AUS DEM LEHRSTUHL FÜR NEUROLOGIE
PROF. DR. MED. RALF LINKER
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

UNTERSUCHUNG DER MHC-PRÄSENTATION VON DREI NEUEN AUTOANTIGENEN BEI PATIENTEN MIT MULTIPLER SKLEROSE

Inaugural – Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Anna Franziska Wagner

2021

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR NEUROLOGIE
PROF. DR. MED. RALF LINKER
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

UNTERSUCHUNG DER MHC-PRÄSENTATION VON DREI NEUEN AUTOANTIGENEN BEI PATIENTEN MIT MULTIPLER SKLEROSE

Inaugural – Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Anna Franziska Wagner

2021

Dekan:	Prof. Dr. Dirk Hellwig
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. med. Dr. Robert Weißert
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Thomas Hehlgans
Tag der mündlichen Prüfung:	30. Juni 2021

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung 6
1.1 Einführung 6
1.2 Klinische Präsentation, Läsionspathologie und Diagnostik 6
1.3 Epidemiologie 8
1.4 Umweltfaktoren 8
1.4.1 Vitamin D 9
1.4.2 Infektionen 9
1.4.3 Weitere Risikofaktoren 10
1.5 Genetik 11
1.6 Immunpathogenese 13
1.6.1 Beteiligte Zelltypen und Zytokine 13
1.6.1.1 T Zellen 13
1.6.1.2 B Zellen 17
1.6.1.3 Antigenpräsentierende Zellen 17
1.6.2 Antigenpräsentation 19
1.6.2.1 MHC Moleküle 19
1.6.2.2 T Zell Rezeptor 21
1.6.2.3 Kreuzpräsentation 23
1.6.3 Toleranz 24
1.6.4 Autoantigene der MS 26
1.7 Therapie 28
1.8 Fragestellung 29
2. Material und Methoden 31
2.1 Materialien 31
2.2 Auswahl der Patienten und Kontrollpersonen 31
2.3 Isolierung und Einfrieren von mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMCs) 34
2.4 Auftauen von PBMCs 36
2.5 Herkunft und Auswahl der getesteten Peptide 36
2.6 IFN-γ ELISpot Assay 36
2.7 IL-17A ELISpot Assay 38
2.8 Auswertung der ELISpot Platten 39

2.9 HLA-Typisierung ... 40
2.10 Statistische Auswertung ... 40
3. Ergebnisse ... 44
3.1 Screening ... 44
3.2 Titrationsversuche im IFN-γ ELISpot ... 44
3.3 Titrationsversuche im IL-17A ELISpot ... 47
3.4 Einfluss von DMSO und Antikörpern auf die Zahl Zytokin sezernierender Zellen im IFN-γ ELISpot ... 49
3.5 Peptidspezifische Reaktivität im IFN-γ ELISpot ... 51
3.6 HLA Restriktion im IFN-γ ELISpot ... 52
3.7 Einfluss von DMSO und Antikörpern auf die Zahl Zytokin sezernierender Zellen im IL-17A ELISpot ... 54
3.8 Peptidspezifische Reaktivität im IL-17A ELISpot ... 56
3.9 HLA Restriktion im IL-17A ELISpot ... 57
3.10 Korrelation mit HLA-Haplotyp ... 59
4. Diskussion ... 66
4.1 Untersuchung der spezifischen Immunantwort anhand von PBMCs ... 66
4.2 IFN-γ und IL-17A ELISpot Assay ... 66
4.3 Peptidspezifische Reaktivität bei Patienten und Kontrollpersonen ... 67
4.3.1 Untersuchte Autoantigene ... 67
4.3.2 Einfluss von DMSO und Antikörpern auf die Zahl Zytokin sezernierender Zellen ... 72
4.3.3 Titrierbarkeit der Immunantwort ... 73
4.4 MHC-Restriktion ... 74
4.4.1 Bestimmung der MHC-Restriktion mittels spezifischer monoklonaler Antikörper ... 74
4.4.2 Peptid-MHC-Interaktion ... 77
4.4.3 Präsentation von Peptiden auf MHC I und MHC II unter natürlichen und experimentellen Bedingungen ... 80
4.4.4 ZNS-Milieu ... 81
4.4.5 Alternative Ansätze zur Restriktionsbestimmung ... 82
4.5 Korrelation der peptidspezifischen Reaktivität mit dem HLA-Haplotyp ... 83
5. Zusammenfassung und Ausblick ... 85
6. Anhang ... 87
6.1 Flowchart zur vorliegenden Arbeit ... 87

6.2 Abkürzungsverzeichnis 87
6.3 Abbildungsverzeichnis 90
6.3 Tabellenverzeichnis 91
6.5 Materialliste 92
6.6 Tabellen 99
6.7 Grafiken 108
6.8 Statistische Auswertung 111
7. Literaturverzeichnis 116

1. Einleitung

1.1 Einführung

Die Multiple Sklerose (MS) ist eine entzündliche Erkrankung des zentralen Nervensystems (ZNS), in deren Folge es zu einer Entmarkung und Degeneration von Axonen und Nervenzellen kommt. Dabei sind hauptsächlich die weiße Substanz, jedoch auch Zellen der grauen Substanz betroffen (1). Es wird davon ausgegangen, dass es sich bei der MS um eine Autoimmunerkrankung handelt, wobei sowohl Zellen der angeborenen als auch der adaptiven Immunität beteiligt sind. Aber auch bestimmte genetische Risikokonstellationen und Umweltfaktoren spielen eine Rolle (2,3).

1.2 Klinische Präsentation, Läsionspathologie und Diagnostik

Patienten zeigen ein vielfältiges Bild von neurologischen Auffälligkeiten. Häufig sind Sehstörungen, Parästhesien und Lähmungen, autonome Dysfunktionen und kognitive Störungen vorhanden. Obwohl die klinische Präsentation sehr variabel ist, können im Wesentlichen vier Verlaufsformen unterschieden werden. Am häufigsten ist ein schubförmiger Verlauf (relapsing remitting MS, RR-MS), welcher schließlich meist in einen sekundär-progressiven mündet (secondary progressive MS, SP-MS). Weiterhin findet man einen primär-progressiven Typ (primary progressive MS, PP-MS) sowie bei einem kleinen Teil der Patienten einen progressiven Verlauf, auf den immer wieder Schübe aufgelagert sind (progressive relapsing MS, PR-MS) (4). Das klinisch isolierte Syndrom (CIS), welches zunächst ohne Schübe oder Progression auftritt, geht jedoch sekundär in eine schubförmig verlaufende MS über.

Der pathologische Befund bei MS ist gekennzeichnet durch sogenannte Plaques, demyelinisierte Areale, welche als variable Gliose und Entzündungsreaktion bei überwiegend erhaltenen Axonen imponieren. Morphologie und Verteilung innerhalb des ZNS unterscheiden sich von Patient zu Patient. Häufig betreffen die Läsionen jedoch die Nn. optici, subpiale Anteile des Rückenmarks, den Hirnstamm, das Kleinhirn und die periventrikulär gelegene weiße Substanz. Man unterscheidet akute, aktive Plaques von chronischen Plaques. Auf mikroskopischer Ebene unterscheiden sich diese Stadien vor allem durch den Grad der Demyelinisierung sowie das Vorhandensein bestimmter Zelltypen. T Zellen sind ebenso wie Myelin-beladene Makrophagen und aktivierte Mikrogliazellen beinahe immer zu finden. In einigen

Plaques finden sich daneben Anhäufungen von Antikörpern sowie Hinweise auf eine Komplementaktivierung, was auf eine Beteiligung von B Zellen hindeutet. Letztendlich kommt es zur Schädigung und Apoptose der Myelin-bildenden Oligodendrozyten. Aber auch die Axone der Neurone selbst nehmen Schaden, wahrscheinlich durch toxische Entzündungsmediatoren oder das Fehlen trophischer Faktoren als Folge des Verlusts der Oligodendrozyten (5).
Obwohl die MS allgemein als Erkrankung der weißen Substanz angesehen wird, trifft dies genau genommen nicht zu, da in allen Stadien der Erkrankung auch kortikale Läsionen zu finden sind. Dies wurde durch verbesserte MRT-Aufnahmen entdeckt. Diese Läsionen der grauen Substanz können für einen Teil der neurologischen Behinderungen und insbesondere für das Phänomen des Cognitive impairment bei Patienten verantwortlich gemacht werden (1). Man unterscheidet hierbei subpiale von intrakortikalen und leukokortikalen Läsionen. Während frühe subpiale Läsionen durch einen starken Inflammationsprozess mit Lyphozyteninfiltration und Myelin-beladenen Makrophagen gekennzeichnet sind, scheint in späteren Stadien die entzündungsunabhängige Neurodegeneration zu überwiegen (5).
Auf der anderen Seite finden parallel Regenerationsprozesse schon in frühen Phasen einer MS statt. So sind bereits in aktiven Plaques neu gebildete Myelinlamellen und Vorläuferzellen der Oligodendrozyten zu finden und die Immunzellen dort setzen nicht nur inflammatorische und zytotoxische, sondern auch antiinflammatorische Mediatoren, wie IL-10 und sogar neurotrophische Faktoren frei (5). Aktivierte Mikrogliazellen, welche in älteren Läsionen zu finden sind, stimulieren durch die Produktion von Faktoren wie Protease Serine 2 (PRSS2) die Neurogenese, wie in Zellkulturexperimenten mit Mikrogliazellen und neonaten Optikusneuronen von Ratten gezeigt werden konnte (6).

Die Diagnose der MS ist im Wesentlichen eine klinische, jedoch liefert das MRT besonders in frühen Krankheitsphasen entscheidende Hinweise. Wichtige Kriterien sind räumliche und zeitliche Dissemination der auftretenden Läsionen. Seit 2010 ist durch die revidierten McDonald Kriterien auch die Diagnosestellung mit Hilfe nur eines MRT-Bildes möglich geworden, nämlich, wenn gleichzeitig Gadolinium aufnehmende und nicht aufnehmende Läsionen zu sehen sind (7).

1.3 Epidemiologie

Allgemeingültige Aussagen zur Epidemiologie der MS zu treffen, ist schwierig, da in Studien häufig nur kleine Populationen mit unterschiedlichen Methoden untersucht werden, was eine Vergleichbarkeit nahezu unmöglich macht.

In Europa beträgt die geschätzte Prävalenz 83/100.000 und die geschätzte jährliche Inzidenz 4,3/100.000. Die MS kommt auf dem europäischen Kontinent im Norden häufiger vor als im Süden. Dabei spielen jedoch nicht nur bessere diagnostische Möglichkeiten sowie eine konsequentere Erfassung der erkrankten Personen, sondern auch Umweltfaktoren eine Rolle (8). Über die letzten Jahrzehnte konnte eine Steigerung sowohl der Prävalenz als auch der Inzidenz der MS beobachtet werden. Die erhöhte Prävalenz ist wohl auf bessere Therapiemöglichkeiten und damit längeres Überleben zurückzuführen, während die Ursachen für die höheren Inzidenzraten, welche insbesondere bei Frauen beobachtet wurden, weitgehend ungeklärt sind (9). Die meisten Patienten erhalten ihre Diagnose im Alter zwischen 20 und 50 Jahren (10,11) mit einer maximalen Inzidenz um das 30. Lebensjahr (12). Bei 2 – 10 % der Patienten entwickeln sich jedoch bereits im Kindesalter die ersten Symptome (13). Die Mortalität ist bei Patienten mit MS signifikant erhöht. Sie haben eine um circa 7 - 14 Jahre verringerte Lebenserwartung im Vergleich zur Allgemeinbevölkerung. Besonders ein spätes Einsetzen der Erkrankung sowie ein primär progressiver Verlauf sind Prädiktoren für ein kürzeres Überleben. Hervorzuheben ist, dass der Tod durch Suizid bei Patienten mit MS wesentlich häufiger vorkommt als in der Allgemeinbevölkerung. In den letzten Jahrzehnten ist die Lebenserwartung durch verbesserte Therapiemöglichkeiten insgesamt deutlich angestiegen (14).

1.4 Umweltfaktoren

Allgemein wird angenommen, dass die Ursachen für die Entstehung von Autoimmunerkrankungen und so auch der MS in einem komplexen Zusammenspiel von Umweltfaktoren und individuellem genetischen Hintergrund zu suchen sind. Durch langjährige Beobachtung konnten einige Risikofaktoren für die Entwicklung einer MS herausgearbeitet werden (15).

1.4.1 Vitamin D

Zahlreiche epidemiologische Studien zeigen, dass mangelnde Sonnenexposition oder ein anderweitig bedingter Vitamin D Mangel und auch ein gestörter Vitamin D Metabolismus einen relevanten Beitrag zum Erkrankungsrisiko an MS leisten (16). Vitamin D scheint die Immunantwort von T Zellen dahingehend zu modulieren, dass es regulatorische T Zellen (T_{reg}) induziert. Auch ein direkter neuroprotektiver Mechanismus durch Vitamin D wird diskutiert. Wenngleich die Studienlage zu möglichen positiven Effekten bei bereits eingetretener Erkrankung noch nicht ausreichend ist, so suggerieren doch einige statistische Modelle eine Reduktion der Schübe um 50 – 70 %. Der Ausgleich eines bestehenden Vitamin D Mangels kann also als empfehlenswert gesehen werden (17,18).

1.4.2 Infektionen

Ein weiterer Trigger für die Entstehung von MS können bestimmte, vor allem virale Infektionen sein. Insbesondere Epstein-Barr Virus (EBV) zeichnet sich hierbei durch eine starke Assoziation aus. Seropositive Personen haben ein 10-fach höheres Risiko an MS zu erkranken, welches nochmals um das zwei- bis dreifache höher ist, wenn die Erstinfektion als Infektiöse Mononukleose manifest wurde (10). Wenngleich EBV selbst das ZNS nicht infiziert, so sind dennoch einige Hypothesen denkbar, wie das Virus die Immunantwort verändern könnte, sodass es zu einer Expansion autoreaktiver Lymphozyten kommt. Diese könnten Kreuzreaktivitäten zwischen EBV-Antigenen und Myelin, sogenanntes molekulares Mimikry, die Aktivierung von Superantigenen, Überwindung von Mechanismen der Selbsttoleranz und ein längeres Bestehen autoreaktiver B Zellen durch Persistenz des Virus in selbigen betreffen (10,18). Andere Pathogene, deren Zusammenhang mit der Entstehung einer MS erforscht wurde, sind beispielsweise Chlamydia pneumoniae sowie Humanes Herpesvirus 6 (HHV-6), Varizella Zoster Virus (VZV), Humane endogene Retroviren (HERV), Humanes Immunodefizienz Virus (HIV), Zytomegalievirus (CMV), Masernviren (10,19).

Insbesondere für die Bedeutung des Molekularen Mimikry ergeben sich Hinweise aus zahlreichen experimentellen Studien: T Zellen, welche für virale oder bakterielle Antigene spezifisch sind, reagieren ebenfalls auf körpereigene Peptide (20). Umgekehrt erkennen T Zellen, welche für MBP 85-99 – ein wichtiges Autoantigen im Rahmen der MS – spezifisch sind, auch strukturell ähnliche Peptide zum Beispiel von

EBV, Influenzavirus, Papillomavirus, Reovirus und Herpes simplex Virus (HSV). Ferner wurden nicht nur virale Peptide, sondern auch virusbefallene Zellen erkannt, sodass beispielsweise EBV, welches in B Zellen persistiert, eine chronische Stimulation des Immunsystems hervorrufen kann (21). Im Mausmodell konnte weiterhin gezeigt werden, dass Viren, welche beispielsweise für immunogene Sequenzen von MBP codieren, eine demyelinisierende Erkrankung auslösen können. Auch die Infektion von SJL/J Mäusen mit einer nichtpathogenen Variante von Theiler´s murine encephalitis virus, welches für die Sequenz von Proteolipidprotein (PLP139-151) – ein weiteres Autoantigen im Rahmen der MS – codiert, führt zu einer demyelinisierenden Erkrankung, vermittelt durch PLP-spezifische Th1 Zellen. Anhand solcher Studien wurde gezeigt, dass ein Virus, der für ein Myelinepitop codiert, prinzipiell in der Lage ist, ZNS-gerichtete Autoimmunität zu erzeugen (22,23).
Andererseits gibt es jedoch Hinweise dafür, dass bestimmte durchgemachte oder persistierende Infektionen sogar protektiv wirken könnten. Eine Infektion mit Helminthen, wie zum Beispiel Trichuris trichuria, scheint sich günstig auf das Erkrankungsrisiko, aber auch den -verlauf auszuwirken (24). Chronische Parasitosen scheinen antiinflammatorische Signalwege anzustoßen und letztendlich zu einer verminderten antigenspezifischen Immunantwort zu führen. Dies geschieht über die Induktion von T_{reg}, welche die antiinflammatorischen Zytokine IL-10 und TGF-β sezernieren, sowie $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ T Zellen und regulatorische B Zellen, die ebenfalls IL-10 produzieren. Tatsächlich haben mit Helminthen infizierte MS Patienten weniger Schübe, eine geringere Behinderungsprogression und signifikant weniger Läsionen im MRT (18). Ähnliche Zusammenhänge konnten auch für Schistosoma mansoni und Fasciola hepatica gezeigt werden. Intrazelluläre Parasiten hingegen scheinen zu keiner Immunmodulation in der Lage (24).

1.4.3 Weitere Risikofaktoren

Für zahlreiche weitere Faktoren konnten in Studien Zusammenhänge in die eine oder andere Richtung gezeigt werden, wobei beteiligte molekulare Mechanismen bislang nur ansatzweise verstanden sind.

