn nach EAE mit Depletion von Basophilen und Behandlung mit CSC.** Naive BI/6N Mäuse wurden von Tag 1 bis 20 täglich mit NaCl bzw. mit CSC (10 mg / Injektion) i.p. behandelt. Durch die Injektion von MAR-1 (10 µg) an Tag 5 bis 7 (bzw. Isotyp als Kontrolle) wurden Basophile depletiert. Die Immunisierung mit MOG<sub>35-55</sub> erfolgte an Tag 0. Präparation von Milz, Blut und Gehirn an Tag 21 mit anschließender Färbung mit Fluorochrom-konjugierten Antikörpern und FACS-Analyse. (A) Prozentualer Anteil an Zellen bezogen auf Lymphozyten in der Milz. (B) Prozentualer Anteil an Zellen bezogen auf Lymphozyten im Blut. (C) Anzahl an Zellen im Gehirn. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM (n = 6). Statistische Auswertung mit zweiseitigem ANOVA. Dabei wurden alle Gruppen mit CSC + Isotyp verglichen. \* = p < 0,05; \*\* = p < 0,01; \*\*\* = p < 0,001; \*\*\*\* = p < 0,0001.

Bei Betrachtung des IgE Medians auf Basophilen in der Milz ist erkennbar, dass durch beide CSC-Behandlungen die MFI von IgE anstieg (Abbildung 39A). Dabei erhöhte sich die MFI von  $5.389 \pm 477,7$  in der Kontrolle auf  $7.120 \pm 330,1$  durch CSC + Isotyp und auf  $8.715 \pm 368,7$  durch CSC + MAR-1. Im Blut stieg die MFI von  $3.212 \pm 201,9$  (Kontrolle) auf  $4.470 \pm 182,5$  (CSC + Isotyp) und auf  $5.245 \pm 221,8$  (CSC + MAR-1).



**Abbildung 39: Analyse des IgE Medians auf Basophilen und Überprüfung der Depletion von Basophilen nach EAE mit Depletion von Basophilen und Behandlung mit CSC.** Naive Bl/6N Mäuse wurden von Tag 1 bis 20 täglich mit NaCl bzw. mit CSC (10 mg / Injektion) i.p. behandelt. Durch die Injektion von MAR-1 (10 µg) an Tag 5 bis 7 (bzw. Isotyp als Kontrolle) wurden Basophile depletiert. Die Immunisierung mit MOG<sub>35-55</sub> erfolgte an Tag 0. (A) Präparation von Milz und Blut an Tag 21 mit anschließender Färbung mit Fluorochrom-konjugierten Antikörpern und FACS-Analyse. Gezeigt ist der IgE Median auf Basophilen. (B) Blutabnahme an Tag 8 mit anschließender Färbung mit Fluorochrom-konjugierten Antikörpern und FACS-Analyse. Gezeigt ist die Anzahl an Basophilen in 100 µl Blut. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM (n = 6). Statistische Auswertung mit einseitigem bzw. zweiseitigem ANOVA. Dabei wurden alle Gruppen miteinander verglichen. \* = p < 0,05; \*\* = p < 0,01; \*\*\* = p < 0,001; \*\*\*\* = p < 0,0001.

Am Versuchsende wurde den Mäusen das Knochenmark entnommen, um daraus CD49b<sup>+</sup> Zellen zu isolieren, die für 24 Stunden stimuliert wurden. Daraufhin wurde deren Sekretion von IL-4 und IL-6 in den Zellkulturüberstand mittels ELISA bestimmt. Nach der Stimulation der Zellen mit CSC kam es nur dann zur Ausschüttung von IL-4 und IL-6, wenn die Mäuse vorher mit CSC behandelt wurden (CSC + Isotyp und CSC + MAR-1) (Abbildung 40). Die Stimulation mit  $\alpha$ IgE konnte CD49b<sup>+</sup> Zellen am besten aktivieren, wenn sie aus Mäusen stammten, die mit CSC + Isotyp behandelt wurden ( $1.376,9 \pm 8,8$  pg/ml IL-4 bzw.  $864,9 \pm 6,6$  pg/ml IL-6 im Vergleich zur Kontrolle mit  $990,3 \pm 50,8$  pg/ml IL-4 und  $520,2 \pm 24,6$  pg/ml IL-6). CD49b<sup>+</sup> Zellen aus Mäusen mit CSC + MAR-1-Behandlung ließen sich am schlechtesten durch  $\alpha$ IgE aktivieren. Diese sekretierten IL-4 mit einer Konzentration von  $678,5 \pm 20,1$  pg/ml und IL-6 mit einer Konzentration von  $552,5 \pm 40,2$  pg/ml in den Zellkulturüberstand. Die Stimulation mit IL-3 führte allgemein zur stärksten Sekretion der Zytokine. Die Zellen sekretierten wieder die meisten Zytokine, wenn die Zellen aus Mäusen mit einer Behandlung mit CSC + Isotyp stammten ( $4.543,3 \pm 122,7$  pg/ml IL-4 und  $3.013,5 \pm 87,2$  pg/ml IL-6 im Vergleich zur Kontrolle mit einer Konzentration von  $3.479,7 \pm 24,2$  pg/ml IL-4 und  $2.268,9 \pm 57,5$  pg/ml IL-6).

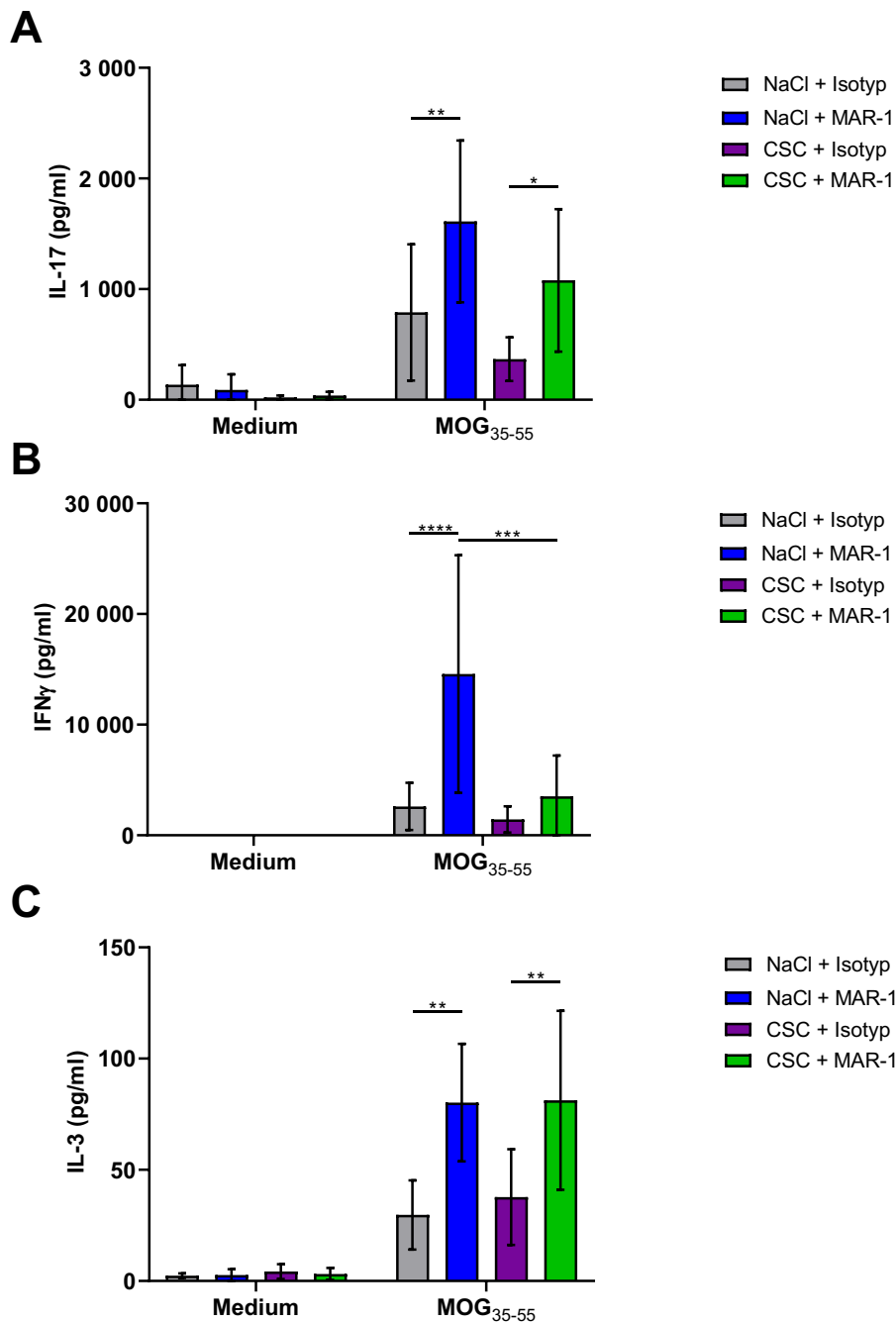


**Abbildung 40: Sekretion von IL-4 und IL-6 durch CD49b<sup>+</sup> Zellen nach EAE mit Depletion von Basophilen und Behandlung mit CSC.** Naive BI/6N Mäuse wurden von Tag 1 bis 20 täglich mit NaCl bzw. mit CSC (10 mg / Injektion) i.p. behandelt. Durch die Injektion von MAR-1 (10 µg) an Tag 5 bis 7 (bzw. Isotyp als Kontrolle) wurden Basophile depletiert. Die Immunisierung mit MOG<sub>35-55</sub> erfolgte an Tag 0. Präparation von Knochenmark und Isolation von CD49b<sup>+</sup> Zellen an Tag 21. Die Stimulation erfolgte mit CSC (10 µg/ml), αIgE (1 µg/ml) und IL-3 (25 ng/ml) für 24 Stunden bei 37 °C im Brutschrank. Die Konzentrationen von IL-4 und IL-6 im Zellkulturüberstand wurden mittels ELISA getestet. (A) Konzentration von IL-4 im Zellkulturüberstand. (B) Konzentration von IL-6 im Zellkulturüberstand. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM (n = 3). Statistische Auswertung mit zweiseitigem ANOVA. Dabei wurden alle Gruppen miteinander verglichen. \* = p < 0,05; \*\* = p < 0,01; \*\*\* = p < 0,001; \*\*\*\* = p < 0,0001.

Am Versuchsende wurden zusätzlich die Milzzellen der Versuchstiere für 3 Tage mit MOG<sub>35-55</sub>-Peptid bzw. Medium als Kontrolle restimuliert und anschließend die Zytokin-Ausschüttung mittels ELISA analysiert. Bei der Restimulation wurden Zellen zur Ausschüttung von IL-17 stimuliert, wenn diese Mäuse vorher mit MAR-1 behandelt wurden (Abbildung 41A). Dabei kam es zu einer Verdopplung der Konzentration von 790 ± 251,2 pg/ml bei NaCl + Isotyp auf 1.611,9 ± 298,8 pg/ml bei NaCl + MAR-1,

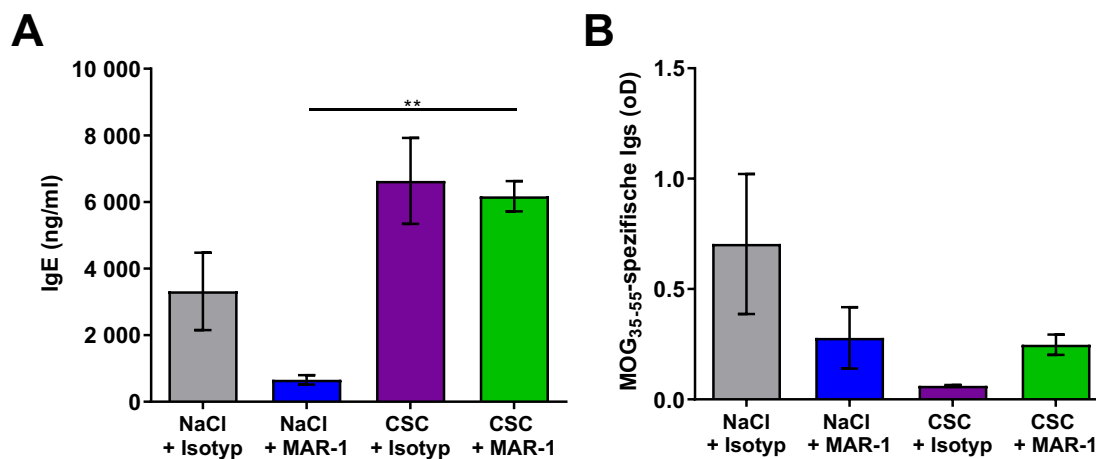


während die Konzentration von  $367,4 \pm 80,2$  pg/ml bei CSC + Isotyp auf  $1.179 \pm 263,1$  pg/ml IL-17 bei CSC + MAR-1 anstieg. Die Ausschüttung von IL-3 der restimulierten Zellen zeigte ein ähnliches Bild, da ebenfalls eine erhöhte Sekretion von IL-3 stattfand, wenn diese Mäuse vorher mit MAR-1 behandelt wurden (NaCl + Isotyp  $29,7 \pm 7$  pg/ml; NaCl + MAR-1  $80,2 \pm 11,8$  pg/ml; CSC + Isotyp  $37,7 \pm 9,6$  pg/ml; CSC + MAR-1  $81,2 \pm 20,1$  pg/ml) (Abbildung 41C). Durch die Behandlung der Mäuse mit NaCl + MAR-1 sekretierten die Milzzellen nach der Restimulation mit MOG<sub>35-55</sub>-Peptid deutlich mehr IFN $\gamma$  mit einer Konzentration von  $14.578 \pm 4.379,8$  pg/ml verglichen mit den restlichen Gruppen (Abbildung 41B).