Rauchen erhöht das Risiko an einer MS zu erkranken erheblich. Dies gilt auch für Exraucher und Passivraucher, wobei der Effekt dosisabhängig ist: Je mehr pack-years eine Person aufweist, desto höher ist ihr Risiko an MS zu erkranken (25). Vergleicht

man Patienten mit MS hinsichtlich ihrer Rauchgewohnheiten, so stellt man fest, dass Raucher in Befragungen eine deutlich verminderte gesundheitsbezogene Lebensqualität (Health-Related Quality of Life, HRQOL) und eine höhere Krankheitsaktivität angeben sowie größere Defizite auf Performance- und Functionality-Scales zeigen (26). Die Progression zur SP-MS findet wesentlich schneller beziehungsweise häufiger statt (27). Insgesamt wirkt sich das Rauchen also deutlich negativ auf die Erkrankung aus.
Mehrere Studien postulieren einen Zusammenhang zwischen MS und Adipositas sowohl in Kindheit und Jugend als auch im Erwachsenenalter. Dies gilt insbesondere für Frauen (28). Adipositas bewirkt eine zwar nur geringgradige, jedoch chronische Entzündung des Gewebes mit Infiltration und Aktivierung von Immunzellen, welche eine gesteigerte Zytokinproduktion aufweisen, jedoch nur verminderter Regulation unterliegen (29).
Hingegen wirkt sich körperliche Betätigung positiv auf die Erkrankungshäufigkeit aus. Dieser Zusammenhang gilt interessanterweise ebenfalls besonders für Frauen. Häufige Bewegung kann das Erkrankungsrisiko um bis zu 27% senken (30). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass eine höhere Aufnahme ungesättigter Fettsäuren aus pflanzlichen Quellen – insbesondere von α-Linolensäure (ALA) – mit einem geringeren Risiko der Entwicklung einer MS einhergeht (31). ALA moduliert die Immunantwort wahrscheinlich über Downregulation proinflammatorischer Zytokine wie IL-6, IL-1β und TNFα (32).

Insgesamt wirken sich Lifestyle-Faktoren nicht nur auf das Risiko an MS zu erkranken aus, sie beeinflussen auch die Lebensqualität der bereits erkrankten Patienten (33).

1.5 Genetik

Neben Umweltfaktoren spielen bestimmte genetische Risikokonstellationen eine Rolle bei der individuellen Suszeptibilität für die Entwicklung einer MS.

Die Konkordanzrate für MS innerhalb einer Familie ist am höchsten bei eineiigen Zwillingen, Geschwistern und zwischen Eltern und ihren Kindern. Von Erkrankten adoptierte Kinder leben dagegen mit dem Erkrankungsrisiko der Allgemeinbevölkerung. Klassische genetische Untersuchungen wie diese legen nahe,

dass der MS eine komplexe Vererbung zu Grunde liegt, welche die individuelle Krankheitsempfänglichkeit durch unabhängige oder interagierende Gene festlegt (34).

Es existieren zahlreiche mit größerem Erkrankungsrisiko behaftete, jedoch auch protektiv wirkende Allele. Mittlerweile sind mehr als 200 single nucleotide polymorphisms (SNPs) identifiziert worden, welche mit MS assoziiert sind. Sie liegen überwiegend nahe bei oder innerhalb von Genen, welche mit der angeborenen oder adaptiven Immunantwort in Zusammenhang stehen (10). Eine gesteigerte Empfänglichkeit für die Entwicklung von MS ist insbesondere mit bestimmten human leucocyte antigen (HLA)-Genen verknüpft (35,36). Einige Risikovarianten liegen aber auch außerhalb der HLA-Loci (37). Das bedeutendste und zuerst entdeckte Risikoallel ist HLA-DRB1*1501 und geht mit einem um das Dreifache erhöhten Erkrankungsrisiko einher (10). Dieses wird vor allem in der europäischen und asiatischen Bevölkerung häufig gefunden und mit einer Risikoerhöhung in Verbindung gebracht (38). Des Weiteren treten beispielsweise HLA-DQA1*0102 und HLA-DQB1*0602 sowie HLA-DRB*0101, HLA-DRB1*0301, HLA-DRB1*1303 und HLA-DRB1*1503 (letzteres vor allem bei Afrikanern und Afroamerikanern) als wichtige Risikoallele hervor. Ein ausgeprägtes Kopplungsungleichgewicht der betreffenden Allele macht die Identifikation eines einzelnen Locus jedoch schwierig. So werden HLA-DRB*1501, HLA-DQA1*0102 und HLA-DQB1*0602 vor allem in der europäischen Bevölkerung häufig gemeinsam vererbt und bewirken in dieser Kombination eine starke Risikoerhöhung. Auch HLA-DQA1*0102 kann das Erkrankungsrisiko steigern, wenn es in trans mit HLA-DRB*1501 kombiniert wird. Auf der anderen Seite ist HLA-DRB*1501 auch Teil neutraler und sogar protektiver Haplotypen. So resultiert beispielsweise aus dem Vorhandensein von HLA-DRB1*1401 eine Risikoreduktion, auch wenn gleichzeitig HLA-DRB1*1501vorhanden ist. Dies zeigt, dass keinesfalls ein Gen alleine für eine erhöhte Empfänglichkeit gegenüber der Erkrankung verantwortlich gemacht werden kann, sondern immer das Zusammenspiel der verschiedenen Allele zu betrachten ist (38,39).

In prospektiven Studien konnte gezeigt werden, dass die Teilnehmer, je mehr Risikoallele sie trugen, häufiger und jünger an MS erkrankten und auch das Risiko für einen Schub erhöht war. Probanden mit mehr Risikoallelen hatten außerdem einen signifikant höheren Behinderungsgrad nach Expanded Disability Status Scale (EDSS) und größere Verluste kortikaler und subkortikaler Substanz. Diese Zusammenhänge

galten insbesondere für Träger des Risikoallels HLA-DRB1*1501. Für HLA-B*4402 (rs9266773) konnte dagegen ein protektiver Effekt hinsichtlich seltenerer Erkrankungshäufigkeit sowie einer geringeren Schubrate und geringerer Verluste von grauer Substanz verzeichnet werden (40,41). Auch tierexperimentell konnte gezeigt werden, dass bestimmte HLA-Haplotypen Einfluss auf den Krankheitsverlauf nehmen und dies durch veränderte Zytokinlevel vermittelt wird (42).

1.6 Immunpathogenese

Allgemein wird angenommen, dass es sich bei der MS um eine Autoimmunerkrankung handelt, wobei sowohl Komponenten der angeborenen als auch der adaptiven Immunantwort beteiligt sind. Möglicherweise führt eine systemische Immunreaktion gegen ein Fremdantigen über molekulares Mimikry oder „bystander activation“ zu einer Fehlerkennung von glialen und neuronalen Autoantigenen, wie MBP oder PLP (4,43). Das ZNS ist als immunprivilegiertes Organ zwar durch die Blut-Hirn-Schranke von der Peripherie abgeschirmt, dennoch transmigrieren ständig Lymphozyten ins ZNS, so beispielsweise auch autoreaktive T Zellen (4,44).

1.6.1 Beteiligte Zelltypen und Zytokine

Besonders Zellen der adaptiven Immunität spielen eine zentrale Rolle in der Pathogenese der MS. Veränderungen des Verhältnisses und der Funktion von regulatorischen und proinflammatorischen Zelltypen korrelieren mit dem Krankheitsverlauf. Während Phasen der aktiven Entzündung sind deutlich mehr zirkulierende proinflammatorische $CD4^+$ und $CD8^+$ T Zellen, B Zellen und follikuläre T Helferzellen nachweisbar, während der Anteil regulatorischer Zelltypen vermindert ist (45). Dies spiegelt sich auch in einem Ungleichgewicht proinflammatorischer und regulatorischer Zytokine wider (46,47).

1.6.1.1 T Zellen

Neben den beiden in dieser Arbeit vorrangig untersuchten Populationen der Th1 und Th17 Zellen, welche eine zentrale Rolle bei der Etablierung der Entzündungsreaktion im Rahmen der MS spielen, sind auch Th2, Th22 und Th9 Zellen $\gamma\delta$, $CD8^+$ sowie T_{reg} Zellen an der Krankheitsentstehung beteiligt (48).

Die Rolle von Th1 Zellen konnte nicht nur in verschiedenen tierexperimentellen Studien, sondern auch beim Menschen gezeigt werden. IFN-γ sezernierende Th1 Zellen, welche spezifisch für Myelinantigene sind, können im Tiermodell die experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis (EAE) auslösen (49). Hingegen sind IL-12p40-defizitäre Mäuse resistent gegenüber der Erkrankung, was wiederum auf eine Beteiligung von Th1 Zellen schließen lässt, für deren Differenzierung IL-12 benötigt wird. Widersprüchlich erscheint jedoch, dass Mäuse ohne Th1 Zellen oder mit Störungen in IFN-γ Signalwegen dennoch eine EAE entwickeln. Hier kommen dann andere Zellpopulationen, also Th17 Zellen, Th22 und Th9 ins Spiel (48). IFN-γ gilt als charakteristisches Zytokin für die Th1 Zellen, welches sowohl bei der MS als auch ihrer Modellerkrankung EAE entscheidend an der Pathogenese beteiligt ist (50). Th1 Zellen, welche nach Stimulation mit Myelinantigenen IFN-γ sezernieren, kommen insbesondere bei Patienten mit aktiver Erkrankung häufiger vor als bei den entsprechenden Kontrollpersonen (51,52). Unter einer versuchsweisen Therapie von MS Patienten mit IFN-γ in den 1980er Jahren stieg die Zahl der Exazerbationen unter den Studienteilnehmern (53). In verschiedenen Arbeiten konnte weiterhin gezeigt werden, dass die Zahl an Th1 Zellen in Patienten mit aktiver Erkrankung höher war und diese mehr IFN-γ produzierten, als dies bei Kontrollpersonen der Fall war (43).
Ebenfalls von Bedeutung sind Th17 Zellen. Sie dienen der Abwehr bakterieller und Pilzinfektionen. Th17 Zellen sind sowohl tierexperimentell als auch beim Menschen an der Pathogenese demyelinisierender Erkrankungen beteiligt (47,54). So fand sich dieser Zelltyp gehäuft in MS Läsionen, und Myelin-reaktive Zellen von Patienten mit MS zeigten eine höhere IL-17 Produktion als solche von Kontrollpersonen (43). Die von Th17 Zellen sezernierten Zytokine IL-17, IL-6, IL-21, IL-22, IL-23 und TNF-α haben proinflammatorische Wirkung, was eine Beteiligung an der Entzündungsreaktion im Rahmen der MS plausibel erscheinen lässt (55). Auch im Mausmodell spielen Th17 Zellen eine Rolle bei der Entstehung einer EAE (49), welche allerdings vom gleichzeitigen Vorhandensein von IFN-γ produzierenden Th1 Zellen abhängt. Anscheinend können diese in das entzündete ZNS eintreten und eine Immunreaktion initiieren, woraufhin Th17 Zellen rekrutiert werden und die Entzündung aufrechterhalten (56). Andere Studien postulieren demgegenüber, dass Th1 und Th17 unabhängig voneinander in der Lage sind, Neuroinflammation auszulösen und diesem

Prozess wahrscheinlich ein jeweils anderer pathogenetischer Mechanismus zugrunde liegt (57).

Abweichend von der strikten Unterteilung in Th1 und Th17 Phänotypen fanden Paroni et al. einen Th1/Th17 CM Subtyp bei Patienten mit RR-MS, wobei dieser die Schübe zu triggern schien. Der Th1/Th17 CM Subtyp zeigt Ähnlichkeiten mit Th17 Zellen, kann jedoch beispielsweise uneingeschränkt zwischen zervikalen Lymphknoten und ZNS wandern und sezerniert in hohem Maße proinflammatorische Zytokine, weshalb er als besonders pathogen gilt (58). Basdeo et al. beschreiben eine ähnliche Population ehemaliger Th17 Zellen, welche IFN-γ sezernieren und von den Autoren als „nonclassical Th1“ bezeichnet werden. Im Vergleich zu klassischen Th1 und Th17 Zellen sezernieren sie mehr proinflammatorische Zytokine, proliferieren nach Stimulation stärker und sind einer Unterdrückung durch T_{reg} kaum zugänglich (59).

Th2 Zellen steuern das Krankheitsgeschehen im Rahmen der MS vor allem über die Interaktion mit B Zellen, deren Bedeutung nochmals weiter unten beschrieben wird. So produzieren Th2 Zellen unter anderem IL-4, welches das Wachstum und die Aktivierung von B-Zellen vorantreibt (43,60).

Auch die erst vor wenigen Jahren entdeckten Th9 und Th22 Zellen könnten eine Rolle in der Pathogenese der MS spielen (43). Th9 Zellen können im Tiermodell EAE induzieren (49). Th22 Zellen, welche das proinflammatorische Zytokin IL-22 bilden, sind in vermehrter Anzahl im Liquor und peripheren Blut von Patienten mit MS nachzuweisen. Diese sind spezifisch für MBP und tragen homing-Moleküle, die ihnen das Eindringen ins ZNS ermöglichen. Interessanterweise scheinen diese Zellen nicht sensibel gegenüber einer Therapie mit Interferonen zu sein (61).

Aber nicht nur $CD4^+$, auch $CD8^+$ T Zellen scheinen an der Pathogenese der MS beteiligt zu sein. So konnten bei Patienten mit MS erhöhte Level MBP-spezifischer $CD8^+$ T Zellen sowie erhöhte Mengen an Granzym im Liquor gefunden werden (43,62,63). Ferner sind $CD8^+$ T Zellen in aktiven demyelinisierenden Läsionen präsent (64) und erkennen MHC I auf Astrozyten und Oligodendrozyten, was zur Schädigung der Axone führt (65). Auf der anderen Seite sind jedoch auch regulatorische Zellen dieser Subpopulation bekannt, welche die Proliferation autoreaktiver T Zellen unterdrücken können (66,67).

T_{reg} sind bedeutsam bei der Aufrechterhaltung peripherer Toleranz, indem sie die Effektorfunktionen autoreaktiver $CD4^+$ Zellen unterdrücken. Ihre Fehlfunktion wird mitverantwortlich für die Entstehung von Autoimmunerkrankungen wie der MS

gemacht (68,69). Bei Zellen von Patienten mit MS lassen sich genetische Aberrationen der T_{reg} Marker CTLA-4 und CD25 feststellen und erhöhte Level proinflammatorischer Zytokine weisen auf eine gestörte Funktion der T_{reg} hin (69). Im akuten Schub sind die $CD4^{+}CD25^{high}Foxp3^{+}$ (nT_{reg}) vermindert. Bei Patienten in Remission oder unter Therapie mit Interferonen lassen sich dagegen besonders viele T_{reg} unterschiedlicher Populationen nachweisen (70). Auch regulatorische $CD8^{+}$ T Zellen können die Proliferation autoreaktiver T Zell-Populationen unterdrücken und sind daher enorm wichtig bei der Aufrechterhaltung des immunologischen Gleichgewichts (66,71). Durch $CD8^{+}CD25^{+}FoxP3^{+}$ Zellen, welche IL-10 und TGF-β produzieren, wird nicht nur die Zahl autoreaktiver $CD4^{+}$ Zellen und die Produktion der proinflammatorischen Zytokine IFN-γ und IL-17A vermindert. Auch werden kostimulatorische Moleküle auf dendritischen Zellen (DCs) herunterreguliert (72). In vivo bewirken sie einen Schutz vor Erkrankung bei normaler Th1 Aktivierung, verstärkter Th2 Proliferation und einer verminderten ZNS Infiltration (71). Die Deletion von regulatorischen $CD8^{+}$ T Zellen hingegen bewirkt einen schwereren und länger andauernden Verlauf der EAE (73). Beim Menschen finden sich im akuten Schub deutlich weniger T_{reg} in Blut und Liquor (72). Abbildung 1.1 zeigt schematisch die Funktion von T_{reg}.

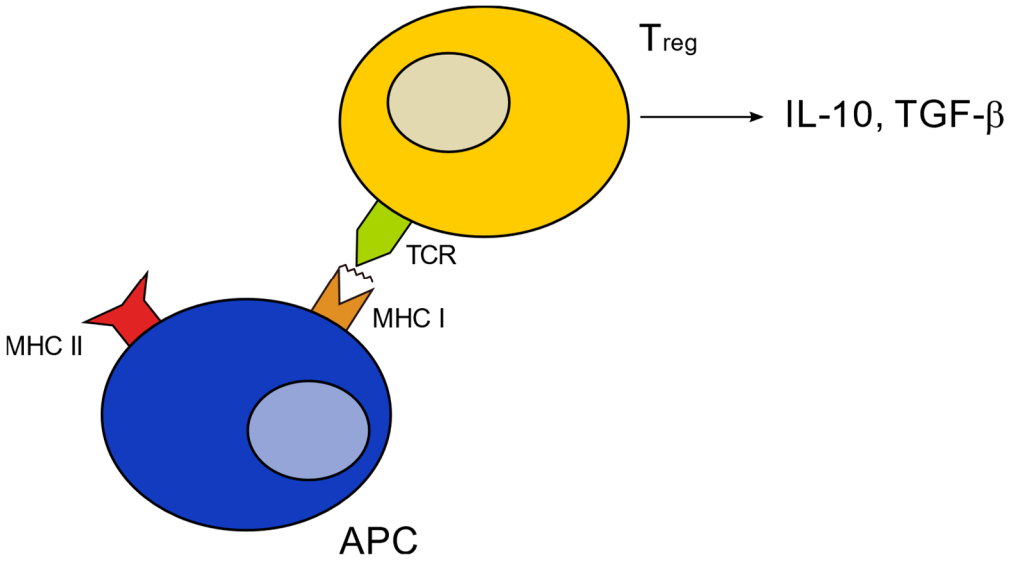


Abbildung 1.1: Regulatorische T Zellen

Erkennen regulatorische T Zellen ein Peptid, das ihnen auf MHC präsentiert wird, sezernieren sie antiinflammatorisch wirksame Zytokine wie IL-10 und TGF-β.

Zellen der adaptiven Immunität wirken also keineswegs ausschließlich Autoimmunität-fördernd. So konnte sogar gezeigt werden, dass gesunde Lymphozyten in der Lage sind, Substanzen zu sezernieren, welche die Differenzierung von Oligodendrozyten vorantreiben. Bei Lymphozyten von Patienten mit MS scheint diese regenerative Funktion jedoch beeinträchtigt (74).

1.6.1.2 B Zellen

Auch wenn es zahlreiche Hinweise dafür gibt, dass die MS vor allem vermittelt durch Th1 Zellen und Th17 Zellen zu Stande kommt, so spricht doch auch einiges zumindest für eine Mitbeteiligung der B Zellen (43). B Zellen können durch die Blut-Hirn-Schranke wandern und intrathekal Antikörper produzieren, was sich dann im Auftreten von oligoklonalen Banden bei der Liquoruntersuchung äußert (75). Diese sind auch wichtige diagnostische und prognostische Marker in der Klinik (76). Jelcic et al. machen die Interaktion von B und T Zellen für das von ihnen beobachtete Phänomen der „Autoproliferation“ verantwortlich. Hierbei kommt es in der Peripherie durch Interaktionen von B Zellen mit $CD4^+$ T Zellen unter Beteiligung von HLA-DR15 zur Entstehung eines autoreaktiven Zellrepertoires, welches brain-homing Moleküle trägt (77). Ferner wurde die Rolle einer persistierenden EBV Infektion in B Gedächtniszellen bereits oben angesprochen. Ebenso konnte für B Zellen ein Zusammenhang zwischen den Reaktivitäten gegen EBV und Hirnstrukturen bei Patienten mit MS gezeigt werden und es besteht eine Korrelation zwischen der Häufigkeit EBV-spezifischer B Zellen im Blut von Patienten und deren Krankheitsverlauf (78). Nicht zuletzt sind MS Therapeutika wie Rituximab, welche B Zellen depletieren, bei einigen Patienten besonders effektiv und viele weitere, welche sich gegen T Zellen richten, depletieren gleichzeitig auch B Zellen (43,79).

1.6.1.3 Antigenpräsentierende Zellen

Doch nicht nur Komponenten der adaptiven Immunität spielen bei der Pathogenese der MS eine Rolle, auch das angeborene Immunsystem ist daran beteiligt. Antigenpräsentierende Zellen (APC) wie Makrophagen, im ZNS residierende Mikrogliazellen, dendritische Zellen (DCs) und nicht zuletzt natürliche Killerzellen (NK Zellen) erfüllen wichtige Funktionen bei der Initiierung und Regulation der Immunantwort (80).

DCs sind als APC nicht nur ganz entscheidend an der Entwicklung einer adaptiven Immunantwort gegen Pathogene beteiligt, sondern auch an der Entstehung von Autoimmunität. Sie sind insbesondere wichtig für die Aufrechterhaltung von zentraler und peripherer Toleranz, da sie über spezifische Signalwege die Differenzierung von T Effektorzellen und regulatorischen T Zellen lenken. Tatsächlich sind bei Patienten mit MS die dendritischen Zellen in Zahl und Funktion verändert. So lassen sich vermehrt dendritische Zellen im Liquor von erkrankten Personen nachweisen. Diese weisen ein verändertes Muster der Zytokinexpression auf wodurch sie unter anderem weniger Einfluss auf die Differenzierung von T_{reg} nehmen. Die Wirkung sogenannter „disease modifying drugs“ wie IFN-β und Glatirameracetat beruht unter anderem auf einer Einflussnahme auf die Funktion dendritischer Zellen. Die genaue Entschlüsselung der beteiligten Signalwege ist jedoch noch nicht gelungen (81).

Makrophagen vermitteln gegensätzliche Auswirkungen je nachdem, welche Signale sie von ihrer Umgebung erhalten. So können Makrophagen entzündliche Prozesse weiter vorantreiben, auf der anderen Seite jedoch durch trophische Mediatoren die Regeneration fördern (82). Die ZNS-ständigen Mikrogliazellen lenken die Immunreaktion über ihre Fähigkeit Antigene zu präsentieren, die von ihnen produzierten Zytokine, Chemotaxis und Phagozytose (80). Aktivierte Mikrogliazellen sezernieren proinflammatorische Faktoren, welche umliegende Neuronen schädigen. Auf der anderen Seite setzen die geschädigten Neuronen selbst toxische Mediatoren wie COX-2, reaktive Sauerstoffspezies und Calpain frei, was wiederum zu einer Aktivierung von Mikrogliazellen führt, die ihrerseits neurotoxische Substanzen produzieren, was eine progrediente Neurodegeneration zur Folge hat (83).

NK Zellen vermitteln über eine Vielzahl von Rezeptoren und Liganden die Regulation von Immunantworten und spielen auch bei der MS und ihrer Modellerkrankung EAE eine Rolle (84). Im Liquor von Patienten mit MS ist der Anteil der NK Zellen im Vergleich zu gesunden Personen vermindert, die absolute Zahl jedoch erhöht (85). Intrathekal kommen vor allem $CD56^{bright}$ NK Zellen vor. Diese regulieren beim Gesunden die Aktivität von $CD4^+$ T Zellen. Bei Patienten mit MS ist häufig die Interaktion zwischen CD155 auf aktivierten $CD4^+$ Zellen und NK Zellen durch eine Mutation im Rezeptor DNAM-1 gestört, sodass letztere nicht mehr ihre zytolytische Funktion ausüben können. Diese verminderte Kontrolle der $CD4^+$T Zell-Aktivität ist wahrscheinlich mitverursachend für die Entstehung der MS (86,87).

1.6.2 Antigenpräsentation

Im Gegensatz zu Zellen des angeborenen Immunsystems können T Zellen ein Pathogen nicht im nativen Zustand erkennen. Sie benötigen dafür kurze, kontinuierliche Aminosäuresequenzen. Diese können im intakten Protein verborgen sein und den T Zellen erst mit Hilfe der APC durch Prozessierung und Präsentation auf MHC Molekülen zugänglich gemacht werden.

1.6.2.1 MHC Moleküle

Man unterscheidet zwei Klassen von MHC Molekülen - MHC I und MHC II - mit ähnlicher dreidimensionaler Struktur (Abbildung 1.2). In der Nähe der Zellmembran finden sich zwei Domänen, welche als Immunglobulin-ähnlich zu bezeichnen sind, während die beiden Domänen am anderen Ende die Peptidbindestelle in Form einer Spalte bilden (60). Die Peptidbindestelle der MHC I Moleküle wird aus der α_1- und α_2-Domäne der schweren Kette gebildet. β_2-Mikroglobulin ist mit der α_3-Domäne der schweren Kette assoziiert. Bei MHC II Molekülen besteht die Bindestelle aus den α_1 und β_1-Domänen der beiden schweren Ketten. Für beide MHC Klassen gilt, dass der Boden der Peptidbindestelle aus einem siebensträngigen β-Faltblatt besteht, während die Seiten von α-Helices flankiert werden. In und um diese Region finden sich polymorphe Aminosäureseitenketten, welche mit ihren unterschiedlichen chemischen Eigenschaften zur Bindungsspezifität des MHC Moleküls beitragen (88).

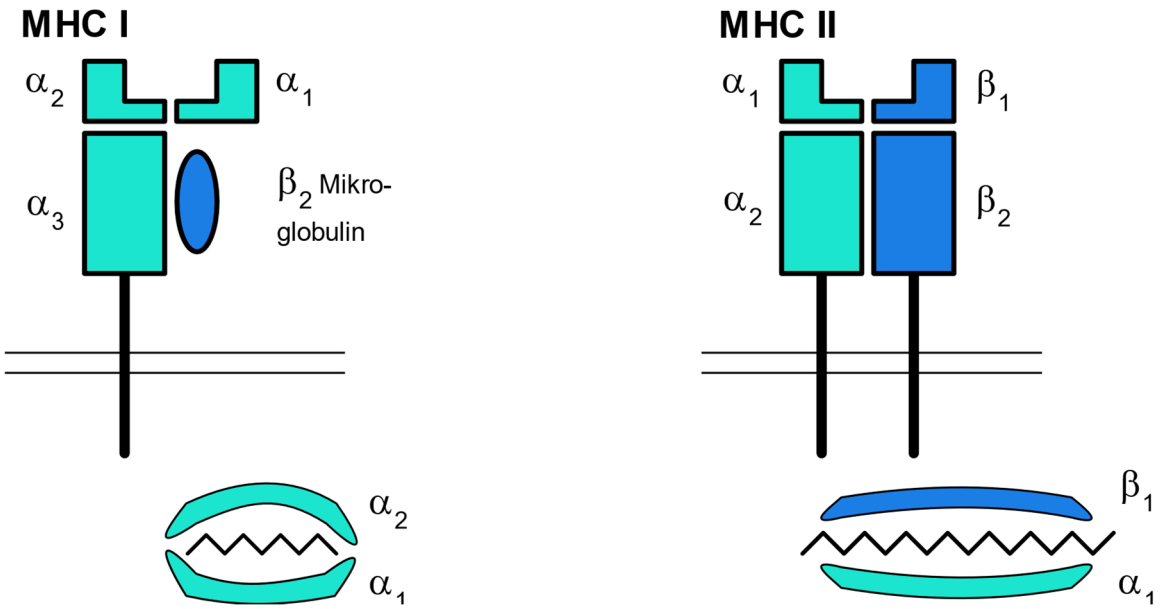


Abbildung 1.2: MHC Moleküle

MHC I besteht aus je einer α_1, α_2 und einer α_3 Kette. Letztere ist in der Zellmembran verankert und mit β_2 Mikroglobulin assoziiert. Die MHC I Bindestelle wird von α_1 und α_2 gebildet, besitzt eine geschlossene Konfiguration und bindet daher bevorzugt Peptide mit einer Länge von 8-10 Aminosäuren.

MHC II besteht aus vier Ketten: α_1, α_2, β_1 und β_2. Die Peptidbindestelle von MHC II wird von α_1 und β_1 gebildet, ist an den Enden offen und bindet längere Peptide.

Während MHC I Moleküle auf allen kernhaltigen Zellen des Körpers vertreten sind und vor allem zur $CD8^+$-vermittelten Abtötung virusinfizierter Zellen durch T Killerzellen beitragen, finden sich MHC II Moleküle auf APC, also dendritischen Zellen, B Zellen und Makrophagen. Dort werden sie von $CD4^+$ T Zellen erkannt, welche durch die von ihnen sezernierten Zytokine weitere Kaskaden der Immunreaktion in Gang setzen (60). MHC I Moleküle binden Peptide mit einer Länge von 8-10 Aminosäuren, wobei die Enden in spezifischen Taschen Platz finden. MHC II Moleküle dagegen besitzen eine Bindestelle, welche an den Enden offen ist, sodass wesentlich längere Peptide gebunden werden können (88). Es werden jedoch keineswegs nur Bestandteile von Pathogenen, sondern auch körpereigene Peptide ständig auf MHC Molekülen präsentiert und von T Zellen abgetastet. Dies gilt auch für Autoantigene, die an der Pathogenese der MS beteiligt sind. Bereits Ende der 1990er Jahre wurde beispielsweise erstmals die Kristallstruktur eines HLA-DR2 gebundenen MBP-Peptids beschrieben (89).

Auf MHC I gelangen überwiegend Bruchstücke intrazellulärer Proteine. Diese entstammen meist dem Zytoplasma oder sind Substrate des Proteasoms. Das modifizierte Peptid gelangt über „transporter associated with antigen processing“ (TAP) ins endoplasmatische Retikulum (ER), wo es auf MHC I trifft und bindet. Der Weitertransport läuft dann regulär über den Golgi Apparat und sekretorische Vesikel zur Plasmamembran (90–92). MHC II hingegen präsentiert extrazelluläre Antigene, welche beispielsweise von dendritischen Zellen aufgenommen wurden (93). Das Antigen gelangt in ein frühes Endosom und von dort ins MIIC, wo es durch Proteasen degradiert wird (90,92,94). Das MHC class II-enriched compartment (MIIC) stellt ein spezialisiertes Kompartiment dar, was bedeutsam ist, um die Degradation des Antigens in einzelne Aminosäuren, wie sie etwa im normalen Lysosom stattfinden würde, zu verhindern (91). Die Synthese von MHC II findet im ER statt, wobei MHC II mit der invariant chain assoziiert bleibt, welche die Bindestelle blockiert. Nachdem MHC II ins späte Endosom gelangt ist, wird die invariant chain durch Proteasen degradiert und das zu präsentierende Antigen unter Mithilfe des Chaperons HLA-DM auf MHC II geladen (94,95). Im weiteren Verlauf gelangt auch MHC II zur Plasmamembran (90,92).

Die Expression von MHC Molekülen ist nicht statisch. Unter bestimmten, insbesondere entzündlichen Umständen können die betreffenden Gene vermehrt exprimiert werden (93,96). Generell wird NOD-like receptor family CARD domain containing 5 (NLRC5) sowohl für die konstitutive als auch induzierbare MHC I Expression benötigt (97). Die Transkription von MHC II wird über Class II MHC transactivator (CII TA) reguliert (94,98). Veränderungen der MHC Transkription beziehungsweise Expression finden sich auch im Rahmen der MS statt. In Läsionen haben phagozytierende Makrophagen die Transkriptionsfaktoren Regulatory factor X (RFX) und CII TA hochreguliert, die Expression von HLA-DR, -DQ und -DP, aber auch von MHC I ist gesteigert. In normal erscheinender weißer Substanz wurden ebenfalls solche Zellen gefunden, was die Autoren als „preactive lesions“ bezeichneten (99).

1.6.2.2 T Zell Rezeptor

T Zell Rezeptoren (TCR) erkennen Peptide, welche ihnen auf MHC Molekülen präsentiert werden. Dabei können sie normalerweise zwischen Selbst- und Fremdantigenen unterscheiden. Wird fälschlicherweise ein körpereigenes Peptid

erkannt, kann dies zur Entstehung von Autoimmunerkrankungen führen. Der TCR ist ein Heterodimer und besteht in der Regel aus einer α- und einer β-Kette, wenige T Zellen tragen jedoch stattdessen einen aus einer γ- und einer δ-Kette bestehenden Rezeptor. Insgesamt ähnelt der TCR in seiner Struktur einem Antigen bindenden Fragment der Immunglobuline. Wie bei diesem bestehen die α- und β- Kette aus jeweils einer konstanten (C) und einer variablen (V) Region. Die beiden konstanten Domänen sind durch eine Disulfidbrücke verbunden und in der Zellmembran verankert, während Vα und Vβ gemeinsam die Bindestelle für das Antigen bilden. Der TCR besitzt im Gegensatz zu den Immunglobulinen jedoch immer nur eine Antigenbindestelle und wird niemals sezerniert (60). Die Bindung an den Peptid-MHC-Komplex findet über die sogenannten complementarity determining regions (CDR) der variablen Domänen des TCR statt (88). Diese sind durch sechs hypervariable Regionen (α1, α2, α3, β1, β2 und β3) charakterisiert, deren Struktur in den sogenannten V-Segmenten der Keimbahn codiert wird. Beim Menschen gibt es 37 Vα- und 47 Vβ-Segmente. CDR1 und CDR2 werden durch Vα- und Vβ- Segmente der Keimbahn codiert. Hierbei existiert eine relativ begrenzte Anzahl möglicher Kombinationen dieser Segmente. CDR3 entsteht im Gegensatz hierzu durch somatische Rekombination der Vα- und Jα- beziehungsweise Vβ-, D- und Jβ-Segmente und weist daher ein hohes Maß an interindividueller Variabilität auf (100,101).

Bei der Bindung an den Peptid-MHC-Komplex (pMHC) stellen CDR1 und CDR2 den hauptsächlichen Kontakt zum MHC-Molekül her, während CDR3 vor allem mit dem präsentierten Peptid interagiert (88,102,103). Die Vα Domäne des TCR zeigt starke Interaktionen mit den α Helices des pMHC, was der T Zelle ermöglicht, verschiedene Liganden „abzutasten“ und bei Erkennung fest zu binden (104). Wenn der TCR an einen pMHC bindet, so überdeckt er die Peptidbindestelle, wobei CDR 1 und 2 der Vα Kette über dem aminoterminalen und CDR 1 und 2 der Vβ Kette über dem carboxyterminalen Ende des Peptids zu liegen kommen (105). Besondere Bedeutung kommt dem CDR3-loop zu, dieser zeigt ein hohes Maß an Flexibilität (106). Er liegt im ungebundenen Zustand elongiert vor und macht im Sinne eines „induced fit“ bei der Antigenbindung eine Konformationsänderung durch (107). Bei der schier unendlich großen Menge potenzieller Antigene, welche in der Umwelt vorkommen, und der dabei begrenzten Anzahl von TCR, muss eine gewisse Kreuzreaktivität vorhanden sein, um

das Funktionieren des Immunsystems zu gewährleisten (108). Auch experimentell konnte bestätigt werden, dass ein einzelner TCR mehrere strukturell ähnliche Peptide erkennen kann (102). CDR3α, welche dem TCR einen gewissen Anpassungsspielraum an verschiedene Peptide ermöglicht, liefert damit einen Erklärungsansatz für dieses Phänomen (109).
Die Fähigkeit des TCR zur Kreuzreaktivität birgt andererseits das Risiko der Entstehung von Autoimmunerkrankungen. TCR, welche einen Komplex aus MHC und Autoantigen gebunden haben, zeigen eine veränderte Topologie der Bindung oder strukturelle Abweichungen. Die Stabilität dieser autoreaktiven Komplexe ist im Vergleich zu solchen, die sich gegen ein Pathogen richten, vermindert (110). Autoreaktive T Zell-pMHC-Komplexe zeigen eine geringere Komplementarität zwischen dem TCR und seinem Liganden (104). Die Interaktion, welche asymmetrisch und vor allem am N-terminalen Ende des Peptids stattfindet, wird durch hypervariable CDR 3 dominiert. Auch die Geometrie der CD4-Assoziation ist verändert (111). Anhand des Hy.1B11 TCR eines Patienten mit MS, der sich gegen MBP richtet, konnte demonstriert werden, dass für den Kontakt zum Autoantigen primär CDR3αF95 verantwortlich ist und dieser Kontakt sich wesentlich von dem zu pathogenen Antigenen wie HSV und Pseudomonas aeruginosa unterscheidet (112).