**Abbildung 41: MOG<sub>35-55</sub>-spezifische Expression von Zytokinen nach EAE mit Depletion von Basophilen und Behandlung mit CSC.** Naive B1/6N Mäuse wurden von Tag 1 bis 20 täglich mit NaCl bzw. mit CSC (10 mg / Injektion) i.p. behandelt. Durch die Injektion von MAR-1 (10 µg) an Tag 5 bis 7 (bzw. Isotyp als Kontrolle) wurden Basophile depletiert. Die Immunisierung mit MOG<sub>35-55</sub> erfolgte an Tag 0. Präparation der Milz und Stimulation der Milzzellen mit MOG<sub>35-55</sub>-Peptid (20 µg/ml) für 3 Tage bei 37 °C im Brutschrank. Konzentrationsbestimmung mittels ELISA. (A) Konzentration von IL-17 im Zellkulturüberstand. (B) Konzentration von IFN $\gamma$  im Zellkulturüberstand. (C) Konzentration von IL-3 im Zellkulturüberstand. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM (n = 6). Statistische Auswertung mit zweiseitigem ANOVA. Dabei wurden alle Gruppen miteinander verglichen. \* = p < 0,05; \*\* = p < 0,01; \*\*\* = p < 0,001; \*\*\*\* = p < 0,0001.

Durch beide Behandlungen mit CSC stieg die Konzentration von IgE im Plasma der Versuchstiere an (Abbildung 42A). Dabei erhöhte sich die IgE Konzentration verglichen mit der Kontrolle ( $3.315,8 \pm 1.161$  ng/ml) auf  $6.633,7 \pm 1.289,3$  ng/ml durch CSC + Isotyp und auf  $6.170,7 \pm 454,3$  ng/ml durch CSC + MAR-1. Die IgE Konzentration sank durch NaCl + MAR-1 auf  $658,2 \pm 138,3$  ng/ml ab. Die gemessene oD der im Plasma vorhandenen MOG<sub>35-55</sub>-spezifischen Igs war bei CSC + Isotyp mit einer oD von  $0,06 \pm 0,004$  am geringsten (Abbildung 42B). Durch die Behandlung mit CSC + MAR-1 hingegen stieg sie auf  $0,25 \pm 0,05$  an. Die höchste oD wurde mit  $0,7 \pm 0,32$  bei NaCl + Isotyp detektiert, während die oD bei NaCl + MAR-1 bei  $0,28 \pm 0,14$  lag.



**Abbildung 42: Sekretion von IgE und MOG<sub>35-55</sub>-spezifischen Igs ins Plasma nach EAE mit Depletion von Basophilen und Behandlung mit CSC.** Naive BI/6N Mäuse wurden von Tag 1 bis 20 täglich mit NaCl bzw. mit CSC (10 mg / Injektion) i.p. behandelt. Durch die Injektion von MAR-1 (10 µg) an Tag 5 bis 7 (bzw. Isotyp als Kontrolle) wurden Basophile depletiert. Die Immunisierung mit MOG<sub>35-55</sub> erfolgte an Tag 0. Blutabnahme an Tag 21 mit anschließender Isolation von Plasma. Konzentrationsbestimmung im Plasma mittels ELISA. (A) Konzentration von IgE im Plasma. (B) Konzentration von MOG<sub>35-55</sub>-spezifischen Igs im Plasma. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM (n = 6). Statistische Auswertung mit einseitigem ANOVA. Dabei wurden alle Gruppen miteinander verglichen. \* = p < 0,05; \*\* = p < 0,01; \*\*\* = p < 0,001; \*\*\*\* = p < 0,0001.

## 5. Diskussion

### 5.1 CSC führt zur Proliferation von B-Zellen *in vitro* und zu einem antiinflammatorischen Zytokin-Profil

Zunächst sollten die grundlegenden Eigenschaften von B-Zellen, die *in vitro* mit CSC stimuliert wurden, untersucht werden. Es wurde festgestellt, dass die Stimulation von B-Zellen mit CSC für 5 Tage zur Proliferation der Zellen führte. So konnte ein direkter Einfluss von CSC auf B-Zellen gezeigt werden. Im Einklang mit diesem Ergebnis wurde bereits publiziert, dass die Stimulation *in vitro* mit CSB zur Proliferation von B-Zellen führte [148].

Um einen Hinweis darauf zu erhalten, ob eine mit CSC stimulierte B-Zelle einen regulatorischen Phänotyp besitzt, kann untersucht werden, ob diese ein pro- oder antiinflammatorisches Zytokin-Profil besitzt [145]. Zu diesem Zweck wurden B-Zellen mit CSC für 4 Tage stimuliert, woraufhin die Konzentration des proinflammatorischen Zytokins IL-6 und des antiinflammatorischen Zytokins IL-10 im Zellkulturüberstand bestimmt wurde. Die Stimulation von B-Zellen mit CSC zeigte ein signifikant höheres IL-10 / IL-6-Verhältnis, als die Stimulationen mit LPS, aCD40 oder CpG und wies mit einer 3,5-fachen Konzentration von IL-10 im Vergleich zu IL-6 ein antiinflammatorisches Zytokin-Profil auf.

### 5.2 CSC moduliert die CD138 Expression von B-Zellen *in vitro* und *in vivo* und führt zur Sekretion von IgE

Es wurde beobachtet, dass B-Zellen nach Stimulation mit CSC *in vitro* für 4 Tage vermehrt CD138 auf ihrer Zelloberfläche exprimierten. Bei CD138 (Syndecan-1) handelt es sich um ein Transmembranprotein, welches für Zell-Zell-Interaktionen und Zell-Matrix-Interaktionen wichtig ist und über seine extrazelluläre Domäne unter anderem Chondroitinsulfat binden kann [149]. Zudem ist bekannt, dass die Differenzierung von naiven B-Zellen in Plasmazellen von einer Erhöhung der CD138-Expression begleitet wird [150]. Des Weiteren wurden CD138<sup>+</sup> Antikörper-sekretierende Plasmazellen als IL-10 produzierende regulatorische Plasmazellen definiert [151]. Jedoch ist fraglich, ob sich 4 Tage mit CSC stimulierte B-Zellen in Plasmazellen entwickeln können, da

die Differenzierung von B-Zellen in Plasmazellen gewöhnlich in der GC-Reaktion stattfindet und dabei deutlich länger als 4 Tage benötigt [18]. Stattdessen könnte es sein, dass die Bindung von CS durch CD138 die Expression von CD138 positiv beeinflusst. Auch sollten CSC-stimulierte B-Zellen *in vivo* genauer untersucht werden. Hierbei war, ähnlich wie auch schon bei der *in vitro* Stimulation beobachtet, eine erhöhte Expression an CD138 auf den B-Zellen in der Milz zu erkennen, wenn die Mäuse für 5 Tage oder für 14 Tage täglich mit 10 mg CSC behandelt wurden. Eine Modulation von CD138 auf B-Zellen durch CS *in vivo* wurde bereits publiziert [72]. Im Gegensatz dazu war keine Modulation der CD138-Expression auf B-Zellen im Blut erkennbar. Dies könnte daran liegen, dass CSC-stimulierte B-Zellen in die Milz einwandern, um sich dort in CD138<sup>+</sup> Plasmazellen zu differenzieren.

Da die vorherigen Untersuchungen zeigten, dass die CSC-Behandlung die Differenzierung von Plasmazellen zu fördern scheint, wurde daraufhin die Konzentration an sekretierten Antikörpern im Plasma von Mäusen, die für 5 Tage oder für 14 Tage mit CSC behandelt wurden, bestimmt. Es zeigte sich im Vergleich zur Kontrolle mit 90 ng/ml eine signifikante Erhöhung der IgE-Konzentration im Plasma von Mäusen, die für 14 Tage mit CSC behandelt wurden auf 1.800 ng/ml. Im Gegensatz dazu lag die IgE Konzentration im Plasma nach Behandlung mit CSC für 5 Tage bei 35 ng/ml. Dies konnte die Hypothese, dass CSC Antikörper-sekretierende Plasmazellen induziert, untermauern. Es wurde bereits publiziert, dass die *in vitro* Stimulation mit CSB zu einer erhöhten Sekretion von IgM führte [152]. In diesem Fall schienen die Plasmazellen *in vivo* einen Klassenwechsel zu IgE durchlaufen zu haben. Dieser Prozess schien mehr als 5 Tage gedauert zu haben, da die IgE Konzentration nach CSC-Behandlung für 5 Tage noch keine Erhöhung im Vergleich zur Kontrolle zeigte.

### **5.3 Basophile sind nach CSC-Behandlung besser aktivierbar und binden IgE**

Da die *in vivo* Stimulation mit CSC zu einer starken Produktion von IgE führte, sollte zudem der Einfluss von CSC auf Basophile untersucht werden. Diese tragen den hoch affinen FcεRI auf ihrer Oberfläche, der den Fc-Teil von IgE bindet [37]. Basophile sind in der Lage die Differenzierung von B-Zellen in Plasmazellen zu fördern und können

dabei einen Klassenwechsel zu IgE unabhängig von T-Zellen induzieren [51]. Darüber hinaus unterstützen Basophile die Proliferation von B-Zellen [52].

Daher wurde zunächst die Menge an den insgesamt auf der Zelloberfläche von Basophilen gebundenen Igs nach Behandlung mit CSC für 5 bzw. 14 Tage bestimmt, indem die MFI von gesamt Ig betrachtet wurde. Es zeigte sich eine signifikante Erhöhung an gebundenen Igs nach 14 Tagen CSC im Vergleich zur Kontrolle. Die Behandlung mit CSC für 5 Tage führte dagegen nicht zu einer vermehrten Bindung von Igs. Bei Betrachtung der von Basophilen gebundenen IgE-Antikörper zeigt sich, dass es sich bei den insgesamt gebundenen Igs vor allem um IgE handeln muss, da hier eine ähnliche Erhöhung der MFI erkennbar war. Dies lässt sich dadurch erklären, dass die Expression von FcεRI von Basophilen direkt mit der Konzentration von IgE im Plasma korreliert [49], da IgE FcεRI auf der Zelloberfläche stabilisiert [37]. Da nach 14 Tagen CSC-Behandlung eine stark erhöhte Konzentration an IgE im Plasma detektierbar war, konnte mehr IgE von FcεRI gebunden werden, wodurch sich die MFI erhöhte. Dies fand nach 5 Tagen CSC-Behandlung nicht statt, da in diesem Fall kaum IgE im Plasma vorhanden war.