1.6.2.3 Kreuzpräsentation

Das Phänomen der Kreuzpräsentation ist von essenzieller Bedeutung für die Abwehr von Erregern, welche APCs nicht direkt infizieren. Durch Kreuzpräsentation können extrazelluläre Antigene dennoch auf MHC I gelangen, $CD8^+$ T Zellen aktivieren und und spezifische Zytotoxizität möglich machen. Dies wird durch spezialisierte dendritische Zellen ausgeführt (60). Nachdem die endozytierten Antigene ins Phagolysosom und von dort ins Zytosol gelangt sind, werden sie am Proteasom degradiert. Die Bruchstücke können TAP abhängig ins ER gelangen und dort auf MHC I geladen werden. Eine andere Möglichkeit ist die Beladung im vesicular loading compartment, ohne dass das Antigen ins Zytosol gelangt. Hierbei spielen auch von der Zelloberfläche „recycelte“ MHC eine Rolle (60,91,113).
Ji et al. beschrieben ein MHC I restringiertes MBP Epitop, welches während $CD4^+$ induzierter EAE durch Oligodendrozyten präsentiert wurde. Durch dendritische Zellen

fand hier außerdem eine Kreuzpräsentation statt, sodass spezifische $CD8^+$ T Zellen aktiviert wurden, die Oligodendrozyten direkt erkannten (114).

1.6.3 Toleranz

Die im Folgenden beschriebenen Mechanismen der zentralen und peripheren Toleranz verhindern im Gesunden, dass Zellen des Immunsystems körpereigene Peptide erkennen und dadurch Autoimmunprozesse initiieren.

Für den Prozess der Bildung von T Lymphozyten, genauer der positiven Selektion im Thymus, ist es zunächst aber sogar notwendig, dass der TCR auch körpereigene Peptide erkennt. Diese werden ihm von den kortikalen Thymusepithelzellen auf MHC Molekülen präsentiert, wodurch eine weitere Differenzierung entweder zu $CD4^+$ oder $CD8^+$ Zellen bewirkt wird. Erkennt er die Antigene nicht, stirbt der naive Lymphozyt. Im Rahmen der negativen Selektion werden dann all diejenigen Lymphozyten eliminiert, welche entweder beide Marker, also CD4 und CD8, tragen oder aber die körpereigenen Antigene mit sehr starker Affinität binden (115). Die untenstehende Abbildung 1.3 veranschaulicht den Prozess der Toleranzinduktion im Thymus.

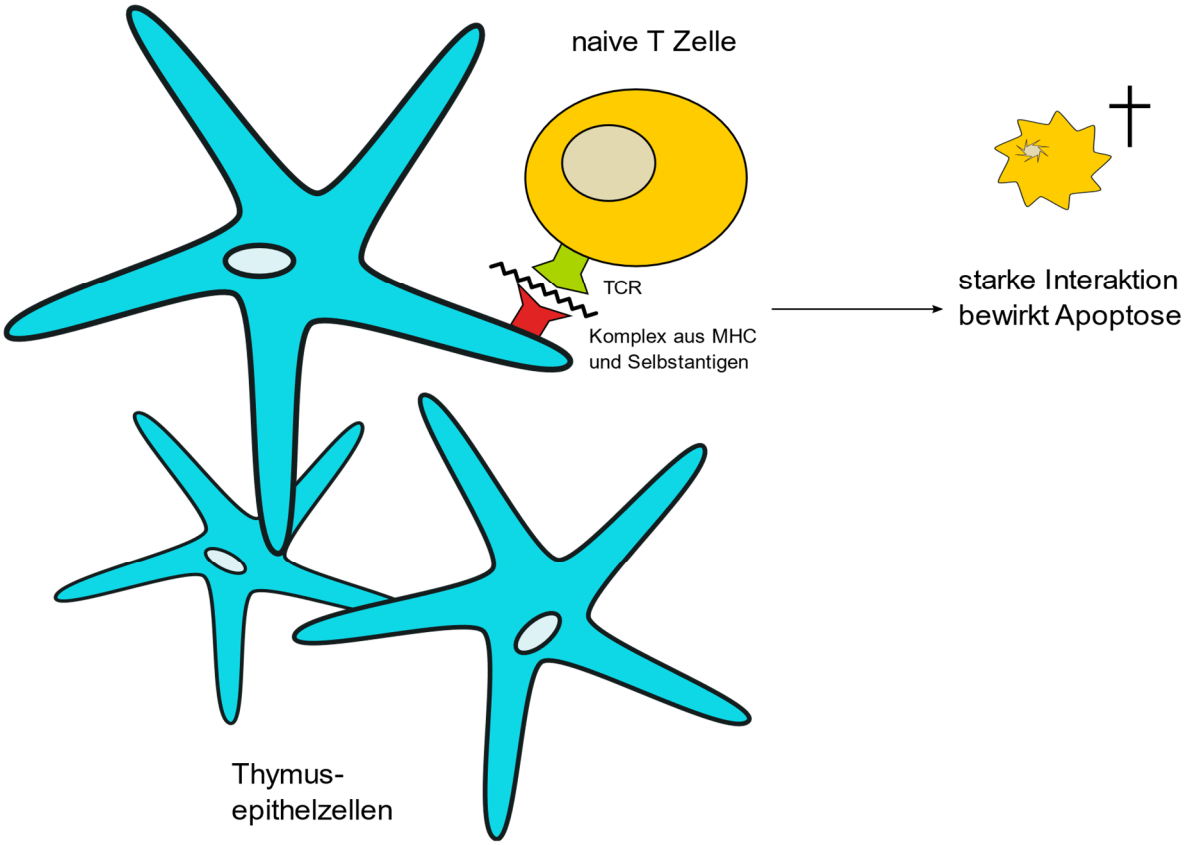


Abbildung 1.3: Toleranzinduktion im Thymus

Erkennt die naive T Zelle den Komplex aus MHC und Selbstantigen mit hoher Avidität, wird ihre Apoptose induziert. Auf diese Weise wird die Entstehung autoreaktiver T Zell-Klone verhindert.

Dieser Prozess induziert die sogenannte zentrale Toleranz, doch auch für die Aufrechterhaltung peripherer Lymphozyten sind solche Liganden bedeutsam (116). Überleben hierbei autoreaktive Zellen, weil im Thymus nur geringe Mengen Antigen vorhanden sind, und treffen diese dann im Zielorgan auf größere Mengen Antigen als im Thymus, können sie zur Entstehung von Autoimmunerkrankungen beitragen (110,117). Ein weiterer Faktor, der hierzu beitragen könnte, ist die oben diskutierte veränderte Bindungstopologie autoreaktiver T Zell-pMHC-Komplexe (112,118).

Mechanismen der peripheren Toleranz stellen Anergie, Deletion sowie die Suppression durch regulatorische Zellpopulationen dar (60).

Anergie bezeichnet das Ausbleiben von Proliferation und Sekretion proinflammatorischer Zytokine nach Stimulation mit einem spezifischen Antigen. Dieser Zustand kann jedoch reversibel sein und beispielsweise durch exogene Zufuhr von IL-2 beendet werden. Anergie wird durch submitogene Antigenexposition bei Fehlen kostimulatorischer Signale induziert (119). Dies kann der Entstehung von

Autoimmunität vorbeugen (120). Ferner wurde beschrieben, dass autoreaktive Zellklone im Gesunden deletiert werden oder sich aus den anergen Populationen T_{reg} weiterentwickeln (120,121). Wesentliche Funktionen regulatorischer T Zellen wurden bereits oben beschrieben.

1.6.4 Autoantigene der MS

Die Immunreaktion im Rahmen der MS richtet sich gegen Bestandteile von Myelin, aber auch gegen neuronale und astrozytäre Antigene (43). Myelinbasicprotein (MBP) ist nur eines von vielen möglichen Autoantigenen bei der Immunantwort im Rahmen einer MS. Weitere bisher beschriebene Ziele der fehlgeleiteten Immunantwort können Proteolipidprotein (PLP), Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein (MOG) sowie weitere Myelin assoziierte, aber auch neuronale und astrozytäre Proteine sein (4,43).

Die drei in der vorliegenden Arbeit untersuchten Autoantigene $EGFS_{SVSNVVITK}$, nM6-$b_{TTYNYAVLK}$ und $PLP_{ATYNFAVLK}$ waren erst kürzlich als solche identifiziert worden. Sie waren aus Hirngewebe von drei an MS erkrankten und HLA-DR15 positiven Personen isoliert worden und hatten im IFN-γ und IL-17A ELISpot eine erhöhte Zahl Zytokin sezernierender Zellen hervorgerufen (122).

Die Sequenz SVSNVVITK ($EGFS_{SVSNVVITK}$) ist beim Menschen Teil des Epidermal growth factor receptor substrate 15, kurz Protein Eps15. Es existieren zwei Isoformen, die durch alternatives Splicing entstehen. Die hier untersuchte Sequenz kommt in beiden vor (123). Protein Eps15 wird ubiquitär exprimiert, das zugehörige Gen Eps15 liegt auf Chromosom 1 (124). Es reguliert das Zellwachstum, indem es die Endozytose des Wachstumsfaktor-Rezeptors bewirkt (125). Protein Eps15 kommt im Zytoplasma und auf der Zellmembran vor, wohin es nach EGFR-Aktivierung rekrutiert wird und sich an der Bildung von Clathrin coated pits und der nachfolgenden Endozytose beteiligt (123,126).

Neuronal mebrane glycoprotein M6-b (M6b), welches die Sequenz TTYNYAVLK (nM6-$b_{TTYNYAVLK}$) beinhaltet, gehört als neuronales Membran-Glycoprotein zur PLP-Familie. Es sind vier Isoformen bekannt, wobei die untersuchte Sequenz TTYNYAVLK in dreien vorkommt. Unter anderem findet es sich auf Neuronen und Oligodendrozyten. Dort ist es Teil der Zellmembran, welche es mehrfach durchspannt (127,128). Das Gen GPM6B liegt auf dem X-Chromosom (129). M6b ist als Bindungspartner von SERT für

die Regulation der Serotoninaufnahme aus dem synaptischen Spalt mitverantwortlich. Eine Koexpression beider Moleküle führt zu einer verminderten Aufnahme, da weniger SERT an die Zelloberfläche gelangt (128). Zudem ist M6b an der Neurogenese, der Organisation des Zytoskeletts und Strukturbildung der extrazellulären Matrix beteiligt (127,129).

ATYNFAVLK ($PLP_{ATYNFAVLK}$) schließlich gehört zu Myelin proteolipid protein (PLP), dem Hauptbestandteil des Myelins und bekanntem Autoantigen der MS. Auch hier existieren zwei Isoformen: full-length PLP und das etwas kürzere DM20, welche durch alternatives Splicing entstehen. Beide enthalten die untersuchte Sequenz (43,130,131). Während full-length PLP fast ausschließlich im ZNS vorkommt, findet sich DM20 auch peripher, unter anderem im Thymus und in Lymphknoten, wo es die negative Selektion autoreaktiver Lymphozyten auslöst (132,133). Das Gen PLP1 besteht aus sieben Exons und sechs Introns und liegt auf dem X-Chromosom (134). PLP ist das häufigste und wichtigste Transmembranprotein im Myelin des ZNS. Innerhalb der Zellmembran besitzt es zwei Transmembrandomänen sowie einen großen extrazellulären Anteil. In Kolokalisation mit SIRT2 findet es sich in den internodalen Regionen, paranodalen axoglialen Junktionen und Schmidt-Lantermann-Inzisuren. Durch Wechselwirkung zwischen benachbarten PLP-Molekülen werden die Myelinlamelllen verdichtet und zusammengehalten (130,135). Mutationen und Splicedefekte in PLP1 verursachen eine schwere hypomyelinisierende Störung, die Pelizaeus-Merzbacher Krankheit (136). Warshawsky et al. haben den Fall einer an PP-MS erkrankten Frau beschrieben, deren Sohn an der Pelizaeus-Merzbacher Krankheit verstorben war. Bei Mutter und Sohn ließ sich eine Mutation im PLP1 Gen nachweisen, sodass spekuliert wurde, dass sich eine solche Mutation im Erwachsenenalter als PP-MS manifestieren könnte (137). Röntgenkristallografisch konnte die Struktur des HLA-A*0301 (HLA-A3) gebundenen PLP-Epitops KLIETYFSK aufgelöst werden. Dies führte zur Einstufung des MHC I Moleküls HLA-A3 als für MS prädisponierendes Allel, zumal HLA-A2 im Gegensatz vor der Erkrankung schützt (138). Abbildung 1.4 zeigt schematisch die Lage von KLIETYFSK und des in dieser Arbeit untersuchten Peptids ATYNFAVLK ($PLP_{ATYNFAVLK}$) sowie die Entstehung von DM 20 durch alternatives Splicing.

Abbildung 1.4: PLP und DM 20

Die Abbildung zeigt schematisch die Lage des in dieser Arbeit untersuchten Peptids ATYNFAVLK ($PLP_{ATYNFAVLK}$) und von KLIETYFSK innerhalb von PLP. Das kürzere DM 20 entsteht durch alternatives Splicing durch Entfernung der Aminosäuren (AS) 117-151.

1.7 Therapie

Es existiert ein breites Spektrum an Therapeutika, die den Krankheitsverlauf der MS günstig beeinflussen können. Die individuelle Therapieentscheidung hängt unter anderem von Krankheitsaktivität und Komorbiditäten des Patienten sowie Verträglichkeit, Familienplanung und vielen weiteren Faktoren ab. Bei einem akuten Schub werden Glukokortikoide zunächst für wenige Tage intravenös und sehr hoch dosiert, später in niedrigerer Dosierung oral gegeben. Diese wirken gleichzeitig antiinflammatorisch und immunsuppressiv (139). Eine weitere Möglichkeit besteht in einer Plasmapherese (140). Längerfristig kann versucht werden, die Schubrate mittels sogenannter disease modifying drugs zu reduzieren. Viele der etablierten MS Therapeutika greifen dabei direkt oder indirekt an den T Zellen des Patienten an. Alemtuzumab und Natalizumab richten sich beispielsweise gegen spezifische Oberflächenstrukturen oder Signalwege (141). Bei Alemtuzumab handelt es sich um einen monoklonalen Antikörper gegen das Oberflächenprotein CD52 auf $CD4^+$ und $CD8^+$ T Zellen, B Zellen und Monozyten. Vermittelt durch Antikörper und das Komplementsystem bewirkt er eine Depletion der entsprechenden Zellpopulationen. Im Rahmen der Regeneration des Immunsystems erscheinen zuerst wieder die regulatorischen Zellgruppen, was den immunmodulatorischen Effekt von Alemtuzumab begründet (142). Natalizumab verhindert die Interaktion zwischen α4-Integrin (VLA-4, very late antigen 4) und Adhäsionsproteinen auf Endothelzellen, sodass die T Lymphozyten nicht mehr in der Lage sind, die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden. Eine Therapie mit Natalizumab birgt das seltene, jedoch schwerwiegende Risiko der Entwicklung einer Progressiven Multifokalen Leukenzephalopathie bedingt durch die Reaktivierung von JC-Virus (143). Therapieansätze, welche an den B Zellen

angreifen, umfassen Rituximab, einem monoklonalen Antikörper, welcher $CD20^+$ B Zellen depletiert, sowie Ocrelizumab und Ofatumumab, die ebenfalls spezifisch für CD20 sind und zu einer Komplement- und Antikörper-vermittelten Lyse der B Zellen führen. Im Gegensatz zu Rituximab ist Ocrelizumab ein humanisierter Antikörper, der weniger immunogen ist. Ofatumumab bindet ein anderes Epitop als Rituximab und Ocrelizumab und besitzt eine größere Affinität zu CD20 (144).
Einen breiteren immunmodulatorischen Effekt haben IFN-β 1a/b und Glatirameracetat. Sie beinflussen Zytokinprofile und verschieben das Gleichgewicht hin zur antiinflammatorischen Seite. Auch Dimethylfumarat wirkt auf ähnliche Weise antiinflammatorisch und bewirkt eine Reduktion von $CD4^+$ und $CD8^+$ T Zellen. Mitoxantron wirkt breit antiproliferativ auf T Zellen, B Zellen und Makrophagen, ebenso wie Teriflunomid und Cladribin (141,145). Fingolimod behindert die Migration von Lymphozyten aus Lymphknoten, indem es mit dem Spingosin-1-Phosphat-Rezeptor interagiert (141). Auch das im März 2020 von der FDA in den USA zugelassene Ozanimod wirkt als Sphingosin-1-Phosphat Rezeptor Modulator (146).
Des Weiteren befindet sich eine Reihe neuer immunmodulatorischer Therapien zum Teil noch in sehr frühen Phasen der Entwicklung, zum Teil aber auch schon in Phasen, welche den Einsatz an Patienten testen. Diese Ansätze umfassen Stammzelltransplantationen, DNA-Vakzine, welche für MBP codieren, mit MOG_{35-55} und rekombinantem IL-10 beladene Nanopartikel, Altered Peptide Ligands (APL), welche dem nativen Peptid sehr ähnlich sind und mit dessen Bindung interagieren sollen, zyklische Peptide und Mannan, welches den Mannoserezeptor auf dendritischen Zellen sowie den Toll-like Rezeptor 4 bindet und immunmodulatorische Eigenschaften besitzt (140).

1.8 Fragestellung

Die MS ist eine entzündliche Erkrankung des ZNS, deren Entstehung durch autoimmune Prozesse mit bedingt wird (4). In den letzten Jahren konnten zwar zahlreiche neue Erkenntnisse über die Pathogenese der Erkrankung gewonnen werden, jedoch bleibt auch noch Vieles unklar. Ein besseres Verständnis für die molekularen Mechanismen, welche an der Entstehung der MS beteiligt sind, kann neue Therapieoptionen aufzeigen.

Vor allem T Zellen sind schon seit längerem in den Mittelpunkt des wissenschaftlichen Interesses gerückt (147,148). Erst kürzlich wurden neue Peptide, welche im ZNS von an MS erkrankten Patienten als Autoantigene präsentiert und von T Zellen erkannt werden, entdeckt (122,149). T Zellen erkennen keine nativen Proteine, sondern benötigen die Mithilfe von APCs, welche die Aufgaben der Prozessierung und Präsentation des Antigens auf MHC wahrnehmen. Auf MHC I gelangen dabei überwiegend Bruchstücke intrazellulärer Proteine. Im ER binden diese Peptide an MHC I und werden so zur Plasmamembran transportiert (90–92). MHC II hingegen präsentiert extrazelluläre Antigene, welche beispielsweise von dendritischen Zellen aufgenommen wurden (93). Strukturelle Analysen aus den 1990er Jahren haben gezeigt, dass die spezifische Interaktion zwischen dem Komplex aus Peptid und MHC Molekül sowie dem TCR die Entstehung der MS mit bedingt (89). Die besondere Bedeutung von MHC wird nochmals dadurch bekräftigt, dass unter anderem das wichtigste und zuerst entdeckte Risikoallel HLA-DRB1*1501 für ein MHC Molekül codiert (10,39).

In der vorliegenden Arbeit soll nun untersucht werden, welche MHC-Klassen an der Präsentation der Autoantigene beteiligt sind, indem eine Blockade der MHC-Moleküle mit spezifischen Antikörpern gegen HLA-A,B,C, HLA-DP/DR/DQ, HLA-DR und HLA-DQ bewirkt werden soll. Hierfür soll die Immunantwort gegen drei kürzlich entdeckte Autoantigene untersucht werden: $EGFS_{SVSNVVITK}$, nM6-$b_{TTYNYAVLK}$ und $PLP_{ATYNFAVLK}$. Die Stimulation von PBMCs mit diesen Peptiden hatte im IFN-γ und IL-17A ELISpot eine erhöhte Zahl Zytokin sezernierender Zellen bei Patienten und Kontrollpersonen bewirkt (122). Weiterhin stellt sich die Frage, ob der genetische Hintergrund die Reaktivität von T Zellen in verschiedenen Krankheitsphasen beeinflusst und ob sich die Blockade der Immunantwort mittels spezifischer Antikörper bei Trägern eines Risikoallels von der von Nicht-Trägern unterscheidet. Hier soll beispielhaft HLA-DRB1*1501, das zuerst entdeckte und wichtigste Risikoallel, betrachtet werden (10).

2. Material und Methoden

2.1 Materialien

Eine Liste aller verwendeten Verbrauchsmaterialien, Reagenzien und Geräte findet sich im Anhang.

2.2 Auswahl der Patienten und Kontrollpersonen

Insgesamt wurden 41 Proben von an MS erkrankten Patienten ausgewählt, darunter 12 von Männern und 29 von Frauen. Dies bildet das reale Geschlechterverhältnis der Erkrankung ab, welches in der Literatur mit 1,5 – 3,0 angegeben wird (9). Die Patienten befanden sich zum Zwecke diagnostischer und therapeutischer Maßnahmen an der Klinik und Poliklinik für Neurologie der Universität Regensburg am Bezirksklinikum Regensburg. Die Diagnosestellung erfolgte nach den revidierten McDonald Kriterien von 2010 anhand klinischer und radiologischer Befunde (7,150). Als aktiv wurden Patienten im akuten Schub klassifiziert, was wiederum anhand der klinischen Symptomatik und des Befundes im MRT festgelegt wurde. Demgegenüber stand die Gruppe der in Remission befindlichen Patienten (151). Die meisten Patienten litten außer an einer MS an keiner weiteren Erkrankung. Außerdem wurden noch 12 gesunde Kontrollpersonen – davon 4 Männer und 7 Frauen – in die Studie eingeschlossen. Alle verwendeten Blutproben wurden zwischen 2013 und 2017 gesammelt. Bei den aktiven Patienten wurde darauf geachtet, das Material vor Beginn der Kortisonstoßtherapie zu gewinnen, was bis auf zwei Ausnahmen gelang. Tabelle 2.1 zeigt eine deskriptive Statistik über alle Studienteilnehmer, Tabelle 6.1 im Anhang weitere Charakteristika der einzelnen Studienteilnehmer.

Tabelle 2.1: Deskriptive Statistik aller Studienteilnehmer

Die Werte sind als Mittelwert ± Standardabweichung angegeben, [1] EDSS zum Zeitpunkt der Probenentnahme.

	MS Patienten			**Kontrollpersonen (n = 11)**
	alle Patienten (n = 41)	**aktiv (n = 18)**	**Remission (nicht aktiv) (n = 23)**	
Alter (in Jahren)	37,49 ± 12,93 SD (19 – 68)	41,39 ± 12,93 SD (22 – 68)	34,43 ± 12,36 SD (19 – 64)	30,82 ± 12,29 SD (18 – 50)
Geschlecht (m:w)	12:29	6:12	6:17	4:7
HLA-DRB1*1501 (positiv:negativ)	20:21	9:9	11:12	4:7
Krankheitsdauer (in Jahren)	6,26 ± 7,93 SD (3 Wochen – 34 Jahre)	8,639 ± 9,82 SD (3 Wochen – 34 Jahre)	4,46 ± 5,74 SD (1 Monat– 20 Jahre)	
EDSS[1]	1,974 ± 1,99 SD (0 – 8)	2,806 ± 2,01 SD (1 – 8)	1,262 ± 1,71 SD (0 – 6,5)	

Für die Versuche, bei denen die MHC-Restriktion der Peptide mittels Blockade durch spezifische Antikörper untersucht werden sollte, wurden bevorzugt Zellen von Patienten und Kontrollpersonen verwendet, bei denen die Stimulation mit den Peptiden EGFS$_{SVSNVVITK}$, nM6-b$_{TTYNYAVLK}$ und PLP$_{ATYNFAVLK}$ in vorangegangenen Experimenten mindestens eine Verdoppelung der Spot Counts im Vergleich zur DMSO Kontrolle bewirkt hatte.

Für die IFN-γ ELISpots wurden zunächst 18 Patienten ausgewählt, die in vorausgegangenen Experimenten oben genannte Bedingung erfüllten. Um den Stichprobenumfang noch zu vergrößern, wurden 19 weitere, bisher nicht getestete Personen daraufhin untersucht, ob durch Zugabe der zu untersuchenden Peptide eine Stimulation > 200 % erreicht werden konnte. Daraufhin wurden noch 9 Personen, welche dieses Kriterium erfüllt hatten, zusätzlich in die Studie eingeschlossen. Lediglich für die ersten beiden Versuche wurden, da die Methodik noch nicht sicher etabliert und die Anzahl eingefrorener Aliquots begrenzt war, noch nicht getestete Patienten herangezogen. Auch für die Titrationsversuche wurden bereits untersuchte Proben herangezogen. Lediglich von einer Probe waren nicht mehr genügend Aliquots vorhanden, sodass hier auf Proben der gleichen Person, welche zu einem früheren

Zeitpunkt abgenommen worden waren, zurückgegriffen wurde. Somit ergab sich schließlich ein Stichprobenumfang von 30 Patienten und Kontrollpersonen.

Für die IL-17A ELISpots wurden insgesamt 16 Patienten und Kontrollpersonen ausgewählt, die in vorangegangenen Experimenten mindestens eine Verdoppelung der Spot Counts im Vergleich zur DMSO-Kontrolle gezeigt hatten.

Tabelle 2.2 zeigt die deskriptive Statistik für die im IFN-γ ELISpot und Tabelle 2.3 für die im IL-17A ELISpot hinsichtlich der HLA-Restriktion untersuchten Personen.

Tabelle 2.2: Deskriptive Statistik aller im IFN-γ ELISpot untersuchten Personen

Die Werte sind als Mittelwert ± Standardabweichung angegeben, [1] EDSS zum Zeitpunkt der Probenentnahme

	MS Patienten			**Kontrollpersonen (n = 4)**
	alle Patienten (n = 26)	**aktiv (n = 11)**	**Remission (nicht aktiv) (n = 15)**	
Alter (in Jahren)	37 ± 12,45 SD (22 – 64)	41,36 ± 11,6 SD (22 – 58)	33,8 ± 12,43 SD (22 – 64)	28,75 ± 11,59 SD (21 – 46)
Geschlecht (m:w)	7:19	4:7	3:12	2:2
HLA-DRB1*1501 (positiv:negativ)	13:13	6:5	7:8	1:3
Krankheitsdauer (in Jahren)	6,231 ± 8,59 SD (3 Wochen – 34 Jahre)	8,266 ± 11,48 SD (3 Wochen – 34 Jahre)	4,923 ± 6,25 SD (1 Monat – 20 Jahre)	
EDSS[1]	1,88 ± 1,90 SD (0 – 6,5)	2,591 ± 1,69 SD (1 – 6,5)	1,321 ± 1,92 SD (0 – 6,5)	

Tabelle 2.3: Deskriptive Statistik aller im IL-17A ELISpot untersuchten Personen

Die Werte sind als Mittelwert ± Standardabweichung angegeben, [1] EDSS zum Zeitpunkt der Probenentnahme

	MS Patienten			**Kontrollpersonen (n = 4)**
	alle Patienten (n = 12)	**aktiv (n = 5)**	**Remission (nicht aktiv) (n = 7)**	
Alter (in Jahren)	40,42 ±11,95 SD (23 – 58)	43,8 ±13,88 SD (23 – 58)	38 ±10,82 SD (24 – 54)	33,5 ±16,84 SD (18 – 50)
Geschlecht (m:w)	4:8	2:3	2:5	1:3
HLA-DRB1*1501 (positiv:negativ)	6:6	2:3	4:3	1:3
Krankheitsdauer (in Jahren)	5,121 ±6,22 SD (3 Monate – 18 Jahre)	5,667 ±7,57 SD (6 Monate – 18 Jahre)	4,667 ±5,57 SD (3 Monate – 14 Jahre)	
EDSS[1]	1,955 ±1,25 SD (0 – 4,5)	2,2 ±1,40 SD (1 – 4,5)	1,75 ±1,21 SD (0 – 3,5)	

Tabelle 6.2 im Anhang gibt einen Überblick darüber, welche Proben im Einzelnen für welchen Versuch verwendet wurden.

Der Ethikantrag zu dieser Studie wurde von Prof. Dr. med. Dr. Robert Weißert gestellt und von der Ethikkommission der Universität unter der Nummer 12-101-0004 geprüft und anerkannt. Alle Probanden hatten vor der Blutentnahme schriftlich ihr Einverständnis erklärt. Die Versuche wurden im Einklang mit der Deklaration von Helsinki aus dem Jahr 1964 durchgeführt.

2.3 Isolierung und Einfrieren von mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMCs)

Für die Untersuchungen wurden PBMCs aus dem Blut von Patienten und Kontrollpersonen isoliert und eingefroren. Die hierfür verwendete Methode wurde durch Christine Riedhammer, Dagmar Halbritter und Robert Weißert bereits im Vorfeld entwickelt und beschrieben (152). Nach dem Prinzip der Dichtegradientenzentrifugation wurden die PBMCs zunächst von weiteren Bestandteilen des Blutes getrennt. Anschließend wurden die Zellen mehrfach gewaschen und in definierten Portionen eingefroren. Alle Materialien und Reagenzien,

die mit den Zellen in Kontakt kamen, mussten dabei steril und frei von Endotoxinen sein.

Zunächst wurden jeweils 30 ml des 1:3 mit PBS verdünnten Vollblutes auf 15 ml Lymphoprep-Lösung in vorbereiteten 50 ml Tubes geschichtet. Dabei wurde darauf geachtet, ein Vermischen der beiden Phasen in jedem Fall zu vermeiden. Anschließend wurden die Tubes für 25 Minuten bei 800 rpm und 21 °C zentrifugiert, wobei die Zentrifuge langsam beschleunigen und bremsen sollte, damit es nicht zu einer Zerstörung der entstehenden Gradienten kam. Mit einer Transferpipette wurde die wolkige Schicht, welche die PBMCs enthielt und sich oberhalb der Lymphoprep-Lösung bildete, abgenommen und in neue Tubes überführt. Dabei wurden jeweils die Zellen aus zwei Tubes in ein neues gegeben. Danach wurden die Tubes mit PBS aufgefüllt und für 10 min bei 1000 rpm und 4 °C mit ausgeschalteter Zentrifugenbremse zentrifugiert. Im nächsten Schritt wurde der Überstand abgegossen und die Zellpellets in RPMI Medium resuspendiert, wobei jeweils zwei oder drei der Tubes zu einem vereinigt wurden. Anschließend wurde erneut für 10 Minuten bei 1000 rpm und 4° C mit ausgeschalteter Zentrifugenbremse zentrifugiert. Nachdem der Überstand abgegossen war, wurde das Zellpellet in Zellmedium resuspendiert, wobei die verbliebenen Tubes zu einem vereinigt wurden. Nun konnten die Zellen mit Türk´scher Lösung gezählt und die gewünschte Endkonzentration festgelegt werden, in der die Zellen eingefroren werden sollten. Eine entsprechende Anzahl an Cryovials wurde vorbereitet und zur Zellsuspension noch so viel Zellmedium hinzugefügt, dass man das Doppelte der gewünschten Endkonzentration erhielt. In drei aufeinanderfolgenden Schritten im Abstand von ca. ein bis zwei Minuten wurde nun das gleiche Volumen Einfriermedium zugegeben und alles auf die Aliquots verteilt. Die Zellen wurden so schnell wie möglich bei -80 °C eingefroren und innerhalb weniger Tage in flüssigen Stickstoff bei -180 °C überführt.

Zusätzlich wurde bei jeder Aufreinigung noch ein RNA-Lysat aus $2x10^6$ Zellen hergestellt. Diese wurden aus der Zellsuspension entnommen, zweimal mit PBS gewaschen, durch Zugabe von 350 µl RLT-Puffer lysiert und bei -80 °C eingefroren. Ferner wurden von jedem Patienten EDTA-Blut bei -20 °C sowie Serumproben in flüssigem Stickstoff bei -180 °C eingefroren.

2.4 Auftauen von PBMCs

Auch das Auftauen der PBMCs wurde nach der Methode, welche von Christine Riedhammer, Dagmar Halbritter und Robert Weißert beschrieben wurde, durchgeführt (152). Die aufgetauten Zellen wurden unmittelbar in das gleiche Volumen Zellmedium überführt. Im Abstand von wenigen Minuten wurde noch zweimal das Ausgangsvolumen an Zellmedium zugegeben und für 10 min bei 1000 rpm und 21 °C mit ausgeschalteter Zentrifugenbremse zentrifugiert. Anschließend wurde in RPMI Medium resuspendiert und erneut zentrifugiert, wie oben beschrieben. Zum Schluss wurden die Zellen in Zellmedium resuspendiert und nach Färbung mit Trypanblau gezählt.

2.5 Herkunft und Auswahl der getesteten Peptide

Die in dieser Studie getesteten Peptide waren nach der von Fissolo et al. (153) beschriebenen Methodik aus den Gehirnen von drei verstorbenen Patienten mit MS eluiert und ihre Sequenz mittels Massenspektrometrie bestimmt worden. Mittels der Proteindatenbanken UniProt (154) und NCBI (155) wurden die entsprechenden Proteine identifiziert. Tabelle 6.3 im Anhang zeigt alle auf diese Weise eluierten Peptide. Diese wurden von Karl-Heinz Wiesmüller (EMC microcollections GmbH, Tübingen, Germany) synthetisiert, gereinigt und zur Verfügung gestellt. Die Peptide wurden gelöst in DMSO in einer Konzentration von 4 mg/ml bei -20 °C gelagert. Von allen eluierten Peptiden wurden drei für diese Studie ausgewählt, da sie in Vorarbeiten im ELISpot Assay besonders häufig eine Zytokinsekretion der PBMCs stimuliert hatten.

2.6 IFN-γ ELISpot Assay

Für die vorliegende Arbeit wurden Human IFN-γ ELISpot^{PRO} Kits der Firma MABTECH verwendet, wobei weitgehend nach der beiliegenden Gebrauchsanweisung vorgegangen wurde. Als Stimuli für den ELISpot Assay wurden drei verschiedene Peptide verwendet: EGFS$_{SVSNVVITK}$, nM6-b$_{TTYNYAVLK}$ und PLP$_{ATYNFAVLK}$. Die Peptide lagen während des Assay in einer Konzentration von 3 µg/ml vor. Auch für das Screening wurden die Peptide in einer Konzentration von 3 µg/ml verwendet. Für die Titrationsversuche wurden die Konzentrationen 0,3 µg/ml, 1 µg/ml, 3 µg/ml und 10 µg/ml eingesetzt. Die Positivkontrolle enthielt PHA in der Konzentration 3 µg/ml. Als

Negativkontrollen dienten Vertiefungen in den verwendeten Mikrotiterplatten (im Folgenden als „Wells“ bezeichnet), welche lediglich Zellmedium beziehungsweise Zellmedium und DMSO enthielten. DMSO wurde hierfür in der gleichen Konzentration, wie es auch in den Proben der Peptide mit 3 µg/ml enthalten war, mit Zellmedium verdünnt. Die Antikörper wurden in der Konzentration 1 µg/ml, später in 0,5 µg/ml eingesetzt. Für die Titrationsversuche wurden die Antikörper in Konzentrationen von 0,05 µg/ml, 0,1 µg/ml, 0,5 µg/ml und 1 µg/ml verwendet. Um den Einfluss der Antikörper alleine auf die IFN-γ-Sekretion zu testen, wurden Wells angelegt, welche lediglich Antikörper in der Konzentration 1 µg/ml, später in 0,5 µg/ml, enthielten. Pro Well wurden 200.000 Zellen in 100 µl Medium zugegeben. Die Konzentration von Zellen betrug also $2x10^6$/ml. Insgesamt wurde jedes Well dreimal angelegt, um später den Mittelwert aus diesen zu bilden.