Des Weiteren sollte untersucht werden, wie gut sich Basophile nach der Behandlung mit CSC für 14 Tage aktivieren lassen. Hierfür wurden CD49b<sup>+</sup> Zellen aus dem Knochenmark, welche vor allem aus NK-Zellen und Basophilen bestehen, für 24 Stunden stimuliert und anschließend deren Sekretion von IL-4 und IL-6 erfasst, die ein Maß der Aktivierung darstellen [46]. Es war erkennbar, dass sich CD49b<sup>+</sup> Zellen nur durch CSC aktivieren ließen, wenn diese aus CSC-behandelten Mäusen stammten. Dies lässt darauf schließen, dass es sich beim sekretierten IgE zumindest teilweise um CSC-spezifisches IgE handelt. Durch Bindung von CSC an FcεRI-gebundenes CSC-spezifisches IgE kommt es zur Quervernetzung der IgE-Rezeptoren und zur Aktivierung der Basophilen. Auch war eine Aktivierung mit αIgE bei CD49b<sup>+</sup> Zellen aus CSC-behandelten Mäusen effektiver, als bei der Kontrolle. Da wie bereits erwähnt die Expression von FcεRI von Basophilen direkt mit der Konzentration von IgE im Plasma korreliert [49], sollten Basophile aus Mäusen, die nur mit NaCl behandelt wurden, deutlich weniger FcεRI und gebundenes IgE auf ihrer Zelloberfläche tragen, als Mäuse, die mit CSC behandelt wurden, da in diesem Fall weniger IgE durch B-Zellen produziert wurde. Daraus resultiert die schlechtere Aktivierbarkeit durch eine Quervernetzung mit αIgE.

## 5.4 Behandlung mit CSC verbessert den Verlauf der EAE in Abhängigkeit von B-Zellen

Nachdem die grundlegenden Eigenschaften von CSC-induzierten B-Zellen *in vitro* und *in vivo* untersucht wurden, sollten diese potentiell regulatorisch agierenden B-Zellen im inflammatorischen Maus-Modell der EAE, welches die humane MS nachbildet, auf deren suppressive Wirkung getestet werden.

Es wurden Mäuse mit einer MOG<sub>35-55</sub>-induzierten EAE mit 10 mg CSC i.p. behandelt. Die Injektionen fanden dabei täglich und je nach Versuchsaufbau in unterschiedlichen Zeiträumen statt. Mäuse wurden entweder von Tag -15 bis -1 vorbehandelt, von Tag 1-20 während des Krankheitsverlaufes behandelt, von Tag -14 bis 20 sowohl vor als auch nach der Induktion behandelt, oder von Tag -35 bis -22 und Tag 1-20 vor der Induktion und anschließend während des Krankheitsverlaufes als zweiten *Boost* mit CSC behandelt.

Abgesehen von der Vorbehandlung mit CSC (Tag -15 bis -1), durch welche sich der Ausbruch der Krankheitssymptome lediglich verlangsamte, konnten alle Behandlungen mit CSC den Krankheitsverlauf der EAE signifikant im Vergleich zur Kontrolle verbessern und die Ausbildung von Lähmungserscheinungen deutlich reduzieren. Bei der Untersuchung von unterschiedlichen Zellpopulationen der Versuchstiere wurde festgestellt, dass wie schon *in vivo* in naiven Tieren beobachtet, die Behandlung mit CSC zu einer signifikanten Erhöhung an CD138<sup>+</sup> B-Zellen in der Milz führte. Es wurde eine erhöhte Anzahl an Basophilen in der Milz beobachtet, die auf eine Interaktion von Basophilen mit CSC-induzierten B-Zellen hindeuten könnte [51, 52]. Durch die Behandlung mit CSC in zwei Zeitfenstern bzw. von Tag -14 bis 20 zeigte sich zusätzlich eine erhöhte Anzahl an B-Zellen in der Milz und im Blut, was auf deren Proliferation schließen lässt. Dabei ist nicht bekannt, ob die Proliferation in Abhängigkeit von Basophilen stattfand. Die Anzahl an CD4<sup>+</sup> T-Zellen und Monozyten, die im Rahmen der Inflammation das ZNS infiltrieren, kann als Maß der Inflammationsstärke angenommen werden [110, 153]. Jedoch konnten sich in diesem Fall keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl an infiltrierten Zellen im Gehirn bzw. im Rückenmark zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen zeigen lassen. Zusätzlich sollte der IgE-Spiegel im Plasma erfasst werden. Es zeigte sich, ähnlich wie bei der Behandlung von naiven Mäusen mit CSC, eine signifikante Erhöhung des IgE-Spiegels im Plasma im Vergleich

zur Kontrolle, die bei Behandlung von Tag -14 bis 20 am geringsten und bei Behandlung von Tag 1-20 am stärksten ausfiel. Dabei war zu erkennen, dass generell Mäuse mit induzierter EAE auch ohne Behandlung mit CSC eine deutlich höhere Ausgangskonzentration an IgE besitzen im Vergleich zu unbehandelten naiven Mäusen. Dies lässt sich durch die systematische Aktivierung des Immunsystems durch die Injektion des CFA erklären [112]. Im Einklang mit diesen Ergebnissen, wurde ebenfalls eine Erhöhung der MFI von IgE auf Basophilen beobachtet [37, 49]. Neben der vermehrten Sekretion von IgE wurde auch eine erhöhte Konzentration an IgM im Plasma nach CSC-Behandlung detektiert. Eine erhöhte Produktion an IgM durch B-Zellen nach *in vitro* Stimulation mit CSB wurde bereits zuvor beschrieben [152]. Gleichzeitig wurde eine verminderte Konzentration an MOG<sub>35-55</sub>-spezifischen Igs, also Igs mit einer proinflammatorischen Spezifität, gemessen. Wie auch schon bei der Stimulation von naiven Mäusen mit CSC beschrieben, zeigten CD49b<sup>+</sup> Zellen aus Mäusen, die mit CSC behandelt wurden eine bessere Aktivierbarkeit durch  $\alpha$ IgE im Vergleich zur Kontrolle und eine starke Aktivierbarkeit durch CSC, die in der Kontrolle nicht gegeben war.

Zusammenfassend wurde in Mäusen mit einer aktiv induzierten EAE ein weitestgehend gleicher Phänotyp von CSC-induzierten B-Zellen im Vergleich zu B-Zellen aus CSC-behandelten naiven Mäusen gezeigt. Es konnte durch die direkte Behandlung mit CSC im Rahmen einer täglichen Injektion die Ausbildung klinischer Symptome der EAE signifikant reduziert werden. Diese Verbesserung wurde durch eine prophylaktische Behandlung mit CSC vor der Immunisierung nicht erzielt.

Um die Frage zu beantworten, ob die Verbesserung des klinischen EAE Scores tatsächlich auf den CSC-induzierten regulatorischen B-Zellen beruht und nicht auf anderen durch CSC induzierten Effekten, wurde in B-Zell-defizienten J<sub>H</sub>T-Mäusen eine EAE induziert, wobei die Mäuse von Tag 1-20 mit CSC bzw. mit NaCl als Kontrolle, behandelt wurden. Es zeigte sich, wie in den vorherigen Experimenten, eine signifikante Verbesserung des EAE Scores durch CSC-Behandlung von *wildtyp* Mäusen im Vergleich zur Kontrolle. Wurden hingegen J<sub>H</sub>T-Mäuse mit CSC behandelt, befand sich der klinische Score auf dem gleichen hohen Level, wie bei NaCl-behandelten J<sub>H</sub>T-Mäusen und konnte folglich nicht durch die Behandlung mit CSC verbessert werden. Somit konnte eindeutig gezeigt werden, dass die Unterdrückung von Krankheitssymptomen im Modell der EAE nach Behandlung mit CSC durch B-Zellen vermittelt wird.



Da CD138<sup>+</sup> Antikörper-sekretierende Plasmazellen als IL-10 produzierende regulatorische Plasmazellen definiert wurden [151] und in vielfältigen Experimenten eine erhöhte Expression an CD138 durch B-Zellen nach Behandlung mit CSC beobachtet wurde, sollte untersucht werden, ob es sich bei den im EAE-Modell suppressiv wirkenden B-Zellen um CD138<sup>+</sup> Plasmazellen handelt. Es wurden Mb1<sup>wt/cre</sup> x blimp1<sup>fl/fl</sup>-Mäuse verwendet, welche aufgrund des fehlenden Transkriptionsfaktors Blimp-1 keine Plasmazellen bilden können [147]. In diesen Mäusen wurde eine EAE induziert, woraufhin die Versuchstiere von Tag 1-20 mit CSC bzw. mit NaCl als Kontrolle behandelt wurden. Dabei konnte beobachtet werden, dass wie in den vorherigen Experimenten gesehen, die EAE Scores durch CSC-Behandlung von *wildtyp* Mäusen im Vergleich zur Kontrolle signifikant verbessert wurden. Interessanterweise zeigte die Behandlung von Plasmazell-defizienten Mb1<sup>wt/cre</sup> x blimp1<sup>fl/fl</sup>-Mäusen mit CSC die gleiche signifikante Verbesserung der klinischen Symptome im Vergleich zur Kontrolle. Daher konnte die eindeutige Schlussfolgerung gezogen werden, dass die Unterdrückung von Symptomen im Modell der EAE nach Behandlung mit CSC unabhängig von Plasmazellen vermittelt wird; die durch CSC-Injektion induzierten suppressiven B-Zellen also keine Plasmazellen darstellen.

### **5.5 Adoptiver Transfer von CSC-induzierten B-Zellen verbessert den Verlauf der EAE**

Da gezeigt wurde, dass die Verbesserung des Krankheitsverlaufes der EAE in Abwesenheit von B-Zellen nicht mehr gegeben ist und somit direkt von B-Zellen abhängt, sollte in einem weiteren Experiment untersucht werden, ob der adoptive Transfer von CSC-induzierten B-Zellen in Mäuse mit einer aktiven EAE die Ausbildung von Lähmungserscheinungen ebenfalls verbessern kann. Zu diesem Zweck wurden Spendermäuse für 14 Tage mit 10 mg CSC bzw. NaCl als Kontrolle i.p. behandelt, woraufhin B-Zellen aus den Milzen isoliert und anschließend transferiert wurden.

Dabei konnte beobachtet werden, dass der adoptive Transfer von NaCl-induzierten B-Zellen keinen positiven Einfluss auf die Entwicklung von Krankheitssymptomen besaß und die Scores auf demselben Level verliefen, wie in der Kontrolle. Der adoptive Transfer von CSC-induzierten B-Zellen dagegen zeigte eine signifikante Verbesserung des klinischen EAE Scores im Vergleich zur Kontrolle. Bei genauer Betrachtung war

die Verbesserung der Scores durch B-Zell Transfer zwar nicht so effektiv, wie die direkte Behandlung mit CSC, aber dennoch signifikant. Es wurde bereits durch viele Arbeitsgruppen publiziert, dass der suppressive Effekt von verschiedenen regulatorisch agierenden B-Zellen adoptiv in Mäuse mit aktiver EAE transferiert werden kann. Dabei wurden diverse induzierte B-Zellen, wie beispielsweise GA-induzierte IL-10 produzierende B-Zellen [154] oder *Toll-like Receptor* (TLR)-9-stimulierte pro B-Zellen, die sich in IL-10 produzierende B-Zellen entwickeln [155], adoptiv transferiert, wodurch die Ausbildung von Krankheitssymptomen deutlich verringert werden konnte.

Bei Untersuchung von unterschiedlichen Zellpopulationen der Mäuse am Versuchsende wurde beobachtet, dass die Expression von CD138 durch B-Zellen durch den adoptiven Transfer nicht moduliert wurde. Dies lässt darauf schließen, dass nur die direkte Behandlung mit CSC zu einer Hochregulation von CD138 führt. Zudem waren keine Unterschiede in der Anzahl an Basophilen zu erkennen. Im Blut dagegen waren durch den adoptiven Transfer sowohl von NaCl-induzierten als auch CSC-induzierten B-Zellen, signifikant mehr B-Zellen vorhanden. Die transferierten B-Zellen wurden nicht im Voraus markiert, konnten in den Empfängermäusen also nicht klar identifiziert werden, jedoch ist zu erwarten, dass die erhöhte Anzahl an vorhandenen B-Zellen im Blut die adoptiv transferierten B-Zellen widerspiegelt. Auch ließen sich keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl von infiltrierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen und Monozyten im Gehirn ausmachen. Es war weder eine Veränderung der MFI von IgE auf Basophilen in der Milz und im Blut, noch eine erhöhte Sekretion von IgE ins Plasma erkennbar. Zusätzlich ließen sich isolierte CD49b<sup>+</sup> Zellen aus keiner der Versuchsgruppen mit CSC aktivieren. Dies lässt darauf schließen, dass die vielfältigen unter 5.4 beobachteten Effekte nach Behandlung mit CSC sich nicht alleine durch den Transfer von CSC-induzierten B-Zellen erzielen lassen. Stattdessen scheint eine dauerhafte Stimulation mit CSC benötigt zu werden.

Zusammenfassend wurde beobachtet, dass der adoptive Transfer von CSC-induzierten B-Zellen den Krankheitsverlauf der EAE zwar nicht so effektiv, wie eine durchgehende Behandlung mit CSC, aber dennoch signifikant verbessern kann.