Zunächst wurde die ELISpot Platte viermal mit sterilem PBS gewaschen und befeuchtet. Um anschließend unspezifische Proteinbindestellen zu blocken, wurde Zellmedium in die Wells gegeben und mindestens eine halbe Stunde dort belassen. Währenddessen wurden die Antikörper für das spätere Assay in sterilen Reaktionsgefäßen mit RPMI vorverdünnt. Für die Untersuchungen wurden fünf verschiedene Antikörper verwendet: Anti-human HLA-A,B,C, anti-HLA-DP/DR/DQ, anti-human HLA-DR und anti-human, anti-pig HLA-DQ gegen den jeweiligen MHC-Typ, sowie ein Kontrollantikörper. Nach der Vorbereitung der Antikörper wurden die benötigten Zellen nach oben beschriebenem Protokoll aufgetaut, gezählt und durch Zugabe von Zellmedium in die gewünschte Konzentration gebracht. Nun wurde das Zellmedium aus der ELISpot Platte entleert und in jedes Well 90 µl frisches Zellmedium vorgelegt. Danach wurden in die dafür vorgesehenen Wells 10 µl der vorbereiteten Antikörper sowie in jedes Well 100 µl der Zellsuspension gegeben. Es folgte eine eineinhalbstündige Inkubationszeit bei 37 °C. In dieser Zeit konnten die Stimuli, also die Peptide, PHA und DMSO, vorverdünnt werden.
Nach Ablauf der Inkubationszeit von eineinhalb Stunden wurden noch jeweils 20 µl der vorbereiteten Stimuli in die vorgesehenen Wells gegeben. Danach wurde die Platte für 48 h bei 37 °C und 5 % CO_2 erschütterungsfrei inkubiert.
Beim Screening wurden anstatt 90 µl Zellmedium 100 µl vorgelegt, anschließend 20 µl Stimuli und zuletzt 100 µl Zellsuspension hinzugefügt. Die eineinhalbstündige

Inkubationszeit mit den Antikörpern entfiel, die Platte wurde gleichfalls für 48 h bei 37 °C und 5 % CO_2 erschütterungsfrei inkubiert.
Nach Ende der Inkubation wurde die Platte fünfmal mit PBS gewaschen. Dann wurde 7-B6-ALP 1:200 in PBS + 0,5 % FBS verdünnt und 100 µl davon in jedes Well gegeben, gefolgt von einer zweistündigen Inkubation bei Raumtemperatur. Nun wurde wieder fünfmal mit PBS gewaschen bevor im letzten Schritt 100 µl der filtrierten Substratlösung BCIP/NBT-plus in jedes Well gegeben wurden. Die Entwicklung von Spots wurde 10 Minuten lang abgewartet und durch Spülen der Platte mit vollentsalztem Wasser gestoppt. Nach dem Trocknen der Platte konnten die Spots unter einem Stereomikroskop und mit Hilfe eines ELISpot-Readers gezählt werden. Die ELISpot-Platten wurden an einem dunklen Ort bei Raumtemperatur gelagert.

2.7 IL-17A ELISpot Assay

Es wurden Human IL-17A ELISpot^{PLUS} Kits der Firma MABTECH verwendet. Auch hier wurde nach der beiliegenden Gebrauchsanweisung vorgegangen. Zur Stimulation der Zellen wurden EGFS$_{SVSNVVITK}$, nM6-b$_{TTYNYAVLK}$ und PLP$_{ATYNFAVLK}$ eingesetzt, welche in Vorarbeiten auch im IL-17A ELISpot häufig eine gesteigerte Zytokinsekretion bewirkt hatten. Um die Titrierbarkeit der Reaktivitäten zu untersuchen, wurden die Peptide in Konzentrationen von 0,3 µg/ml, 1 µg/ml, 3 µg/ml und 10 µg/ml verdünnt. Alle verwendeten Antikörper wurden in der Konzentration 0,5 µg/ml gegen eine Peptidkonzentration von 3 µg/ml eingesetzt. Wie auch im IFN-γ ELISpot enthielt die Positivkontrolle PHA in der Konzentration 3 µg/ml. Die Negativkontrollen bestanden lediglich aus Zellmedium beziehungsweise Zellmedium und DMSO in der Konzentration 3 µg/ml. Pro Well wurden 200.000 Zellen in 100 µl Medium zugegeben. Die Konzentration von Zellen betrug also auch hier $2x10^6$/ml. Wiederum wurde jedes Well als Triplett angelegt.

Zunächst wurde die Platte fünfmal gewaschen, indem 200 µl PBS in jedes Well gegeben und wieder entleert wurden. Danach wurden 200 µl Zellmedium in jedes Well gegeben und mindestens eine halbe Stunde dort belassen, um unspezifische Bindungsstellen zu blocken. In der Zwischenzeit konnten die Antikörper in sterilen Reaktionsgefäßen mit RPMI vorverdünnt werden. Es wurden ein Kontrollantikörper sowie die zu untersuchenden Antikörper anti-human HLA-A,B,C, anti-HLA-DP/DR/DQ, anti-human HLA-DR und anti-human, anti-pig HLA-DQ eingesetzt.

Danach wurden die Zellen nach oben beschriebenem Protokoll aufgetaut, gezählt und in die gewünschte Konzentration gebracht. Nun wurde das Medium entfernt und in jedes Well 90 µl frisches Zellmedium vorgelegt. Anschließend wurde in die dafür vorgesehenen Wells 10 µl der vorbereiteten Antikörper und außerdem in jedes Well 100 µl der Zellsuspension entsprechend 200.000 Zellen gegeben. Der Kontrollantikörper sowie die zu untersuchenden Antikörper anti-human HLA-A,B,C, anti-HLA-DP/DR/DQ, anti-human HLA-DR und anti-human, anti-pig HLA-DQ wurden auch allein, also ohne Zugabe von Peptid, zur Zellsuspension gegeben, um einen möglichen Einfluss auf das Verhalten der Zellen zu testen. Die vier zu untersuchenden Antikörper wurden der Zellsuspension und den Peptiden hinzugefügt. Es folgte eine eineinhalbstündige Inkubationszeit bei 37°C. In dieser Zeit wurden die Stimuli, also die Peptide, PHA und DMSO, auf einer separaten sterilen Zellkulturplatte vorverdünnt. Anschließend wurden jeweils 20 µl der vorbereiteten Stimuli in die entsprechenden Wells gegeben und die Platte für 48 h bei 37 °C und 5 % CO_2 erschütterungsfrei inkubiert.

Nach Ende der Inkubation wurde die Platte wieder fünfmal mit PBS gewaschen, wie oben beschrieben. In der Folge wurde der Antikörper MT504-biotin mit PBS + 0,5 % FBS auf eine Konzentration von 0,5 µg/ml verdünnt, 100 µl in jedes Well gegeben und zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Ablauf dieser zwei Stunden wurde die Platte erneut fünfmal mit PBS gewaschen und Streptavidin-ALP im Verhältnis 1:1000 mit PBS + 0,5 % FBS verdünnt. Hiervon wurden wiederum 100 µl in jedes Well gegeben und eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Zum Schluss wurde die BCIP/NBT-plus Substratlösung filtriert, die Platte ein letztes Mal mit PBS gewaschen und 100 µl der Substratlösung in jedes Well gegeben. Die Entwicklung von Spots wurde abgewartet und durch Spülen mit vollentsalztem Wasser gestoppt. Nun wurde die Platte über Nacht getrocknet, bevor am nächsten Tag die Spots mit Hilfe eines Stereomikroskops und eines ELISpot Readers gezählt werden konnten.

2.8 Auswertung der ELISpot Platten

Zunächst wurden die fertigen Platten mit Hilfe eines Stereomikroskops ausgezählt. Dabei wurde eine 2,5-fache und bei Bedarf 4-fache Vergrößerung eingestellt. Die Zählung per Hand erlaubte ein sehr sensitives Zählen und eine gute Beurteilbarkeit einer unter Umständen wechselhaften Hintergrundaktivität.

Zusätzlich wurden die ELISpot Platten mit Hilfe eines ELISpot Readers eingelesen und mittels der dazugehörigen Software ausgewertet.

Ein Vergleich der beiden Methoden zeigte, dass bei der manuellen Zählung etwas mehr Punkte mitgezählt wurden, die Werte jedoch sehr gut miteinander korrelierten, sodass für prozentuale Veränderungen mit beiden Verfahren etwa die gleichen Ergebnisse erzielt wurden. Für die statistische Auswertung wurden die manuell gezählten Werte herangezogen, lediglich in der Positivkontrolle wurden die vom ELISpot Reader gezählten Werte eingesetzt. *TNTC* (too numerous to count) wurde hier durch den Wert 1300 ersetzt.

2.9 HLA-Typisierung

Die Information über den HLA-Typ der untersuchten Patienten wurde von Johanna Vollmayr zur Verfügung gestellt. Zur Aufbereitung der DNA aus EDTA-Vollblut wurde das innuPREP DNA Mini Kit (Analytik Jena) gemäß den Herstellerangaben verwendet. Wie zuvor von Goris et al. (156) beschrieben, wurde mittels Taqman PCR bestimmt, welche Personen homozygot, heterozygot oder negativ für das Allel HLA-DRB1*1501 sind.

2.10 Statistische Auswertung

Einfache statistische Berechnungen und erste Grafiken wurden mit Microsoft Excel (Microsoft® Office Excel® 2007) erstellt. Für die weiterführende Auswertung wurde die Software Graphpad Prism (Prism 7 for Windows, Version 7.03) verwendet. Befehle in Graphpad Prism werden im Folgenden kursiv geschrieben.

Alle weiteren Daten über die untersuchten Patienten wurden der Datenbank im Labor beziehungsweise den entsprechenden Arztbriefen entnommen. Diese Daten wurden in Tabellen der Software Microsoft Excel eingetragen und anschließend mit Graphpad Prism eine deskriptive Statistik erstellt, indem der Befehl *Analyze → Column Statistics* gewählt wurde.

Die mittels Stereomikroskop gezählten Werte wurden in Exceltabellen übertragen und aus den drei einzelnen Messwerten der Mittelwert berechnet. Wenn für eine Probe ein Wert mehr als dreimal gemessen wurde, wurden alle gemessenen Werte verwendet, um den Mittelwert zu berechnen, auch wenn sie bei verschiedenen Experimenten

ermittelt worden waren. Einige weitere Berechnungen wurden zusätzlich vorgenommen. Dies waren die DMSO korrigierten Mittelwerte, die sich durch Abzug des DMSO-Mittelwertes vom betreffenden Wert ergaben, die prozentuale Abweichung der Werte von der jeweiligen Negativkontrolle und dem jeweiligen DMSO-Mittelwert sowie die prozentuale Veränderung, welche sich durch Hinzufügen der Antikörper ergab. Diese Berechnungen dienten der Veranschaulichung und dem besseren Verständnis der Daten. Weder die prozentualen Veränderungen, noch die DMSO korrigierten Werte wurden für die weiteren Auswertungen verwendet, da sie verzerrend auf die Daten wirkten und somit in die Irre führen könnten. Außerdem ging die Information verloren, wie stark die Patienten absolut reagiert haben. Es wurden daher lediglich die nicht korrigierten Mittelwerte verwendet, um die peptidspezifische Reaktivität und die HLA-Restriktion der untersuchten Peptide zu betrachten.
Diese wurden in Tabellen der Software Graphpad Prism so eingetragen, dass die Spalten durch die gemessenen Variablen (also Negativkontrolle, DMSO, Antikörper usw.) und die Reihen durch jeweils einen gemessenen Patienten definiert waren und somit als Wiederholungen von Messungen interpretiert wurden. Aus numerischen Gründen wurden dabei alle Variablen mit dem Wert 0 durch $1x10^{-16}$ ersetzt.

Grafiken werden durch Graphpad Prism automatisch erstellt. Unter den zur Auswahl stehenden Optionen wurde ein Säulendiagramm mit Darstellung des Standard Error of the Mean (SEM) ausgewählt.
Zusätzlich wurden noch Scatter Plots erstellt, um die Verteilung der Daten darstellen zu können. Einige Variablen erschienen hier log-normal verteilt, andere jedoch nicht. Als Test auf Normalverteilung wurde der D`Agostino - Pearson omnibus normality test ausgewählt und alpha auf 0,05 festgelegt. Auch dieser bestätigte, was aufgrund der grafischen Darstellung schon zu vermuten war, nämlich, dass keine klare Aussage über die Verteilung der Daten getroffen werden kann. Ein Teil war normalverteilt, der andere nicht. Um zu überprüfen, ob sich eine einheitlichere Verteilung der Daten generieren ließe, wurde eine Transformierung mit log_{10} versucht und anschließend erneut die Scatter Plots gesichtet sowie auf Normalverteilung getestet. Dies geschah über den Befehl *Analyze* → *Transform*, Wählen der Option *Y`= Log(Y)* und anschließende Untersuchung der transformierten Daten mit dem D`Agostino - Pearson omnibus normality test. Da die Daten nach wie vor inhomogen verteilt blieben, wurde

die Entscheidung getroffen, die Daten in ihrer ursprünglichen Form zu belassen und stattdessen auf nicht-parametrische Tests zur weiteren Auswertung zurückzugreifen. Um mögliche Ausreißer zu identifizieren, wurden die ROUT-Methode und der Grubb´s test verwendet und die Ergebnisse miteinander verglichen. Wählt man *Analyze → Outliers*, öffnet sich in Graphpad Prism ein Fenster, in welchem man zwischen den beiden Tests wählen kann. Allein aufgrund der Testergebnisse ließe sich zwar rechtfertigen, die Patientin MS_10 auszuschließen, da sich bei ihr außergewöhnlich hohe Anzahlen an Spots fanden. Es wurde sich jedoch dagegen entschieden, überhaupt Werte auszuschließen, da die ungewöhnlich großen Werte einer log-normalen Verteilung geschuldet sein könnten und zudem die Studienpopulation insgesamt sehr klein war.

Zur Überprüfung möglicher Unterschiede zwischen den gemessenen Mittelwerten wurde der Kruskal-Wallis Test als nicht-parametrischer Test, gefolgt vom unkorrigierten Dunn Test (Uncorrected Dunn´s Test) herangezogen. Der Kruskal-Wallis Test wurde angewendet, da mehr als zwei Variablen verglichen werden sollten, eine Gauß`sche Verteilung der Daten nicht angenommen werden konnte und die Variablen unabhängig voneinander waren (157). Um den Test durchzuführen, wurde das Symbol *Compare three or more groups*, auf die Frage nach dem experimentellen Design *No matching or pairing* und auf die, ob eine Gauß`sche Verteilung angenommen werden soll *No. Use nonparametric test* gewählt. Daraufhin wurde der Kruskal-Wallis Test empfohlen. Das Signifikanzniveau wurde auf p = 0,05 festgelegt. Um die Zahl der post-hoc angestellten Vergleiche möglichst gering zu halten, wurde die Option *Compare the mean rank of each column with the mean rank of a control column* eingestellt und die gewünschte Vergleichsvariable gewählt. Auf eine Korrektur wegen multipler Mittelwertsvergleiche (beispielsweise nach Bonferroni) wurde dann verzichtet, da nur eine begrenzte Anzahl von Vergleichen pro Test durchgeführt wurde und diese von Anfang an geplant und somit Teil des experimentellen Designs waren. Wenn keine Korrektur durchgeführt wird, steigt die statistische Power des Tests. Kleine Unterschiede zwischen den Variablen können also leichter entdeckt werden. Allerdings steigt mit einer zunehmenden Zahl an Vergleichen auch die Gefahr vermeintliche Unterschiede zu entdecken, die in der Realität gar nicht vorliegen (158,159). Um den Uncorrected Dunn´s Test durchzuführen, wird bei *Multiple comparisons test* die Option *Don´t correct for multiple comparisons. Each comparison*

stands alone ausgewählt. Auch hier wurde das Signifikanzniveau auf p = 0,05 festgelegt.

Um die Zahl IFN-γ und IL-17A sezernierender Zellen in Abhängigkeit vom HLA-Typ zu betrachten, wurden die Reaktivitäten gegen die drei Peptide EGFS$_{SVSNVVITK}$, nM6-b$_{TTYNYAVLK}$ und PLP$_{ATYNFAVLK}$ gepoolt und für die zwei Gruppen der HLA-DRB1*1501-positiven und HLA-DRB1*1501-negativen Personen gegenübergestellt. Als HLA-DRB1*1501-positiv wurden dabei alle für dieses Allel homozygoten und heterozygoten Personen zusammengefasst. Die Gegenüberstellung wurde jeweils für alle im IFN-γ, sowie IL-17A ELISpot untersuchten aktiven und in Remission befindlichen Patienten und Kontrollpersonen durchgeführt. Zur Überprüfung signifikanter Unterschiede wurde der Mann-Whitney-U Test herangezogen. Einige Daten der peptidspezifischen Reaktivität wurden hier von Luise Schulze gemessen und zur Verfügung gestellt, sodass sich ein größerer Stichprobenumfang von insgesamt n = 97 im IFN-γ ELISpot und n = 46 im IL-17A ELISpot untersuchten Personen ergab. Außerdem sollte betrachtet werden, ob die MHC II Restriktion der gepoolten Reaktivität vom HLA-DRB1*1501 Haplotyp abhängig ist. Die gepoolte Reaktivität, sowie deren Blockade durch anti-HLA-DP/DR/DQ wurden zu diesem Zwecke für HLA-DRB1*1501-positive und -negative Personen aufgetragen. Um Unterschiede nach Zugabe des Antikörpers in den einzelnen Gruppen zu detektieren, wurde der Mann-Whitney-U Test durchgeführt.

3. Ergebnisse

Zur Beschreibung der Ergebnisse der statistischen Auswertung werden im Text nur die p-Werte angeführt, welche für das Verständnis der Ergebnisse von Interesse sind. Tabellen mit allen durchgeführten statistischen Tests und deren Ergebnissen finden sich im Anhang.