## **5.6 Transfer von Plasma aus CSC-behandelten Mäusen verbessert den Verlauf der EAE in Abhängigkeit von IgE**

Da der Transfer von CSC-behandelten B-Zellen den klinischen Score der EAE verbessern konnte, wurde gezeigt, dass nicht nur die direkte Behandlung mit CSC den Verlauf der EAE verbessern kann, sondern auch die Injektion von CSC-aktivierten B-Zellen den EAE Score unabhängig von der Anwesenheit von CSC in den EAE-Tieren verbessern kann. Daher sollte in einem weiteren Versuchsaufbau untersucht werden, ob ebenfalls der Transfer von Plasma aus Mäusen, die mit CSC vorbehandelt wurden, den Verlauf der EAE verbessern kann. Zu diesem Zweck wurden Spendermäuse für 5 bzw. 14 Tage täglich mit 10 mg CSC, oder NaCl als Kontrolle, behandelt. Anschließend wurde den Mäusen Blut entnommen, aus welchem Plasma gewonnen wurde. Dieses konnte Mäusen mit aktiver EAE i.p. injiziert werden.

Der Transfer von Plasma aus NaCl-behandelten Mäusen hatte keinen Effekt auf die Entwicklung des klinischen EAE Scores; dieser verlief auf der gleichen Höhe, wie derjenige der Kontrolle. Ebenfalls war keine große Verbesserung der Krankheitssymptome durch den Transfer von Plasma aus 5 Tage mit CSC behandelten Mäusen ersichtlich. In diesem Fall war lediglich eine leicht verlangsamte Erhöhung der Scores erkennbar. Interessanterweise führte der Transfer von Plasma aus 14 Tage mit CSC behandelten Mäusen zu einem signifikant milderem Verlauf der EAE.

Die Analyse von Zellpopulationen in unterschiedlichen Organen der Versuchstiere zeigt ein ähnliches Bild, wie in den Mäusen nach adoptivem B-Zell-Transfer. Weder in der Milz, noch im Blut war eine Modulation der Expression von CD138 durch B-Zellen zu erkennen, was darauf zurückzuführen ist, dass kein CSC in die Tiere gespritzt wurde. Zusätzlich hatte der Plasmatransfer keinen Einfluss auf die Zahl der Basophilen. Im Gehirn und im Rückenmark konnte keine Veränderung der Anzahl an CD4<sup>+</sup> T-Zellen oder Monozyten beobachtet werden.

Es wurde publiziert, dass die Behandlung von EAE-immunisierten Mäusen mit intravenösen Immunglobulin (IVIg), das aus Plasma gewonnen wird und vor allem aus IgG besteht, sowohl eine Verbesserung des Krankheitsverlaufs als auch eine geringere Inflammation des ZNS bedingte [128]. Dies lässt vermuten, dass die hier beobachtete suppressive Wirkung nach Plasmatransfer ebenfalls auf im Plasma vorhandene Igs

zurückzuführen ist. Es wurde ebenfalls eine Rolle von IgE in immunsuppressiven Antworten publiziert. Hierbei führte die Quervernetzung von Fc $\epsilon$ RI einerseits zur Produktion des antiinflammatorischen Zytokins IL-10, während andererseits die T-Zell Proliferation *in vitro* unterdrückt wurde [156, 157].

Da in vielen Experimenten bereits dargestellt wurde, dass die 14-tägige Injektion von CSC zu einer massiven Sekretion von IgE ins Plasma führte, sollte in einem anschließenden Experiment untersucht werden, ob die Verbesserung der EAE-Symptomatik nach Transfer von Plasma auf das vorhandene IgE zurückzuführen ist. Zu diesem Zweck wurden Spendermäuse für 14 Tage täglich mit 10 mg CSC, oder NaCl als Kontrolle, behandelt. Anschließend wurde den Mäusen Blut entnommen, aus welchem Plasma gewonnen wurde. Mittels an Sepharose immobilisierten  $\alpha$ IgEs konnte IgE komplett aus dem Plasma entfernt werden. Dieses konnte Mäusen mit aktiver EAE i.p. injiziert werden.

Der Transfer von Plasma aus CSC-behandelten Mäusen konnte die Ausbildung von klinischen Symptomen im Vergleich sowohl zur Kontrolle als auch zum Transfer von IgE-depletiertem Plasma aus CSC-Behandelten Mäusen signifikant verringern. Dabei verlief der klinische Score von Mäusen, die IgE-depletiertes Plasma transferiert bekamen, auf der gleichen Höhe, wie derjenige der Kontrolle. Demnach scheint die positive Wirkung auf den Krankheitsverlauf der EAE nach Plasmatransfer durch das vorhandene IgE vermittelt zu werden. Die Tatsache, dass nur Plasma aus 14 Tage, aber nicht aus 5 Tage mit CSC behandelten Mäusen einen suppressiven Effekt auf die Ausbildung der Krankheitssymptome hat, ist ebenfalls im Einklang mit diesen Ergebnissen, da nach der kurzen Behandlungszeit von 5 Tagen noch keine erhöhte Menge an IgE im Plasma vorhanden war. Einige Studien konnten zudem eine immunregulatorische Wirkung von IgE demonstrieren. Beispielsweise wurde gezeigt, dass die Verbesserung der EAE nach Behandlung mit Glatirameracetat (GA) auf eine starke Erhöhung von GA-spezifischen IgE und IgG Antikörpern zurückzuführen war [158].

Bei Untersuchung von Zellpopulationen in unterschiedlichen Organen der Versuchstiere wurde ersichtlich, dass es, ähnlich wie beim ersten Experiment mit Plasmatransfer, weder im Blut noch in der Milz zu einer Modulation der CD138 Expression durch B-Zellen kam. Des Weiteren änderte sich der prozentuale Anteil an Basophilen nicht.

Im Gehirn war keine vermehrte Infiltration von CD4<sup>+</sup> T-Zellen oder Monozyten zu beobachten. Mäuse, die mit IgE<sup>-</sup> Plasma behandelt wurden, zeigten weniger B-Zellen und mehr Monozyten in der Milz.

Isolierte CD49b<sup>+</sup> Zellen ließen sich bei keinem der Versuchstiere durch CSC aktivieren, während sich CD49b<sup>+</sup> Zellen aus Mäusen nach Plasmatransfer etwas effektiver durch  $\alpha$ IgE stimulieren ließen. Dies lässt sich dadurch erklären, dass Mäuse nach Plasmatransfer eine leicht erhöhte IgE Konzentration im Plasma aufwiesen, also auch mehr IgE von Basophilen gebunden wurde.

Aus diesen Ergebnissen konnte die Schlussfolgerung gezogen werden, dass klinische Symptome der EAE durch den Transfer von Plasma aus CSC-behandelten Mäusen vermindert werden konnten. Der suppressive Effekt wurde dabei durch CSC-induziertes IgE vermittelt.

### **5.7 Verbesserung der EAE durch CSC ist abhängig von Basophilen**

Nachdem im Verlauf der Experimente immer wieder ein Einfluss von Basophilen vermutet wurde und zudem ein indirekter Einfluss von CSC auf Basophile gezeigt wurde, sollte deren möglicher Anteil an der Wirkweise bei der Suppression des Krankheitsverlaufes einer EAE nach CSC-Behandlung untersucht werden. Es wurden in Mäusen mit einer aktiven EAE durch die Injektion eines anti-mouse Fc $\epsilon$ RI $\alpha$  (MAR-1) Antikörpers Basophile depletiert. Als Kontrolle diente die Injektion eines Isotyps. Durch die zusätzliche Injektion von CSC von Tag 1-20 konnte der Einfluss von Basophilen auf eine Verbesserung der EAE durch CSC-Injektion analysiert werden.

Es zeigte sich, ebenso wie in den vorherigen Experimenten, eine signifikante Verbesserung des EAE Scores durch CSC-Behandlung (+ Isotyp) im Vergleich zur Kontrolle. Wurden Mäuse hingegen mit CSC + MAR-1 behandelt, hatten diese also keine Basophilen mehr, befand sich der klinische EAE Score auf dem gleichen Level wie derjenige der Kontrolle und die CSC-Behandlung zeigte keinen regulatorischen Effekt auf die Ausbildung von Lähmungserscheinungen. Die klinischen Scores waren dabei signifikant höher, als bei Behandlung mit CSC (+ Isotyp). Ähnliche Ergebnisse wurden bereits beschrieben. In einer Studie wurden durch die i.p. Injektion von anti-Fc $\epsilon$ RI $\alpha$  Baso-

phile in Mäusen mit induzierter EAE depletiert. Diese Mäuse zeigten einen verschlechterten Krankheitsverlauf der EAE im Vergleich zur Kontrolle. Es wurde eine verstärkte Th1 und Th17 Antwort gegen Myelin-Antigene in Mäusen ohne Basophile gezeigt [134]. Dabei könnte es sich beispielsweise folgendermaßen verhalten, dass Basophile oder Interaktionen von FcεRI eine wichtige Rolle in der Suppression der EAE spielen. Diese Interaktionen könnten durch CSC bzw. CSC-aktivierte B-Zellen verstärkt werden und so zu einer Milderung der klinischen Scores führen.

Bei Untersuchung von unterschiedlichen Zellpopulationen der Versuchstiere wurde beobachtet, dass durch Gabe des depletierenden Antikörpers MAR-1 von Tag 5-7 die Basophilen an Tag 8 vollständig depletiert waren, jedoch an Tag 21 die Zahl der Basophilen wieder auf Ausgangsniveau angestiegen war. Zusätzlich wurde durch die Behandlung mit CSC CD138 auf B-Zellen hochreguliert. Es wurden keine Unterschiede in der Anzahl der infiltrierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen oder Monozyten zwischen den Versuchsgruppen beobachtet. Die MFI von IgE auf Basophilen stieg sowohl in der Milz als auch im Blut durch die Behandlung mit CSC an. Im Einklang mit diesem Ergebnis war eine erhöhte Konzentration an IgE im Plasma von Mäusen, die mit CSC behandelt wurden, detektierbar. Die Konzentration an MOG<sub>35-55</sub>-spezifischen Igs, also Igs mit einer proinflammatorischen Spezifität, war nach Behandlung mit CSC (+ Isotyp) am geringsten. Wie auch in vorherigen Experimenten beobachtet, zeigten CD49b<sup>+</sup> Zellen aus Mäusen, die mit CSC (+ Isotyp) behandelt wurden eine bessere Aktivierbarkeit durch αIgE im Vergleich zur Kontrolle. Im Gegensatz dazu waren CD49b<sup>+</sup> Zellen aus Mäusen der Gruppe CSC + MAR-1 etwas schlechter durch αIgE aktivierbar verglichen mit CD49b<sup>+</sup> Zellen aus Mäusen der Gruppe CSC + Isotyp. Dies könnte daran liegen, dass sich neue Basophile nach der Depletion erst bilden mussten und diese neu gebildeten Basophilen noch unreif und somit schlechter aktivierbar waren. Eine starke Aktivierbarkeit durch CSC zeigten CD49b<sup>+</sup> Zellen aus Mäusen, die vorher mit CSC behandelt wurden. Am Versuchsende wurden zusätzlich Milzzellen präpariert, die durch MOG<sub>35-55</sub>-Peptid für drei Tage restimuliert wurden. Dabei war zu erkennen, dass in den beiden Gruppen, die mit MAR-1 behandelt wurden, eine vermehrte Sekretion der proinflammatorischen Zytokine IL-3, IFN<sub>γ</sub> und IL-17 durch stimulierte Milzzellen erfolgte. Dies ist im Einklang mit bereits publizierten Daten, die eine stärkere Inflammation nach Depletion von Basophilen beschrieben [134].

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die regulatorischen Effekte im Modell der EAE nach Behandlung mit CSC in Abwesenheit von Basophilen nicht mehr stattfanden. Somit ist die Verbesserung des Krankheitsverlaufes der EAE nach CSC-Behandlung abhängig von Basophilen.

### **5.8 Keine veränderte Infiltration des ZNS**

Bei der EAE handelt es sich um eine T-Zell-vermittelte Autoimmunerkrankung, die durch eine Infiltration des ZNS durch CD4<sup>+</sup> T-Zellen und Monozyten charakterisiert ist [110]. In den hier durchgeführten Experimenten wurde durchgehend eine moderate Infiltration des ZNS beobachtet. Da jedoch keine signifikanten Unterschiede an der Menge des Infiltrats zwischen Gruppen detektiert werden konnte, obwohl hoch signifikante Unterschiede in der Stärke der Krankheitssymptome vorhanden waren, wurden als hauptsächliches *readout* der Experimente die klinischen EAE Scores verwendet.