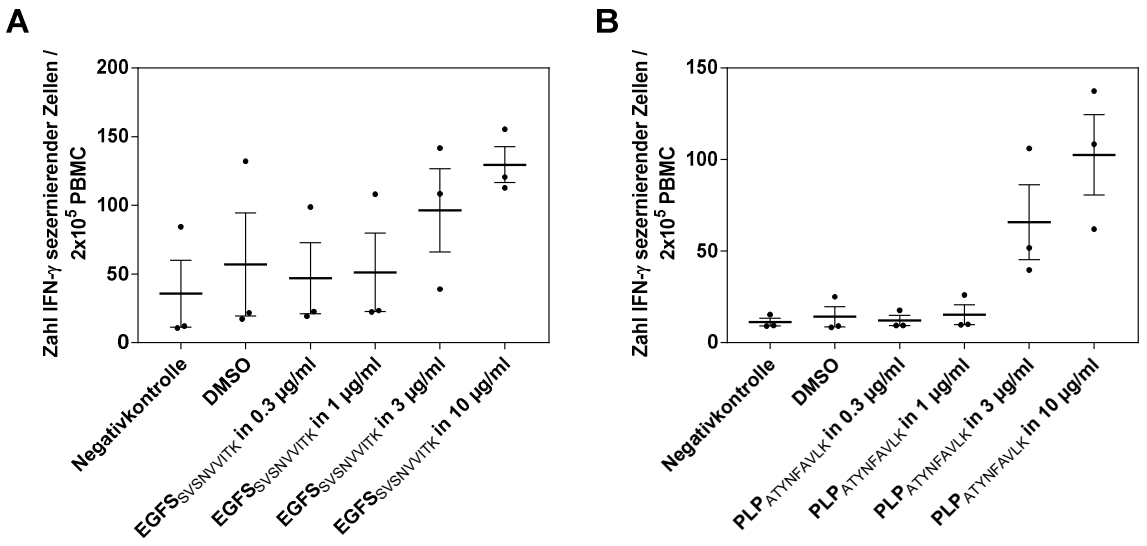
3.1 Screening

Tabelle 6.4 im Anhang gibt einen Überblick über die Personen, zu denen keine Voruntersuchungen vorlagen. Insgesamt wurden 19 Personen daraufhin untersucht, ob durch eines oder mehrere der drei Peptide EGFS$_{SVSNVVITK}$, nM6-b$_{TTYNYAVLK}$ und PLP$_{ATYNFAVLK}$ eine Zunahme der Spot Counts um mehr als 200 % im Vergleich zur DMSO Kontrolle bewirkt werden konnte. Daraufhin wurden 9 gescreente Personen in die Studie aufgenommen. Zwei Personen wurden ohne Screening eingeschlossen, bei einer von beiden war allerdings schon eine Probe, welche zu einem späteren Zeitpunkt abgenommen worden war, untersucht worden. Bei einer Person stellte sich nachträglich heraus, dass die Diagnose einer MS unklar war, weshalb sie von der Studie ausgeschlossen wurde.

3.2 Titrationsversuche im IFN-γ ELISpot

Nach den ersten Vorversuchen sollte herausgefunden werden, welches die optimale Konzentration von Peptiden und Antikörpern für den IFN-γ ELISpot ist. Ziel war es, eine Konzentration zu finden, in der sich ein deutlicher Unterschied zur Hintergrundaktivität zeigt und die aber nicht so groß ist, dass zu viel Material verschwendet würde oder dass der Effekt, den die Antikörper bewirken im Vergleich zu klein wäre und somit unterginge. Zu diesem Zweck wurden Titrationsversuche durchgeführt.

Grafik 3.1 zeigt die Titration von EGFS$_{SVSNVVITK}$ und PLP$_{ATYNFAVLK}$ im IFN-γ ELISpot. Mit steigender Konzentration der Peptide konnten bei allen drei untersuchten Proben steigende Spotzahlen gemessen werden. Eine Konzentration von 3 µg/ml erschien hinreichend, um eine gesteigerte Reaktivität klar von der DMSO Kontrolle differenzieren zu können.



Grafik 3.1: Titration von EGFSSVSNVVITK und PLPATYNFAVLK im IFN-γ ELISpot

Um herauszufinden, in welcher Konzentration EGFSSVSNVVITK (A) und PLPATYNFAVLK (B) eingesetzt werden sollten, um PBMCs von Patienten mit MS zu stimulieren, wurden die Peptide in Konzentrationen von 0,3 µg/ml, 1 µg/ml, 3 µg/ml und 10 µg/ml eingesetzt. Es wurde entschieden, die Peptide in der Konzentration 3 µg/ml zu verwenden, da hier ein deutlicher Unterschied zur DMSO-Kontrolle erkennbar war.

Des Weiteren wurde auch nach einer optimalen einzusetzenden Konzentration für die verwendeten Antikörper gesucht. Diese zeigten dabei ein heterogenes Verhalten (Grafik 6.1 im Anhang). Der Kontrollantikörper sowie anti-human HLA-A,B,C und anti-human HLA-DR beeinflussten die Anzahl der Spots im Vergleich zur peptidinduzierten Reaktivität kaum, unabhängig von der verwendeten Konzentration. Anti HLA-DP/DR/DQ führte zu einer konzentrationsabhängig stärker werdenden Verminderung der Spot Counts, während anti-human, anti-pig HLA-DQ lediglich in der höchsten Konzentration von 1 µg/ml die Zahl der IFN-g sezernierenden Zellen verminderte. Aufgrund dieser Beobachtungen wurde entschieden, die Antikörper für die folgenden Experimente in der Konzentration 0,5 µg/ml zu verwenden.

Für nM6-bTTYNYAVLK wurde im IFN-γ ELISpot ein einziger Titrationsversuch durchgeführt. Auch hier war eine steigende Anzahl von Spots mit steigender Konzentration von Peptid zu beobachten. Da es jedoch fraglich war, ob dieses Peptid im IFN-γ ELISpot überhaupt zu einer höheren Aktivierung der Zellen führte, wurde es

nach einigen wenigen Versuchen nicht weiter getestet. Grafik 6.2 im Anhang zeigt die Titration von nM6-$b_{TTYNYAVLK}$ sowie die Titration der Antikörper für dieses Peptid.

Die Tabellen 3.1 – 3.3 fassen die Ergebnisse der Titration von $EGFS_{SVSNVVITK}$, nM6-$b_{TTYNYAVLK}$ und $PLP_{ATYNFAVLK}$ im IFN-γ ELISpot zusammen.

Tabelle 3.1: Titration von $EGFS_{SVSNVVITK}$ im IFN-γ ELISpot

n = 3, die Daten sind als Mittelwerte ± Standardabweichung angegeben, der Prozentwert gibt das Verhältnis zur DMSO Kontrolle an.

	DMSO-Kontrolle	**$EGFS_{SVSNVVITK}$ in 0,3 µg/ml**	**$EGFS_{SVSNVVITK}$ in1 µg/ml**	**$EGFS_{SVSNVVITK}$ in 3 µg/ml**	**$EGFS_{SVSNVVITK}$ in 10 µg/ml**	**PHA**
Mittelwert ± SD	57 ± 64,99 SD	46,89 ± 44,87 SD	51,22 ± 49,17 SD	96,33 ± 52,37 SD	129,6 ± 22,68 SD	1244 ± 97,19 SD
Prozent	100,00%	82,26%	89,86%	169,00%	227,37%	

Tabelle 3.2: Titration von nM6-$b_{TTYNYAVLK}$ im IFN-γ ELISpot

n = 1, der Prozentwert gibt das Verhältnis zur DMSO Kontrolle an.

	DMSO-Kontrolle	**nM6-$b_{TTYNYAVLK}$ in 0,3 µg/ml**	**nM6-$b_{TTYNYAVLK}$ in 1 µg/ml**	**nM6-$b_{TTYNYAVLK}$ in 3 µg/ml**	**nM6-$b_{TTYNYAVLK}$ in 10 µg/ml**	**PHA**
Wert	24,33	21,00	17,00	29,33	44,00	798,67
Prozent	100,00%	86,30%	69,86%	120,55%	180,82%	

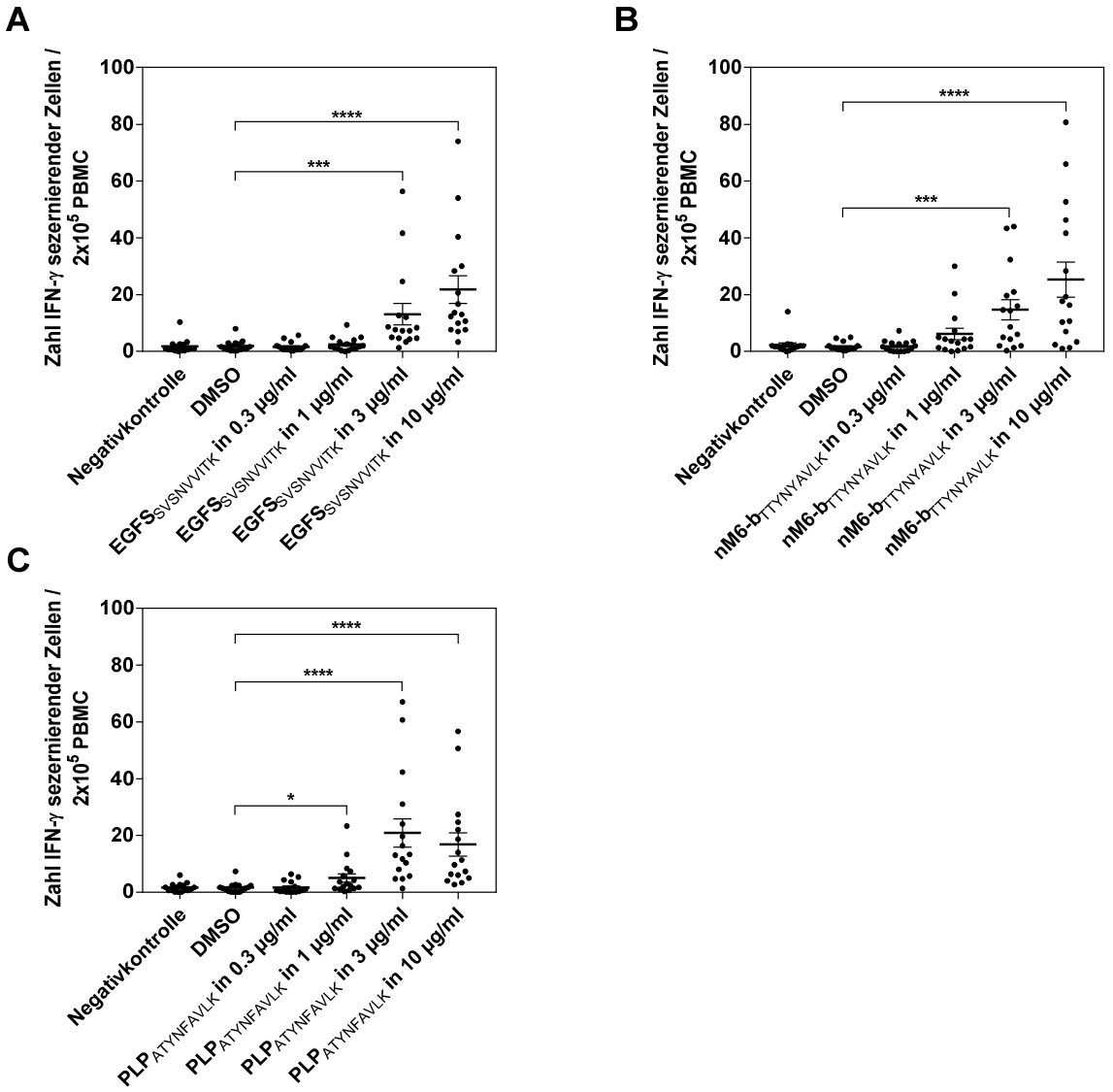
Tabelle 3.3: Titration von $PLP_{ATYNFAVLK}$ im IFN-γ ELISpot

n = 3, die Daten sind als Mittelwerte ± Standardabweichung angegeben, der Prozentwert gibt das Verhältnis zur DMSO Kontrolle an.

	DMSO-Kontrolle	**$PLP_{ATYNFAVLK}$ in 0,3 µg/ml**	**$PLP_{ATYNFAVLK}$ in1 µg/ml**	**$PLP_{ATYNFAVLK}$ in 3 µg/ml**	**$PLP_{ATYNFAVLK}$ in 10 µg/ml**	**PHA**
Mittelwert ± SD	14,11 ± 9,436 SD	12,11 ± 4,811 SD	15,22 ± 9,335 SD	65,78 ± 35,35 SD	102,6 ± 38,00 SD	1161 ± 224,2 SD
Prozent	100,00%	85,83%	107,87%	466,19%	727,14%	

3.3 Titrationsversuche im IL-17A ELISpot

Auch im IL-17A ELISpot wurde die dosisabhängige Antwort für EGFS$_{SVSNVVITK}$ nM6-b$_{TTYNYAVLK}$ und PLP$_{ATYNFAVLK}$ gemessen. Die nachfolgende Grafik 3.2 und die Tabellen 3.4 – 3.6 zeigen steigende Spotzahlen mit steigender Konzentration für alle drei Peptide. Ab einer Konzentration der eingesetzten Peptide von 3 µg/ml unterscheidet sich die Zahl IFN-γ produzierender Zellen signifikant von der DMSO Kontrolle. Dies war sowohl für EGFS$_{SVSNVVITK}$ (*Uncorrected Dunn`s test, p = 0,0001*), als auch für nM6-b$_{TTYNYAVLK}$ (*Uncorrected Dunn`s test, p = 0,0003*) und PLP$_{ATYNFAVLK}$ (*Uncorrected Dunn`s test, p < 0,0001*) zu beobachten war. Diese Konzentration ist somit besonders geeignet, um die peptidspezifische Reaktivität und deren Blockade mittels Antikörpern zu messen. Im Fall von EGFS$_{SVSNVVITK}$ und nM6-b$_{TTYNYAVLK}$ war die Zahl der Spot Counts im Vergleich zur DMSO-Kontrolle bei einer Konzentration von 10 µg/ml noch höher als bei einer Konzentration von 3 µg/ml. PLP$_{ATYNFAVLK}$ in einer Konzentration von 10 µg/ml bewirkte eine geringere Zahl IFN-γ sezernierender Zellen als in 3 µg/ml.



Grafik 3.2: Titration von EGFS$_{SVSNVVITK}$, nM6-b$_{TTYNYAVLK}$ und PLP$_{ATYNFAVLK}$ im IL-17A ELISpot

Um die optimale Konzentration von EGFS$_{SVSNVVITK}$ (A), nM6-b$_{TTYNYAVLK}$ (B) und PLP$_{ATYNFAVLK}$ (C) für den IL-17 A ELISpot Assay zu ermitteln und die die Konzentrationsabhängigkeit der Immunantwort zu untersuchen, wurden die Peptide in Konzentrationen von 0,3 µg/ml, 1 µg/ml, 3 µg/ml und 10 µg/ml eingesetzt. Die Grafik zeigt eine steigende Zahl von Spot Counts mit steigenden Dosen von Peptiden. Signifikante Unterschiede im Vergleich zur DMSO-Kontrolle sind durch Sterne gekennzeichnet (*Uncorrected Dunn`s test, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p \leq 0,0001$*).

Tabelle 3.4: Titration von EGFS$_{SVSNVVITK}$ im IL-17A ELISpot

n = 16, die Daten sind als Mittelwerte ± Standardabweichung angegeben, der Prozentwert gibt das Verhältnis zur DMSO Kontrolle an.

	DMSO-Kontrolle	**EGFS$_{SVSNVVITK}$ in 0,3 µg/ml**	**EGFS$_{SVSNVVITK}$ in1 µg/ml**	**EGFS$_{SVSNVVITK}$ in 3 µg/ml**	**EGFS$_{SVSNVVITK}$ in 10 µg/ml**	**PHA**
Mittelwert ± SD	1,938 ± 1,937 SD	1,646 ± 1,594 SD	2,479 ± 2,416 SD	13,13 ± 15,23 SD	21,83 ± 19,49 SD	171,7 ± 135,3 SD
Prozent	100,00%	84,93%	127,92%	**677,50%**	**1126,42%**	

Tabelle 3.5: Titration von nM6-b$_{TTYNYAVLK}$ im IL-17A ELISpot

n = 16, die Daten sind als Mittelwerte ± Standardabweichung angegeben, der Prozentwert gibt das Verhältnis zur DMSO Kontrolle an.

	DMSO-Kontrolle	**nM6-b$_{TTYNYAVLK}$ in 0,3 µg/ml**	**nM6-b$_{TTYNYAVLK}$ in 1 µg/ml**	**nM6-b$_{TTYNYAVLK}$ in 3 µg/ml**	**nM6-b$_{TTYNYAVLK}$ in 10 µg/ml**	**PHA**
Mittelwert ± SD	1,688 ± 1,473 SD	1,854 ± 1,996 SD	6,187 ± 8,168 SD	14,69 ± 14,32 SD	25,31 ± 24,92 SD	257,1 ± 187,6 SD
Prozent	100,00%	109,83%	366,53%	**870,26%**	**1499,41%**	

Tabelle 3.6: Titration von PLP$_{ATYNFAVLK}$ im IL-17A ELISpot

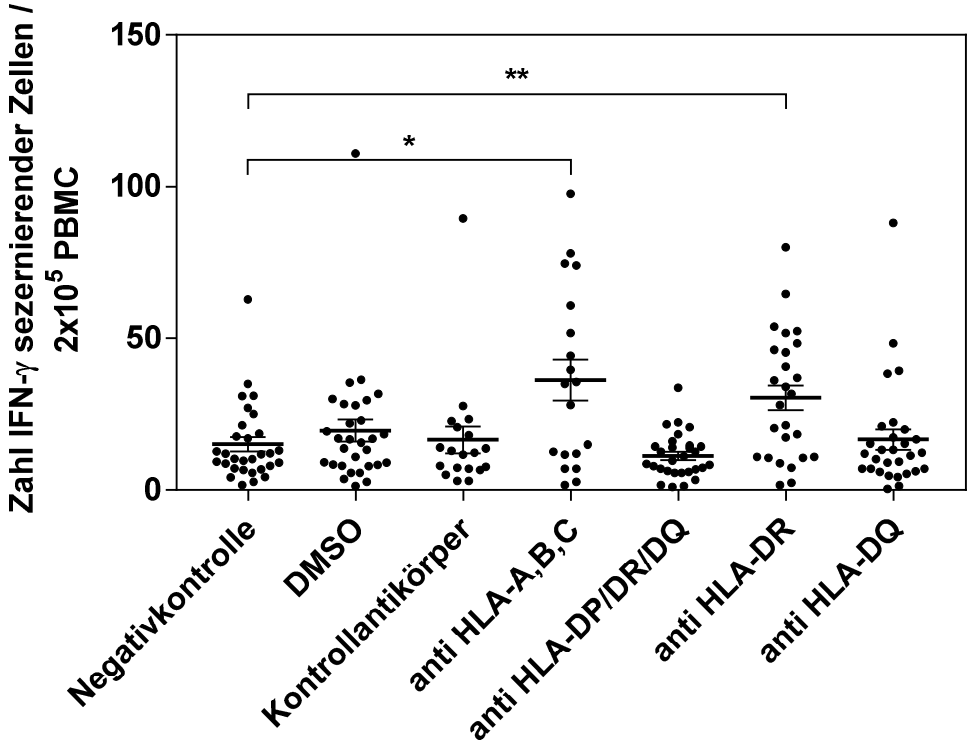
n = 16, die Daten sind als Mittelwerte ± Standardabweichung angegeben, der Prozentwert gibt das Verhältnis zur DMSO Kontrolle an.