## 6. Zusammenfassung

Bei der demyelinisierenden Autoimmunerkrankung der Multiplen Sklerose (MS) handelt es sich um eine Krankheit mit einer hohen Inzidenz in der westlichen Bevölkerung, deren genaue Ursache noch nicht komplett geklärt ist. Ebenfalls konnte bis heute die Immunpathogenese der Krankheit noch nicht vollständig aufgedeckt werden. Obwohl mittlerweile viele Medikamente für die Behandlung der MS zugelassen sind, konnte für die unterschiedlichen Symptomatiken und Verlaufsformen der MS noch keine zufriedenstellende Medikation identifiziert werden.

Ein suppressiver Einfluss von regulatorischen B-Zellen auf den Krankheitsverlauf wurde bislang in einigen Krankheiten, unter anderem auch der MS, gezeigt. Die genaue funktionelle Rolle von regulatorischen B-Zellen in der MS muss jedoch noch geklärt werden. Eine suppressive Eigenschaft von regulatorischen B-Zellen ist bereits seit Langem bekannt, allerdings ist es bisher noch nicht gelungen, einen Oberflächenmarker oder Transkriptionsfaktor zu identifizieren, der einzigartig für die Definition einer regulatorischen B-Zelle wäre. Stattdessen wurde bislang eine Vielzahl an regulatorischen B-Zellen mit unterschiedlichen Phänotypen beschrieben.

Es wurde gezeigt, dass die Stimulation von B-Zellen mit dem Glykosaminoglykan Chondroitinsulfat C (CSC) zur Proliferation von B-Zellen führt und es wird vermutet, dass diese B-Zellen einen regulatorischen Phänotyp besitzen.

Daher sollten im Rahmen dieser Arbeit B-Zellen, die mit CSC stimuliert wurden, genauer *in vitro* und *in vivo* charakterisiert werden und eine mögliche suppressive Wirkung im Modell der Experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE), welches die humane MS abbildet, untersucht werden.

Bei Analysen *in vitro* zeigte sich, dass die Stimulation von B-Zellen mit CSC einerseits zu deren Proliferation beitrug und andererseits zur Ausbildung eines antiinflammatorischen Zytokin-Profiles führte. Dabei war die Expression von IL-10 deutlich erhöht. Sowohl *in vitro* als auch *in vivo* führte die Stimulation mit CSC zu einer Hochregulation des Oberflächenmarkers CD138, welcher für Zell-Zell-Interaktionen und Zell-Matrix-Interaktionen wichtig ist und als Marker für regulatorische Plasmazellen definiert wurde. Die Behandlung mit CSC für 14 Tage, nicht aber für 5 Tage *in vivo* führte zu



einer massiven Sekretion von IgE ins Plasma. Das produzierte IgE wurde durch FcεRI auf Basophilen gebunden, wodurch diese besser durch αIgE aktivierbar waren.

Um letztlich herauszufinden, ob durch CSC-induzierte B-Zellen mit einem regulatorischen Phänotyp in der Lage sind, den Verlauf der induzierten Autoimmunerkrankung der EAE zu verbessern, sollten die induzierten B-Zellen im Modell der EAE untersucht werden. Es zeigte sich, dass die Behandlung von EAE-immunisierten Mäusen mit CSC zu einer signifikanten Minderung von klinischen Krankheitssymptomen führte. Des Weiteren konnte unter Zuhilfenahme von B-Zell-defizienten Mäusen gezeigt werden, dass diese Verbesserung in Abhängigkeit von B-Zellen stattfand. Bei diesen CSC-induzierten regulatorischen B-Zellen, die durch ihren suppressiven Phänotyp den Verlauf der Krankheit verbessern konnten, handelte es sich jedoch nicht um CD138<sup>+</sup> Plasmazellen. Zudem führte der adoptive Transfer von CSC-induzierten B-Zellen zu einer Verbesserung des klinischen Scores. Darüber hinaus wurde beobachtet, dass der Transfer von Plasma aus CSC-behandelten Mäusen zu einer Verbesserung des Scores führte. Dabei wurde festgestellt, dass die suppressive Wirkung von im Plasma vorhandenem CSC-induziertem IgE ausging. Es konnte mittels Depletion von Basophilen demonstriert werden, dass die suppressive Wirkung von CSC im Modell der EAE außerdem von Basophilen abhing.

Insgesamt konnten CSC-induzierte B-Zellen als regulatorische B-Zellen charakterisiert werden. Es wurde demonstriert, dass diese zur Suppression der EAE nach Behandlung mit CSC beitrugen. Dabei scheinen die CSC-induzierten B-Zellen über ihre Sekretion von antiinflammatorisch wirkendem IgE zu agieren, das wiederum über Bindung an Basophile eine Verringerung der EAE bewirkt. Die CSC-induzierte Aktivierung von B-Zellen mit gesteigerter Sekretion von IgE und Bindung von IgE an Basophile könnte einen völlig neuen regulatorischen *Pathway* darstellen. Weitere Arbeiten sind notwendig, um genauer zu verstehen, wie CSC-induziertes IgE zur Suppression von Autoimmunität führt.

## 7. Abkürzungsverzeichnis

ABTS	2,2'-Azino-di(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure)
ADCC	<i>Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity</i>
APC	Allophycocyanin
APC	<i>Antigen presenting cell</i>
BaP	<i>Basophil precursor</i>
BCR	<i>B cell receptor</i>
BMCR	<i>Basophil-mast cell precursor</i>
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
bzw	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CFA	<i>complete Freund's adjuvant</i>
C <sub>H</sub>	<i>Constant heavy</i>
C <sub>L</sub>	<i>Constant light</i>
CLP	<i>common lymphoid progenitor</i>
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
Cre	<i>cyclization recombination</i>
CS	Chondroitinsulfat
EAE	Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis
EBV	Epstein-Barr Virus
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent Assay</i>
Fab	<i>Fragment antigen binding</i>
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>

---

Fc	<i>Fragment crystallizable</i>
FcR	Fc-Rezeptor
FCS	<i>Fetal calf serum</i>
FITC	<i>Fluorescein isothiocyanate</i>
FSC	<i>forward scatter</i>
FoxP3	<i>Forkhead-Box-Protein P3</i>
GA	Galtirameracetat
GAG	Glykosaminoglykan
GC	<i>Germinal Center</i>
GMP	<i>Granulocyte-monocyte progenitor cell</i>
HC	<i>Heavy chain</i>
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Schwefelsäure
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
iNKT-Zelle	invariante natürliche Killer T-Zelle
i.p.	<i>intraperitoneal</i>
i.v.	<i>intravenös</i>
IVig	Intravenöses Immunglobulin
KCl	Kaliumchlorid
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumhydrogenphosphat
L	Ligand
LC	<i>Light chain</i>
LLC	<i>Lewis Lung Carcinoma</i>
LPS	Lipopolysaccharid

---

MACS	<i>Magnetic activated cell sorting</i>
MZ	Marginal Zone
µl	Microliter
M	Molar
MBP	Myelin basisches Protein
MFI	mittlere Fluoreszenzintensität
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
min	Minute
MLR	<i>mixed lymphocyte reaction</i>
MOG	Myelin Oligodendrozyten Glykoprotein
mRNA	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure
MS	Multiple Sclerose
NaCl	Natriumchlorid
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Dinatriumhydrogenphosphat
NK-Zellen	natürliche Killer-Zellen
nm	Nanometer
OA	Osteoarthrose
oD	optische Dichte
PB	<i>Pacific Blue</i>
PBMC	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cell</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PE	Phycoerythrin
PLP	Proteolipid-Protein
PMT	<i>photo multiplier tube</i>
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>Rounds per Minute</i>

---

RPMI	<i>Roswell park memorial institute</i>
RT	Raumtemperatur
s.c.	<i>subcutan</i>
SEM	<i>Standard Error of the Mean</i>
SSC	<i>side scatter</i>
TCR	<i>T cell receptor</i>
TGF $\beta$	<i>transforming growth factor beta</i>
T <sub>H</sub>	T-Helfer
TLR	Toll-like Rezeptor
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TSLP	<i>epithelial cell-derived cytokine thymic stromal lymphopietin</i>
V(D)J	<i>Variable (V), joining (J), diversity (D) gene segments</i>
V <sub>H</sub>	<i>Variable heavy</i>
V <sub>L</sub>	<i>Variable light</i>
ZNS	Zentrales Nervensystem

## 8. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Aufbau eines IgG Antikörpers .....	4
Abbildung 2: V(D)J Rekombination der variablen Domäne eines Immunglobulins .....	6
Abbildung 3: Entwicklungsschritte einer B-Zelle .....	7
Abbildung 4: Funktionen von regulatorischen B-Zellen.....	11
Abbildung 5: Entwicklungsschritte von Basophilen. ....	14
Abbildung 6: Chemische Strukturformel von Chondroitinsulfat C .....	15
Abbildung 7: Unterschiedliche Verlaufsformen der EAE anhand des klinischen EAE Scores .....	48
Abbildung 9: Gatingstrategie .....	59
Abbildung 10: Proliferation von B-Zellen nach Stimulation mit CSC für 5 Tage.....	61
Abbildung 11: Modulation von CD138 auf B-Zellen nach Stimulation für 4 Tage .....	62
Abbildung 12: Sekretion von IL-6 und IL-10 durch B-Zellen.....	63
Abbildung 13: Modulation der Expression von CD138 durch CSC .....	64
Abbildung 14: Sekretion von IgE ins Plasma .....	65
Abbildung 15: Modulation der IgE-Bindung von Basophilen. ....	66
Abbildung 16: Sekretion der Zytokine IL-4 und IL-6 durch CD49b <sup>+</sup> Zellen aus dem Knochenmark.....	68
Abbildung 17: Klinischer EAE Score von Mäusen mit CSC-Behandlung vor und nach Immunisierung .....	70
Abbildung 18: Analyse der Zellen in Milz und Blut nach EAE mit CSC-Behandlung vor und nach Immunisierung .....	71
Abbildung 19: Analyse der Zellen in Gehirn und Rückenmark nach EAE mit CSC-Behandlung vor und nach Immunisierung .....	72
Abbildung 20: Konzentrationsbestimmung von IgE im Plasma nach EAE mit CSC-Behandlung vor und nach Immunisierung .....	73
Abbildung 21: Klinischer EAE Score von Mäusen mit CSC-Behandlung in unterschiedlichen Zeitfenstern.....	74
Abbildung 22: Analyse der Zellen in Milz, Blut und Gehirn nach EAE mit CSC Behandlung in unterschiedlichen Zeitfenstern .....	76
Abbildung 23: Analyse des IgE Medians auf Basophilen nach EAE mit CSC Behandlung in unterschiedlichen Zeitfenstern .....	77

Abbildung 24: Sekretion von IL-4 und IL-6 durch CD49b <sup>+</sup> Zellen nach EAE mit CSC-Behandlung in unterschiedlichen Zeitfenstern. ....	78
Abbildung 25: Konzentrationsbestimmung von IgE, IgM und MOG <sub>35-55</sub> -spezifischen Igs im Plasma nach EAE mit CSC-Behandlung in unterschiedlichen Zeitfenstern .....	79
Abbildung 26: Klinischer EAE Score von B-Zell-defizienten Mäusen mit CSC Behandlung.....	81
Abbildung 27: Klinischer EAE Score von Plasmazell-defizienten Mäusen mit CSC Behandlung.....	83
Abbildung 28: Klinischer EAE Score von Mäusen nach B-Zell Transfer .....	85
Abbildung 29: Zellanalyse in Milz, Blut und Gehirn nach EAE mit B-Zell Transfer ...	87
Abbildung 30: Analyse des IgE Medians auf Basophilen nach EAE mit B-Zell Transfer .....	88
Abbildung 31: Sekretion der Zytokine IL-4 und IL-6 durch CD49b <sup>+</sup> Zellen in den Zellkulturüberstand bzw. Sekretion von IgE ins Plasma nach EAE mit B-Zell Transfer .....	89
Abbildung 32: Klinischer EAE Score von Mäusen nach Plasma-Transfer .....	91
Abbildung 33: Analyse der Zellen in Milz, Blut, Gehirn und Rückenmark nach EAE mit Plasma-Transfer.....	93
Abbildung 34: Klinischer EAE Score von Mäusen nach Transfer von IgE <sup>-</sup> und IgE <sup>+</sup> Plasma .....	95
Abbildung 35: Analyse der Zellen in Milz, Blut und Gehirn nach EAE mit Transfer von IgE <sup>-</sup> und IgE <sup>+</sup> Plasma .....	97
Abbildung 36: Sekretion von IL-4 und IL-6 in den Zellkulturüberstand bzw. Sekretion von IgE ins Plasma nach EAE mit Transfer von IgE <sup>-</sup> und IgE <sup>+</sup> Plasma.....	99
Abbildung 37: Klinischer EAE Score von Mäusen mit Depletion von Basophilen und Behandlung mit CSC.....	101
Abbildung 38: Analyse der Zellen in Milz, Blut und Gehirn nach EAE mit Depletion von Basophilen und Behandlung mit CSC .....	103
Abbildung 39: Analyse des IgE Medians auf Basophilen und Überprüfung der Depletion von Basophilen nach EAE mit Depletion von Basophilen und Behandlung mit CSC .....	104
Abbildung 40: Sekretion von IL-4 und IL-6 durch CD49b <sup>+</sup> Zellen nach EAE mit Depletion von Basophilen und Behandlung mit CSC .....	106
Abbildung 41: MOG <sub>35-55</sub> -spezifische Expression von Zytokinen nach EAE mit Depletion von Basophilen und Behandlung mit CSC .....	108

---

Abbildung 42: Sekretion von IgE und MOG <sub>35-55</sub> -spezifischen Igs ins Plasma nach EAE mit Depletion von Basophilen und Behandlung mit CSC .....	109
--	-----



## 9. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Chemikalien, Reagenzien und Puffer.....	29
Tabelle 2: Verwendete Stimulanzen und Antikörper. ....	30
Tabelle 3: Verwendete FACS-Antikörper. ....	31
Tabelle 4: Verwendete Zellkulturmedien und Zellkulturzusätze. ....	32
Tabelle 5: Zusammensetzung der verwendeten Zellkulturmedien.....	32
Tabelle 6: Zusammensetzung der verwendeten Puffer.....	33
Tabelle 7: Verwendete Arzneistoffe. ....	33
Tabelle 8: Verwendete Kits. ....	34
Tabelle 9: Sonstige verwendete Verbrauchsmaterialien. ....	34
Tabelle 10: Verwendete Geräte und Hilfsmittel.....	36
Tabelle 11: Verwendete Software. ....	37
Tabelle 12: Verwendete Versuchstiere. ....	38
Tabelle 13: Klinisches Scoring System .....	42
Tabelle 14: Im ELISA verwendete Verdünnungen und Konzentrationen .....	53
Tabelle 15: In der FACS-Analyse verwendete Fluorochrom-konjugierte Antikörper und Verdünnungen .....	57

## 10. Literaturverzeichnis

1. Chaplin, D.D., *Overview of the immune response*. J Allergy Clin Immunol, 2010. **125**(2 Suppl 2): p. S3-23.
2. Murphy, K., *Janeway's Immunobiology*, in *8th Edition*. 2012, Garland Science, Taylor & Francis Group.
3. Litman, G.W., J.P. Cannon, and L.J. Dishaw, *Reconstructing immune phylogeny: new perspectives*. Nat Rev Immunol, 2005. **5**(11): p. 866-79.
4. Nicholson, L.B., *The immune system*. Essays Biochem, 2016. **60**(3): p. 275-301.
5. Yatim, K.M. and F.G. Lakkis, *A brief journey through the immune system*. Clin J Am Soc Nephrol, 2015. **10**(7): p. 1274-81.
6. Glick, B., S. Timothy, and R.G. Jaap, *The Bursa of Fabricius and Antibody Production*. Poultry Science, 1956. **35**(1): p. 224-225.
7. Hoffman, W., F.G. Lakkis, and G. Chalasani, *B Cells, Antibodies, and More*. Clin J Am Soc Nephrol, 2016. **11**(1): p. 137-54.
8. Schroeder, H.W., Jr. and L. Cavacini, *Structure and function of immunoglobulins*. J Allergy Clin Immunol, 2010. **125**(2 Suppl 2): p. S41-52.
9. Winkelhake, J.L., *Immunoglobulin structure and effector functions*. Immunochemistry, 1978. **15**(9): p. 695-714.
10. Zhang, M., et al., *IL-15 enhanced antibody-dependent cellular cytotoxicity mediated by NK cells and macrophages*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2018. **115**(46): p. E10915-E10924.
11. Beck, A., et al., *Strategies and challenges for the next generation of therapeutic antibodies*. Nat Rev Immunol, 2010. **10**(5): p. 345-52.
12. Early, P., et al., *An immunoglobulin heavy chain variable region gene is generated from three segments of DNA: VH, D and JH*. 1980. J Immunol, 2004. **173**(11): p. 6503-14.
13. Outters, P., et al., *Long-Range Control of V(D)J Recombination & Allelic Exclusion: Modeling Views*. Adv Immunol, 2015. **128**: p. 363-413.
14. Eibel, H., et al., *B cell biology: an overview*. Curr Allergy Asthma Rep, 2014. **14**(5): p. 434.
15. Sagaert, X. and C. De Wolf-Peeters, *Classification of B-cells according to their differentiation status, their micro-anatomical localisation and their developmental lineage*. Immunol Lett, 2003. **90**(2-3): p. 179-86.
16. Ribatti, D., *Sir Frank Macfarlane Burnet and the clonal selection theory of antibody formation*. Clin Exp Med, 2009. **9**(4): p. 253-8.
17. Nescakova, Z. and S. Bystricky, *B cells - ontogenesis and immune memory development*. Gen Physiol Biophys, 2011. **30**(1): p. 1-10.
18. Zhang, Y., L. Garcia-Ibanez, and K.M. Toellner, *Regulation of germinal center B-cell differentiation*. Immunol Rev, 2016. **270**(1): p. 8-19.
19. Suan, D., C. Sundling, and R. Brink, *Plasma cell and memory B cell differentiation from the germinal center*. Curr Opin Immunol, 2017. **45**: p. 97-102.
20. Katz, S.I., D. Parker, and J.L. Turk, *B-cell suppression of delayed hypersensitivity reactions*. Nature, 1974. **251**(5475): p. 550-1.
21. Rosser, E.C. and C. Mauri, *Regulatory B cells: origin, phenotype, and function*. Immunity, 2015. **42**(4): p. 607-12.

22. Oleinika, K., C. Mauri, and A.D. Salama, *Effector and regulatory B cells in immune-mediated kidney disease*. Nat Rev Nephrol, 2019. **15**(1): p. 11-26.
23. Rosser, E.C., et al., *Regulatory B cells are induced by gut microbiota-driven interleukin-1beta and interleukin-6 production*. Nat Med, 2014. **20**(11): p. 1334-9.
24. Burkett, P.R., G. Meyer zu Horste, and V.K. Kuchroo, *Pouring fuel on the fire: Th17 cells, the environment, and autoimmunity*. J Clin Invest, 2015. **125**(6): p. 2211-9.
25. Menon, M., et al., *A Regulatory Feedback between Plasmacytoid Dendritic Cells and Regulatory B Cells Is Aberrant in Systemic Lupus Erythematosus*. Immunity, 2016. **44**(3): p. 683-697.
26. Fillatreau, S., et al., *B cells regulate autoimmunity by provision of IL-10*. Nat Immunol, 2002. **3**(10): p. 944-50.
27. Carter, N.A., E.C. Rosser, and C. Mauri, *Interleukin-10 produced by B cells is crucial for the suppression of Th17/Th1 responses, induction of T regulatory type 1 cells and reduction of collagen-induced arthritis*. Arthritis Res Ther, 2012. **14**(1): p. R32.
28. Iwata, Y., et al., *Characterization of a rare IL-10-competent B-cell subset in humans that parallels mouse regulatory B10 cells*. Blood, 2011. **117**(2): p. 530-41.
29. Matsumoto, M., et al., *Interleukin-10-producing plasmablasts exert regulatory function in autoimmune inflammation*. Immunity, 2014. **41**(6): p. 1040-51.
30. Shen, P., et al., *IL-35-producing B cells are critical regulators of immunity during autoimmune and infectious diseases*. Nature, 2014. **507**(7492): p. 366-370.
31. Wang, R.X., et al., *Interleukin-35 induces regulatory B cells that suppress autoimmune disease*. Nat Med, 2014. **20**(6): p. 633-41.
32. Natarajan, P., et al., *Regulatory B cells from hilar lymph nodes of tolerant mice in a murine model of allergic airway disease are CD5+, express TGF-beta, and co-localize with CD4+Foxp3+ T cells*. Mucosal Immunol, 2012. **5**(6): p. 691-701.
33. Tian, J., et al., *Lipopolysaccharide-activated B cells down-regulate Th1 immunity and prevent autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice*. J Immunol, 2001. **167**(2): p. 1081-9.
34. Parekh, V.V., et al., *B cells activated by lipopolysaccharide, but not by anti-Ig and anti-CD40 antibody, induce anergy in CD8+ T cells: role of TGF-beta 1*. J Immunol, 2003. **170**(12): p. 5897-911.
35. Bosma, A., et al., *Lipid-antigen presentation by CD1d(+) B cells is essential for the maintenance of invariant natural killer T cells*. Immunity, 2012. **36**(3): p. 477-90.
36. Novak, J. and A. Lehen, *Mechanism of regulation of autoimmunity by iNKT cells*. Cytokine, 2011. **53**(3): p. 263-70.
37. Oettgen, H.C., *Fifty years later: Emerging functions of IgE antibodies in host defense, immune regulation, and allergic diseases*. J Allergy Clin Immunol, 2016. **137**(6): p. 1631-1645.
38. MacGlashan, D., Jr., *IgE receptor and signal transduction in mast cells and basophils*. Curr Opin Immunol, 2008. **20**(6): p. 717-23.
39. Cheng, L.E., et al., *IgE-activated basophils regulate eosinophil tissue entry by modulating endothelial function*. J Exp Med, 2015. **212**(4): p. 513-24.
40. Sutton, B.J., et al., *IgE Antibodies: From Structure to Function and Clinical Translation*. Antibodies (Basel), 2019. **8**(1).

41. Bax, H.J., et al., *IgE Trimers Drive SPE-7 Cytokinergic Activity*. Sci Rep, 2017. **7**(1): p. 8164.
42. Yang, Z., B.M. Sullivan, and C.D. Allen, *Fluorescent in vivo detection reveals that IgE(+) B cells are restrained by an intrinsic cell fate predisposition*. Immunity, 2012. **36**(5): p. 857-72.
43. Yang, Z., et al., *Regulation of B cell fate by chronic activity of the IgE B cell receptor*. Elife, 2016. **5**.
44. Hill, D.A., et al., *Commensal bacteria-derived signals regulate basophil hematopoiesis and allergic inflammation*. Nat Med, 2012. **18**(4): p. 538-46.
45. Ehrlich, P., *Beiträge zur Theorie und Praxis der histologischen Färbung*. 1878, Leipzig University.
46. Schroeder, J.T., *Basophils beyond effector cells of allergic inflammation*. Adv Immunol, 2009. **101**: p. 123-61.
47. Ohnmacht, C. and D. Voehringer, *Basophil effector function and homeostasis during helminth infection*. Blood, 2009. **113**(12): p. 2816-25.
48. Schwartz, C., J.U. Eberle, and D. Voehringer, *Basophils in inflammation*. Eur J Pharmacol, 2016. **778**: p. 90-5.
49. Gomez, G., et al., *Omalizumab reverses the phenotypic and functional effects of IgE-enhanced Fc epsilonRI on human skin mast cells*. J Immunol, 2007. **179**(2): p. 1353-61.
50. Chirumbolo, S., *State-of-the-art review about basophil research in immunology and allergy: is the time right to treat these cells with the respect they deserve?* Blood Transfus, 2012. **10**(2): p. 148-64.
51. Gauchat, J.F., et al., *Induction of human IgE synthesis in B cells by mast cells and basophils*. Nature, 1993. **365**(6444): p. 340-3.
52. Denzel, A., et al., *Basophils enhance immunological memory responses*. Nat Immunol, 2008. **9**(7): p. 733-42.
53. Rodriguez Gomez, M., et al., *Basophils support the survival of plasma cells in mice*. J Immunol, 2010. **185**(12): p. 7180-5.
54. Arinobu, Y., et al., *Developmental checkpoints of the basophil/mast cell lineages in adult murine hematopoiesis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(50): p. 18105-10.
55. Kim, S., et al., *Cutting edge: basophils are transiently recruited into the draining lymph nodes during helminth infection via IL-3, but infection-induced Th2 immunity can develop without basophil lymph node recruitment or IL-3*. J Immunol, 2010. **184**(3): p. 1143-7.
56. Giacomini, P.R., et al., *Thymic stromal lymphopoietin-dependent basophils promote Th2 cytokine responses following intestinal helminth infection*. J Immunol, 2012. **189**(9): p. 4371-8.
57. Siracusa, M.C., et al., *Basophils and allergic inflammation*. J Allergy Clin Immunol, 2013. **132**(4): p. 789-801; quiz 788.
58. Tsujimura, Y., et al., *Basophils play a pivotal role in immunoglobulin-G-mediated but not immunoglobulin-E-mediated systemic anaphylaxis*. Immunity, 2008. **28**(4): p. 581-9.
59. Chen, K., et al., *Immunoglobulin D enhances immune surveillance by activating antimicrobial, proinflammatory and B cell-stimulating programs in basophils*. Nat Immunol, 2009. **10**(8): p. 889-98.
60. Kroeger, K.M., B.M. Sullivan, and R.M. Locksley, *IL-18 and IL-33 elicit Th2 cytokines from basophils via a MyD88- and p38alpha-dependent pathway*. J Leukoc Biol, 2009. **86**(4): p. 769-78.

61. Sokol, C.L., et al., *A mechanism for the initiation of allergen-induced T helper type 2 responses*. *Nat Immunol*, 2008. **9**(3): p. 310-8.
62. Schramm, G., et al., *Cutting edge: IPSE/alpha-1, a glycoprotein from Schistosoma mansoni eggs, induces IgE-dependent, antigen-independent IL-4 production by murine basophils in vivo*. *J Immunol*, 2007. **178**(10): p. 6023-7.
63. Bishnoi, M., et al., *Chondroitin sulphate: a focus on osteoarthritis*. *Glycoconj J*, 2016. **33**(5): p. 693-705.
64. Ahn, H.C., et al., *Role of chondroitin sulfate C in the action of anthrax toxin*. *Toxicology*, 2012. **297**(1-3): p. 10-6.
65. Burns, D.T., M.J. Walker, and C. Mussell, *Chondroitin Sulfate: A Critical Review of Generic and Specific Problems in Its Characterization and Determination-An Exemplar of a Material with an Unknown or Variable Composition (UVCB)*. *J AOAC Int*, 2018. **101**(1): p. 196-202.
66. Ogawa, H., et al., *Chondroitin sulfate synthase-2 is necessary for chain extension of chondroitin sulfate but not critical for skeletal development*. *PLoS One*, 2012. **7**(8): p. e43806.
67. Li, J.J., J.F. Xue, and J.M. Ouyang, *Stabilization of submicron calcium oxalate suspension by chondroitin sulfate C may be an efficient protection from stone formation*. *Bioinorg Chem Appl*, 2013. **2013**: p. 360142.
68. Rolls, A., et al., *A sulfated disaccharide derived from chondroitin sulfate proteoglycan protects against inflammation-associated neurodegeneration*. *FASEB J*, 2006. **20**(3): p. 547-9.
69. Volpi, N., *Chondroitin Sulfate Safety and Quality*. *Molecules*, 2019. **24**(8).
70. Ronca, F., et al., *Anti-inflammatory activity of chondroitin sulfate*. *Osteoarthritis Cartilage*, 1998. **6 Suppl A**: p. 14-21.
71. Taraballi, F., et al., *Biomimetic collagenous scaffold to tune inflammation by targeting macrophages*. *J Tissue Eng*, 2016. **7**: p. 2041731415624667.
72. Bruhl, H., et al., *Chondroitin sulfate activates B cells in vitro, expands CD138+ cells in vivo, and interferes with established humoral immune responses*. *J Leukoc Biol*, 2014. **96**(1): p. 65-72.
73. Michel, B.A., et al., *Chondroitins 4 and 6 sulfate in osteoarthritis of the knee: a randomized, controlled trial*. *Arthritis Rheum*, 2005. **52**(3): p. 779-86.
74. Monfort, J., et al., *Biochemical basis of the effect of chondroitin sulphate on osteoarthritis articular tissues*. *Ann Rheum Dis*, 2008. **67**(6): p. 735-40.
75. Schiraldi, C., D. Cimini, and M. De Rosa, *Production of chondroitin sulfate and chondroitin*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2010. **87**(4): p. 1209-20.
76. Mikami, T. and H. Kitagawa, *Biosynthesis and function of chondroitin sulfate*. *Biochim Biophys Acta*, 2013. **1830**(10): p. 4719-33.
77. Siffrin, V., et al., *New insights into adaptive immunity in chronic neuroinflammation*. *Adv Immunol*, 2007. **96**: p. 1-40.
78. Murray, T.J., *The history of multiple sclerosis: the changing frame of the disease over the centuries*. *J Neurol Sci*, 2009. **277 Suppl 1**: p. S3-8.
79. Petersen, G., et al., *[Epidemiology of multiple sclerosis in Germany: regional differences and drug prescription in the claims data of the statutory health insurance]*. *Nervenarzt*, 2014. **85**(8): p. 990-8.
80. Noseworthy, J.H., et al., *Multiple sclerosis*. *N Engl J Med*, 2000. **343**(13): p. 938-52.
81. Compston, A. and A. Coles, *Multiple sclerosis*. *Lancet*, 2008. **372**(9648): p. 1502-17.

82. Compston, D.A., J.R. Batchelor, and W.I. McDonald, *B-lymphocyte alloantigens associated with multiple sclerosis*. *Lancet*, 1976. **2**(7998): p. 1261-5.
83. Langer-Gould, A., et al., *Epstein-Barr virus, cytomegalovirus, and multiple sclerosis susceptibility: A multiethnic study*. *Neurology*, 2017. **89**(13): p. 1330-1337.
84. Hawkes, C.H., *Smoking is a risk factor for multiple sclerosis: a metanalysis*. *Mult Scler*, 2007. **13**(5): p. 610-5.
85. Munger, K.L., et al., *Serum 25-hydroxyvitamin D levels and risk of multiple sclerosis*. *JAMA*, 2006. **296**(23): p. 2832-8.
86. van der Mei, I.A., et al., *Past exposure to sun, skin phenotype, and risk of multiple sclerosis: case-control study*. *BMJ*, 2003. **327**(7410): p. 316.
87. Chastain, E.M. and S.D. Miller, *Molecular mimicry as an inducing trigger for CNS autoimmune demyelinating disease*. *Immunol Rev*, 2012. **245**(1): p. 227-38.
88. Cheng, W., et al., *Cross-reactivity of autoreactive T cells with MBP and viral antigens in patients with MS*. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 2012. **17**: p. 1648-58.
89. Gabibov, A.G., et al., *Combinatorial antibody library from multiple sclerosis patients reveals antibodies that cross-react with myelin basic protein and EBV antigen*. *FASEB J*, 2011. **25**(12): p. 4211-21.
90. Engelhardt, B. and R.M. Ransohoff, *The ins and outs of T-lymphocyte trafficking to the CNS: anatomical sites and molecular mechanisms*. *Trends Immunol*, 2005. **26**(9): p. 485-95.
91. Greter, M., et al., *Dendritic cells permit immune invasion of the CNS in an animal model of multiple sclerosis*. *Nat Med*, 2005. **11**(3): p. 328-34.
92. Steinman, L., *Multiple sclerosis: a two-stage disease*. *Nat Immunol*, 2001. **2**(9): p. 762-4.
93. Keegan, B.M. and J.H. Noseworthy, *Multiple sclerosis*. *Annu Rev Med*, 2002. **53**: p. 285-302.
94. Venken, K., et al., *Disturbed regulatory T cell homeostasis in multiple sclerosis*. *Trends Mol Med*, 2010. **16**(2): p. 58-68.
95. Gold, R., C. Linington, and H. Lassmann, *Understanding pathogenesis and therapy of multiple sclerosis via animal models: 70 years of merits and culprits in experimental autoimmune encephalomyelitis research*. *Brain*, 2006. **129**(Pt 8): p. 1953-71.
96. Fletcher, J.M., et al., *T cells in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis*. *Clin Exp Immunol*, 2010. **162**(1): p. 1-11.
97. Hart, F.M. and J. Bainbridge, *Current and emerging treatment of multiple sclerosis*. *Am J Manag Care*, 2016. **22**(6 Suppl): p. s159-70.
98. Frohman, E.M., et al., *Corticosteroids for multiple sclerosis: I. Application for treating exacerbations*. *Neurotherapeutics*, 2007. **4**(4): p. 618-26.
99. Schilling, S., et al., *[Plasma exchange therapy for steroid-unresponsive multiple sclerosis relapses: clinical experience with 16 patients]*. *Nervenarzt*, 2006. **77**(4): p. 430-8.
100. Diebold, M. and T. Derfuss, *Immunological treatment of multiple sclerosis*. *Semin Hematol*, 2016. **53** Suppl 1: p. S54-7.
101. Jakimovski, D., et al., *Interferon beta for Multiple Sclerosis*. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2018. **8**(11).
102. Rocco, P., et al., *Glatiramer acetate: A complex drug beyond biologics*. *Eur J Pharm Sci*, 2019. **133**: p. 8-14.

103. Derfuss, T., et al., *Natalizumab therapy for multiple sclerosis*. *Semin Neurol*, 2013. **33**(1): p. 26-36.
104. Gingele, S., et al., *Ocrelizumab Depletes CD20(+) T Cells in Multiple Sclerosis Patients*. *Cells*, 2018. **8**(1).
105. Mulero, P., L. Midaglia, and X. Montalban, *Ocrelizumab: a new milestone in multiple sclerosis therapy*. *Ther Adv Neurol Disord*, 2018. **11**: p. 1756286418773025.
106. Papadopoulou, A., L. Kappos, and T. Sprenger, *Teriflunomide for oral therapy in multiple sclerosis*. *Expert Rev Clin Pharmacol*, 2012. **5**(6): p. 617-28.
107. Baxter, A.G., *The origin and application of experimental autoimmune encephalomyelitis*. *Nat Rev Immunol*, 2007. **7**(11): p. 904-12.
108. Rivers, T.M., D.H. Sprunt, and G.P. Berry, *Observations on Attempts to Produce Acute Disseminated Encephalomyelitis in Monkeys*. *J Exp Med*, 1933. **58**(1): p. 39-53.
109. Encinas, J.A., H.L. Weiner, and V.K. Kuchroo, *Inheritance of susceptibility to experimental autoimmune encephalomyelitis*. *J Neurosci Res*, 1996. **45**(6): p. 655-69.
110. Robinson, A.P., et al., *The experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) model of MS: utility for understanding disease pathophysiology and treatment*. *Handb Clin Neurol*, 2014. **122**: p. 173-89.
111. Bjelobaba, I., et al., *Animal models of multiple sclerosis: Focus on experimental autoimmune encephalomyelitis*. *J Neurosci Res*, 2018. **96**(6): p. 1021-1042.
112. Krishnamoorthy, G. and H. Wekerle, *EAE: an immunologist's magic eye*. *Eur J Immunol*, 2009. **39**(8): p. 2031-5.
113. Constantinescu, C.S., et al., *Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) as a model for multiple sclerosis (MS)*. *Br J Pharmacol*, 2011. **164**(4): p. 1079-106.
114. Libbey, J.E., I. Tsunoda, and R.S. Fujinami, *Studies in the modulation of experimental autoimmune encephalomyelitis*. *J Neuroimmune Pharmacol*, 2010. **5**(2): p. 168-75.
115. Rabchevsky, A.G., J.D. Degos, and P.A. Dreyfus, *Peripheral injections of Freund's adjuvant in mice provoke leakage of serum proteins through the blood-brain barrier without inducing reactive gliosis*. *Brain Res*, 1999. **832**(1-2): p. 84-96.
116. Stromnes, I.M. and J.M. Goverman, *Active induction of experimental allergic encephalomyelitis*. *Nat Protoc*, 2006. **1**(4): p. 1810-9.
117. Stromnes, I.M. and J.M. Goverman, *Passive induction of experimental allergic encephalomyelitis*. *Nat Protoc*, 2006. **1**(4): p. 1952-60.
118. Mendel, I., N. Kerlero de Rosbo, and A. Ben-Nun, *A myelin oligodendrocyte glycoprotein peptide induces typical chronic experimental autoimmune encephalomyelitis in H-2b mice: fine specificity and T cell receptor V beta expression of encephalitogenic T cells*. *Eur J Immunol*, 1995. **25**(7): p. 1951-9.
119. McLaughlin, K.A. and K.W. Wucherpfennig, *B cells and autoantibodies in the pathogenesis of multiple sclerosis and related inflammatory demyelinating diseases*. *Adv Immunol*, 2008. **98**: p. 121-49.
120. Sabahi, R. and J.H. Anolik, *B-cell-targeted therapy for systemic lupus erythematosus*. *Drugs*, 2006. **66**(15): p. 1933-48.
121. Hauser, S.L., et al., *B-cell depletion with rituximab in relapsing-remitting multiple sclerosis*. *N Engl J Med*, 2008. **358**(7): p. 676-88.

122. Lucchinetti, C., et al., *Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination*. *Ann Neurol*, 2000. **47**(6): p. 707-17.
123. Keegan, M., et al., *Relation between humoral pathological changes in multiple sclerosis and response to therapeutic plasma exchange*. *Lancet*, 2005. **366**(9485): p. 579-82.
124. Svensson, L., et al., *A comparative analysis of B cell-mediated myelin oligodendrocyte glycoprotein-experimental autoimmune encephalomyelitis pathogenesis in B cell-deficient mice reveals an effect on demyelination*. *Eur J Immunol*, 2002. **32**(7): p. 1939-46.
125. Wolf, S.D., et al., *Experimental autoimmune encephalomyelitis induction in genetically B cell-deficient mice*. *J Exp Med*, 1996. **184**(6): p. 2271-8.
126. Matsushita, T., et al., *Regulatory B cells inhibit EAE initiation in mice while other B cells promote disease progression*. *J Clin Invest*, 2008. **118**(10): p. 3420-30.
127. Mann, M.K., et al., *B cell regulation of CD4+CD25+ T regulatory cells and IL-10 via B7 is essential for recovery from experimental autoimmune encephalomyelitis*. *J Immunol*, 2007. **178**(6): p. 3447-56.
128. Humle Jorgensen, S. and P.S. Sorensen, *Intravenous immunoglobulin treatment of multiple sclerosis and its animal model, experimental autoimmune encephalomyelitis*. *J Neurol Sci*, 2005. **233**(1-2): p. 61-5.
129. Zhou, J., et al., *Immune modulation by chondroitin sulfate and its degraded disaccharide product in the development of an experimental model of multiple sclerosis*. *J Neuroimmunol*, 2010. **223**(1-2): p. 55-64.
130. Willenborg, D.O. and C.R. Parish, *Inhibition of allergic encephalomyelitis in rats by treatment with sulfated polysaccharides*. *J Immunol*, 1988. **140**(10): p. 3401-5.
131. Stephenson, E.L., et al., *Chondroitin sulfate proteoglycans as novel drivers of leucocyte infiltration in multiple sclerosis*. *Brain*, 2018. **141**(4): p. 1094-1110.
132. Inada, R., et al., *Chondroitin sulfate N-acetylgalactosyltransferase-1 knockout shows milder phenotype in experimental autoimmune encephalomyelitis than in wild type*. *Glycobiology*, 2020.
133. Miyamoto, K., et al., *Chondroitin 6-O-sulfate ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis*. *Glycobiology*, 2014. **24**(5): p. 469-75.
134. Musio, S., et al., *Treatment with anti-FcepsilonR1alpha antibody exacerbates EAE and T-cell immunity against myelin*. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*, 2017. **4**(3): p. e342.
135. Chen, Y., et al., *Sephin1, which prolongs the integrated stress response, is a promising therapeutic for multiple sclerosis*. *Brain*, 2019. **142**(2): p. 344-361.
136. Crowley, L.C., et al., *Measuring Cell Death by Trypan Blue Uptake and Light Microscopy*. *Cold Spring Harb Protoc*, 2016. **2016**(7).
137. MERCK, D., *Hämatologische Labormethoden*. Vol. 4. Auflage. 1986: GIT Verlag, Darnstadt.
138. Hallmann, L., *Klinische Chemie und Mikroskopie*. Vol. 11. Auflage. 1980: Georg Thieme Verlag, Stuttgart/New York.
139. Engvall, E. and P. Perlmann, *Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G*. *Immunochemistry*, 1971. **8**(9): p. 871-4.
140. Gan, S.D. and K.R. Patel, *Enzyme immunoassay and enzyme-linked immunosorbent assay*. *J Invest Dermatol*, 2013. **133**(9): p. e12.



141. Schmidt, T.G. and A. Skerra, *One-step affinity purification of bacterially produced proteins by means of the "Strep tag" and immobilized recombinant core streptavidin*. J Chromatogr A, 1994. **676**(2): p. 337-45.
142. Ibrahim S.F. and v.d.E. G., *Flow Cytometry and Cell Sorting in Cell Separation: Fundamentals, Analytical and Preparative Methodes*, Kumar A., Galaey I.Y., and M. B., Editors. 2007, Springer Berlin Heidelberg. p. 19-39.
143. McKinnon, K.M., *Flow Cytometry: An Overview*. Curr Protoc Immunol, 2018. **120**: p. 5 1 1-5 1 11.
144. Muirheadi K.A., Horan P.K., and P. G., *Flow Cytometry: Present and Future*. Bio/Technology, 1985. **3**(4): p. 337-356.
145. Giacomini, E., et al., *Thymosin-alpha1 expands deficient IL-10-producing regulatory B cell subsets in relapsing-remitting multiple sclerosis patients*. Mult Scler, 2018. **24**(2): p. 127-139.
146. Neves, P., et al., *Signaling via the MyD88 adaptor protein in B cells suppresses protective immunity during Salmonella typhimurium infection*. Immunity, 2010. **33**(5): p. 777-90.
147. Shapiro-Shelef, M., et al., *Blimp-1 is required for the formation of immunoglobulin secreting plasma cells and pre-plasma memory B cells*. Immunity, 2003. **19**(4): p. 607-20.
148. Rachmilewitz, J. and M.L. Tykocinski, *Differential effects of chondroitin sulfates A and B on monocyte and B-cell activation: evidence for B-cell activation via a CD44-dependent pathway*. Blood, 1998. **92**(1): p. 223-9.
149. Palaiologou, M., I. Delladetsima, and D. Tiniakos, *CD138 (syndecan-1) expression in health and disease*. Histol Histopathol, 2014. **29**(2): p. 177-89.
150. Sanderson, R.D., P. Lalor, and M. Bernfield, *B lymphocytes express and lose syndecan at specific stages of differentiation*. Cell Regul, 1989. **1**(1): p. 27-35.
151. Fillatreau, S., *Regulatory plasma cells*. Curr Opin Pharmacol, 2015. **23**: p. 1-5.
152. Yoshihara, R., et al., *Differentiation of murine B cells induced by chondroitin sulfate B*. Cell Immunol, 2007. **250**(1-2): p. 14-23.
153. Renner, K., et al., *IL-3 promotes the development of experimental autoimmune encephalitis*. JCI Insight, 2016. **1**(16): p. e87157.
154. Kala, M., et al., *B cells from glatiramer acetate-treated mice suppress experimental autoimmune encephalomyelitis*. Exp Neurol, 2010. **221**(1): p. 136-45.
155. Korniotis, S., et al., *Treatment of ongoing autoimmune encephalomyelitis with activated B-cell progenitors maturing into regulatory B cells*. Nat Commun, 2016. **7**: p. 12134.
156. Le, T., et al., *Interferons modulate Fc epsilon RI-dependent production of autoregulatory IL-10 by circulating human monocytoïd dendritic cells*. J Allergy Clin Immunol, 2009. **123**(1): p. 217-23.
157. von Bubnoff, D., et al., *FcepsilonRI induces the tryptophan degradation pathway involved in regulating T cell responses*. J Immunol, 2002. **169**(4): p. 1810-6.
158. Bomprezzi, R., et al., *Glatiramer acetate-specific antibody titres in patients with relapsing / remitting multiple sclerosis and in experimental autoimmune encephalomyelitis*. Scand J Immunol, 2011. **74**(3): p. 219-226.

## 11. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei alldenjenigen bedanken, die mich während meiner Promotion stets unterstützt und begleitet haben und damit zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Matthias Mack für die Möglichkeit in seiner Arbeitsgruppe meine Arbeit anzufertigen und an diesem interessanten Thema forschen zu dürfen. Danken möchte ich ihm für seine intensive Betreuung und die stetige Bereitschaft zur Besprechung von Ergebnissen. Seine enorme Begeisterung für die Forschung und sein beeindruckendes Wissen haben eine inspirierende Arbeitsatmosphäre geschaffen, in der sich mein Eifer und Interesse an meinem Forschungsprojekt immer steigerten und ich fachlich ausgesprochen profitieren konnte.

Bei Prof. Dr. Hayo Castrop und Prof. Dr. Jens Schloßmann bedanke ich mich für die Übernahme des Fachmentorats seitens der Regensburger Internationalen Graduiertenschule für Lebenswissenschaften (RIGeL).

Ein ausgesprochen großer Dank geht an alle ehemaligen und derzeitigen Mitglieder der AG Mack: Yvonne, Jan, Sophia, Simone, Kathrin, Dagmar, Balam und Kerstin. Alle haben mich während meiner Promotion fortwährend unterstützt und standen mir ohne zu zögern mit Ratschlägen beiseite. Bei Balam und Kerstin möchte ich mich für die Unterstützung und Ratschläge bei Versuchsdurchführungen bedanken. Kathrin möchte ich für ihre ruhige und tolle Einarbeitung danken und für die vielen Stunden an Präparierarbeit an Versuchsenden. Ohne ihr Percoll-Absaugen hätten die Versuche nicht funktioniert. Vielen Dank auch an Dagmar, die mich immer bei Versuchsenden und Zellkulturen unterstützt hat. Simone möchte ich für ihre Unterstützung bei Versuchsenden danken. Die vielen Tipps zur Graduiertenschule, zu unterschiedlichen Programmen und zur Erstellung eines Tierversuchsantrages haben mir sehr geholfen. Ihre großzügige Hilfe hat mir außerdem den ein oder anderen Samstag freigeschaufelt. Ein riesengroßes Dankeschön geht natürlich auch an Yvonne. Ihre langjährige Erfahrung und Fachkenntnis konnten mir sehr oft bei vielen Versuchen und Fragestellungen weiterhelfen. Sie war immer ohne zu zögern mit Rat und Tat zur Stelle. Sie hat mich immer bei Versuchsenden, Zellkulturen, ELISAs und im Tierstall unterstützt und mir mit Ruhe die Hybridom-Technik beigebracht. Bei Jan möchte ich mich auch ganz herzlich bedanken. Er war an den Versuchsenden ein Meister des Durchdrückens.

Vielen Dank auch für die vielen Gespräche und die ständige Unterstützung und Hilfsbereitschaft bei Problemen oder Fragen. Mit dir hatte ich bei allen Veranstaltungen von RIGeL und allen Konferenzen immer eine sehr interessante, unterhaltsame und lustige Zeit, die schnell verflogen ist. Ein ganz großes Dankeschön geht natürlich an Sophia. Sie hat mich bei unzähligen Versuchsenden, Zellkulturen und sonstigen Versuchen immer sofort tatkräftig unterstützt. Sie hat mir in einer Vielzahl an Tierstallbesuchen wunderbar das Scoring der EAE beigebracht und mich bei den Experimenten unterstützt. Besonders bedanken möchte ich mich auch für die Unterstützung beim Scoring, vor allem auch an den Wochenenden.

Bedanken möchte ich mich ebenfalls bei den Tierpflegern des Tierstalls D4, dabei besonders bei Peter Karl, für die gute Zusammenarbeit und die stets einwandfreie Betreuung der Mäuse.

Ein ganz großer Dank geht an meine Eltern Ulrike und Thomas. Ihre fortwährende Unterstützung in jeder Lebenslage und ihr Stolz haben mich immer begleitet und motiviert. Ich konnte mich in jeder Situation auf sie verlassen. Vielen Dank für die riesige Unterstützung in meinem bisherigen Lebensweg; ohne euch wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Danken möchte ich auch meinem Bruder Konstantin, der mir schon mein ganzes Leben lang ohne zu zögern bei allen möglichen Problemen und Fragen geholfen hat. Ich kann mich immer auf ihn verlassen. Zu guter Letzt danke ich noch Marco, der mich nach langen und anstrengenden Tagen immer aufgebaut hat und mich den stressigen Laboralltag hat vergessen lassen. Ohne den persönlich angefertigten Schreibtisch hätte ich diese Arbeit sicherlich nur halb so effektiv schreiben können.