	DMSO-Kontrolle	**PLP$_{ATYNFAVLK}$ in 0,3 µg/ml**	**PLP$_{ATYNFAVLK}$ in1 µg/ml**	**PLP$_{ATYNFAVLK}$ in 3 µg/ml**	**PLP$_{ATYNFAVLK}$ in 10 µg/ml**	**PHA**
Mittelwert ± SD	1,562 ± 1,804 SD	1,646 ± 2,089 SD	4,979 ± 5,997 SD	20,85 ± 19,87 SD	16,85 ± 16,39 SD	195,4 ± 155,1 SD
Prozent	100,00%	105,38%	**318,76%**	**1334,83%**	**1078,75%**	

3.4 Einfluss von DMSO und Antikörpern auf die Zahl Zytokin sezernierender Zellen im IFN-γ ELISpot

Um zu überprüfen, ob schon die Antikörper alleine einen Effekt auf die Zahl IFN-γ produzierender Zellen haben, wurden diese gemeinsam mit den Zellen inkubiert, ohne Peptid hinzuzugeben. Bei einigen Patienten zeigte sich eine deutliche Vermehrung von Spots im Vergleich zur Negativkontrolle nach Zugabe von anti-human HLA-A,B,C

sowie anti-human HLA-DR. Dieser Effekt trat allerdings nicht bei allen Proben auf, sodass die Antikörper weiterhin verwendet wurden. DMSO und die anderen Antikörper, insbesondere der Kontrollantikörper, hatten keinen signifikanten Einfluss auf die Zahl der IFN-γ sezernierenden Zellen. Grafik 3.3 und Tabelle 3.7 zeigen, welchen Einfluss DMSO und die getesteten Antikörper auf die Zahl der IFN-γ sezernierenden Zellen hatten.



Grafik 3.3: Einfluss von DMSO und Antikörpern auf die Zahl IFN-γ sezernierender Zellen

PBMCs wurden zusammen mit DMSO und den zu untersuchenden Antikörpern aber ohne Peptide inkubiert um einen direkten Einfluss auf die Zahl IFN-γ sezernierender Zellen zu betrachten. Signifikante Unterschiede im Vergleich zur Negativkontrolle sind durch Sterne gekennzeichnet (*Uncorrected Dunn`s test, * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001, **** p ≤ 0,0001*). Anti-human HLA-A,B,C und anti-human HLA-DR bewirken hier eine gesteigerte Reaktivität.

Tabelle 3.7: Einfluss von DMSO und Antikörpern im IFN-γ ELISpot

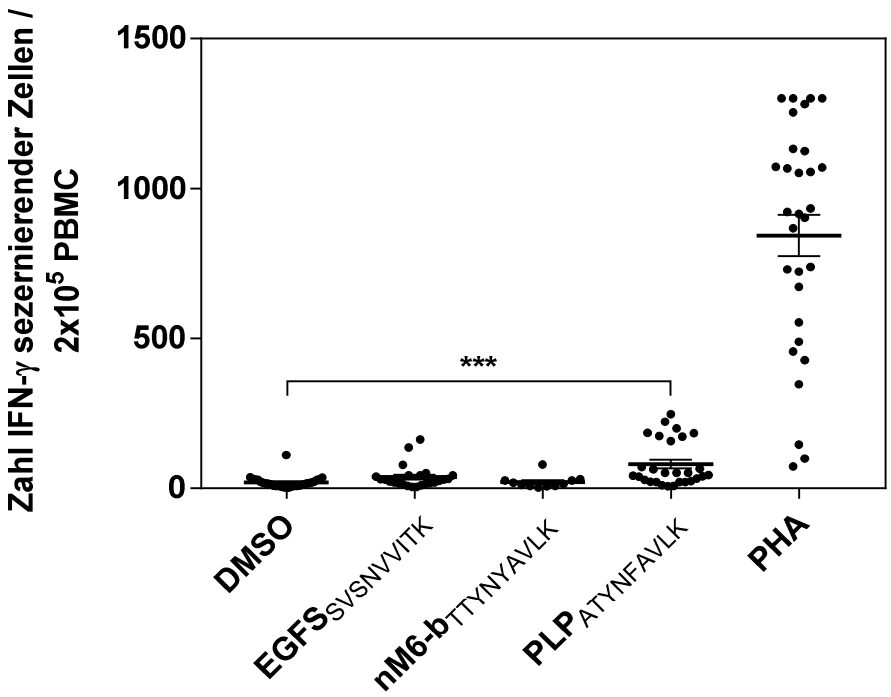
Die Daten sind als Mittelwerte ± Standardabweichung angegeben, der Prozentwert gibt das Verhältnis zur Negativkontrolle an.

	Negativ-kontrolle (n = 30)	**DMSO (n = 30)**	**Isotype Control (n = 19)**	**anti HLA-A,B,C (n = 19)**	**anti HLA-DP/DR/DQ (n = 29)**	**anti HLA-DR (n = 26)**	**anti HLA-DQ (n = 29)**
Mittelwert ± SD	15,09 ± 12,62 SD	19,55 ± 19,97 SD	16,54 ± 19,07 SD	36,27 ± 29,48 SD	11,28 ± 7,315 SD	30,42 ± 20,74 SD	16,62 ± 17,74 SD
Prozent	100,00%	129,56%	109,61%	**240,36%**	74,75%	**201,59%**	110,14%

3.5 Peptidspezifische Reaktivität im IFN-γ ELISpot

Im IFN-γ ELISpot wurde nach Zugabe von EGFS$_{SVSNVVITK}$ in der Konzentration 3 µg/ml eine gesteigerte Anzahl von Spots im Vergleich zur DMSO Kontrolle gemessen. Der Unterschied erreichte hier jedoch keine Signifikanz (*Uncorrected Dunn`s test, p = 0,0990*). nM6-b$_{TTYNYAVLK}$ veränderte in der Konzentration 3 µg/ml die Zahl IFN-γ sezernierender Zellen nicht. PLP$_{ATYNFAVLK}$ hingegen bewirkte in der Konzentration 3 µg/ml eine deutliche Zunahme der IFN-γ sezernierenden Zellen (*Uncorrected Dunn`s test, p = 0,0004*).

Grafik 3.4 und Tabelle 3.8 zeigen die peptidspezifische Reaktivität IFN-γ sezernierender Zellen im IFN-γ ELISpot.



Grafik 3.4: Peptidspezifische Reaktivität im IFN-γ ELISpot

Vermehrte Spot Counts im Vergleich zur DMSO-Kontrolle konnten für EGFS$_{SVSNVVITK}$ und PLP$_{ATYNFAVLK}$ in einer Konzentration von 3 µg/ml im IFN-γ ELISpot beobachtet werden. Signifikante Unterschiede im Vergleich zur DMSO-Kontrolle sind durch Sterne gekennzeichnet (*Uncorrected Dunn`s test, * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001, **** p ≤ 0,0001*).

Tabelle 3.8: Peptidspezifische Reaktivität im IFN-γ ELISpot

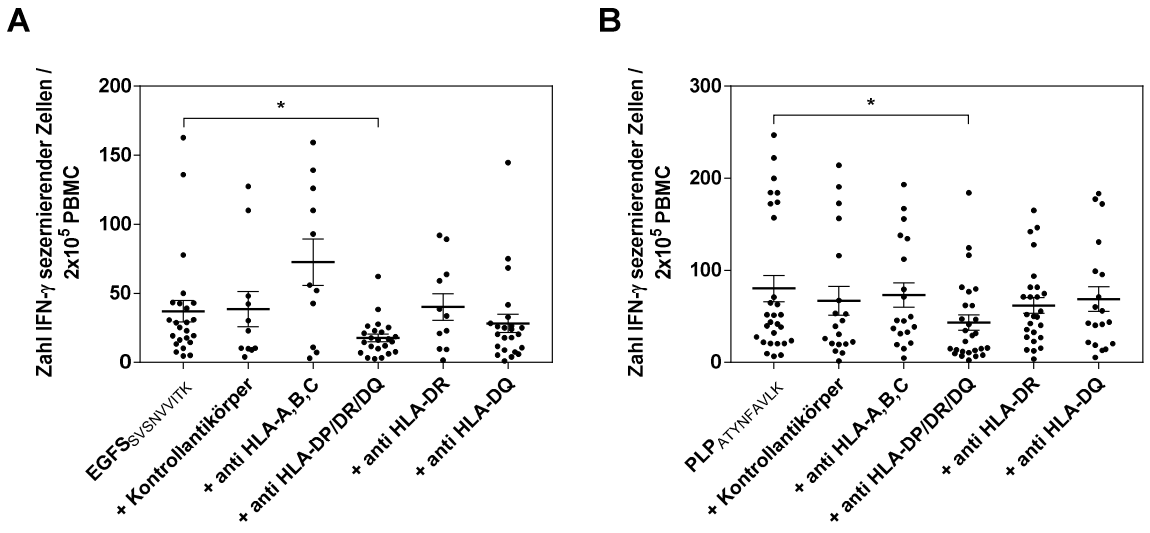
Die Daten sind als Mittelwerte ± Standardabweichung angegeben, der Prozentwert gibt das Verhältnis zur DMSO Kontrolle an.

	DMSO-Kontrolle (n = 30)	**EGFS$_{SVSNVVITK}$ in 3 µg/ml (n = 24)**	**nM6-b$_{TTYNYAVLK}$ in 3 µg/ml (n = 11)**	**PLP$_{ATYNFAVLK}$ in 3 µg/ml (n = 28)**	**PHA (n = 30)**
Mittelwert ± SD	19,55 ± 19,97 SD	37,09 ± 38,55 SD	20,76 ± 21,41 SD	80,3 ± 75,58 SD	843,2 ± 376,2 SD
Prozent	100,00%	189,72%	106,19%	**410,74%**	

3.6 HLA Restriktion im IFN-γ ELISpot

Im IFN-γ ELISpot konnte eine signifikante Reduktion der Reaktivität gegenüber EGFS$_{SVSNVVITK}$ (*Uncorrected Dunn`s test, p = 0.0290*) nach Zugabe von anti HLA-DP/DR/DQ nachgewiesen werden, was eine Beteiligung von MHC-II bei der

Präsentation von EGFSSVSNVVITK nahelegt. Anti-human HLA-A,B,C bewirkte tendenziell eine Erhöhung der beobachteten Spots, anti-human, anti-pig HLA-DQ verminderte deren Anzahl etwas, beide jedoch nicht signifikant. Durch den Kontrollantikörper, wie auch durch anti-human HLA-DR wurde die peptidspezifische Reaktivität nicht beeinflusst (Grafik 3.5 (A)). Auch bei der Untersuchung von PLPATYNFAVLK zeigte sich deutlich eine Reduktion der IFN-γ sezernierenden Zellen nach Zugabe von anti HLA-DP/DR/DQ (*Uncorrected Dunn`s test, p = 0.0321*), also eine MHC II Restriktion dieses Peptids. Nach Zugabe der anderen Antikörper veränderte sich die Zahl der Spots kaum bis gar nicht (Grafik 3.5 (B)).



Grafik 3.5: HLA-Restriktion von EGFSSVSNVVITK und PLPATYNFAVLK im IFN-γ ELISpot

PBMCs von 26 Patienten mit MS und 4 gesunden Kontrollpersonen wurden mit Peptiden und den zu untersuchenden Antikörpern gegen HLA koinkubiert. Sowohl für EGFSSVSNVVITK (A) als auch für PLPATYNFAVLK (B) zeigt sich eine MHC-II Restriktion. Signifikante Unterschiede im Vergleich zur peptidspezifischen Reaktivität sind durch Sterne gekennzeichnet (*Uncorrected Dunn`s test, * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001, **** p ≤ 0,0001*).

Tabelle 3.9 und 3.10 geben einen Überblick über die Veränderung der peptidspezifischen Reaktivität nach Zugabe der untersuchten Antikörper.

Tabelle 3.9: HLA-Restriktion von EGFS$_{SVSNVVITK}$ im IFN-γ ELISpot

Die Daten sind als Mittelwerte ± Standardabweichung angegeben, der Prozentwert gibt das Verhältnis zur peptidspezifischen Reaktivität ohne Zugabe von Antikörpern an.

	EGFS$_{SVSNVVITK}$ in 3 µg/ml (n = 24)					
		+ Isotype Control (n = 11)	**+ anti HLA-A,B,C (n = 11)**	**+ anti HLA-DP/DR/DQ (n = 23)**	**+ anti HLA-DR (n = 11)**	**+ anti HLA-DQ (n = 23)**
Mittelwert ± SD	37,09 ± 38,55 SD	38,62 ± 42,27 SD	72,66 ± 55,76 SD	17,8 ± 13,19 SD	40,09 ± 31,71 SD	28,22 ± 31,38 SD
Prozent	100,00%	104,13%	195,90%	**47,99%**	108,09%	76,09%

Tabelle 3.10: HLA-Restriktion von PLP$_{ATYNFAVLK}$ im IFN-γ ELISpot

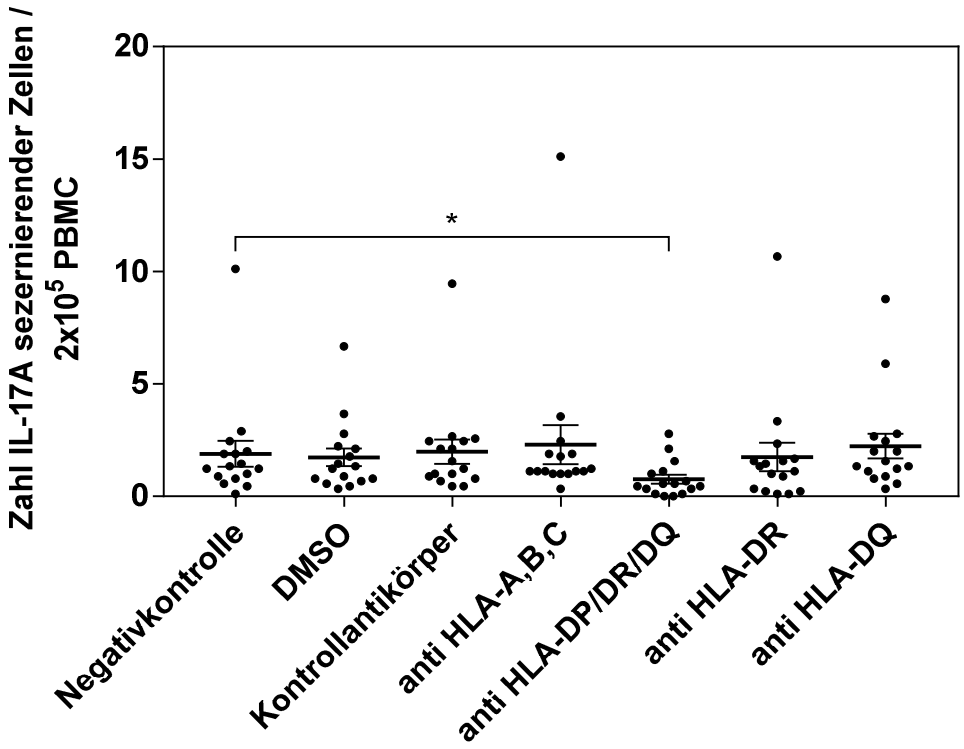
Die Daten sind als Mittelwerte ± Standardabweichung angegeben, der Prozentwert gibt das Verhältnis zur peptidspezifischen Reaktivität ohne Zugabe von Antikörpern an.

	PLP$_{ATYNFAVLK}$ in 3 µg/ml (n = 28)					
		+ Isotype Control (n = 19)	**+ anti HLA-A,B,C (n = 19)**	**+ anti HLA-DP/DR/DQ (n = 27)**	**+ anti HLA-DR (n = 26)**	**+ anti HLA-DQ (n = 19)**
Mittelwert ± SD	80,3 ± 75,58 SD	66,91 ± 67,55 SD	73,19 ± 58,27 SD	43,27 ± 43,89 SD	61,8 ± 43,71 SD	68,76 ± 58,36 SD
Prozent	100,00%	83,33%	91,15%	**53,89%**	76,96%	85,63%

Aus den Ergebnissen im IFN-γ ELISpot kann also geschlussfolgert werden, dass MHC II bei der Präsentation von EGFS$_{SVSNVVITK}$ und PLP$_{ATYNFAVLK}$ für IFN-γ produzierende Zellen beteiligt ist, wobei jedoch nicht klar spezifiziert werden kann, auf welchem Subtyp diese Präsentation erfolgt.

3.7 Einfluss von DMSO und Antikörpern auf die Zahl Zytokin sezernierender Zellen im IL-17A ELISpot

Grafik 3.6 und Tabelle 3.11 zeigen den Einfluss, welchen DMSO und Antikörper alleine auf die Zahl IL-17A sezernierender Zellen hatten. Anti HLA-DP/DR/DQ verminderte die Zahl IL-17A sezernierender Zellen im Vergleich zur Negativkontrolle, während weder DMSO noch die übrigen Antikörper hier eine Auswirkung hatten.



Grafik 3.6: Einfluss von DMSO und Antikörpern auf die Zahl IL-17A sezernierender Zellen

PBMCs wurden zusammen mit DMSO und den zu untersuchenden Antikörpern aber ohne Peptide inkubiert, um einen direkten Einfluss auf die Zahl IL-17A sezernierender Zellen zu betrachten. Signifikante Unterschiede im Vergleich zur Negativkontrolle sind durch Sterne gekennzeichnet (*Uncorrected Dunn`s test, * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001, **** p ≤ 0,0001*). Anti HLA-DP/DR/DQ vermindert hier die Zahl der Spot Counts.

Tabelle 3.11: Einfluss von DMSO und Antikörpern im IL-17A ELISpot

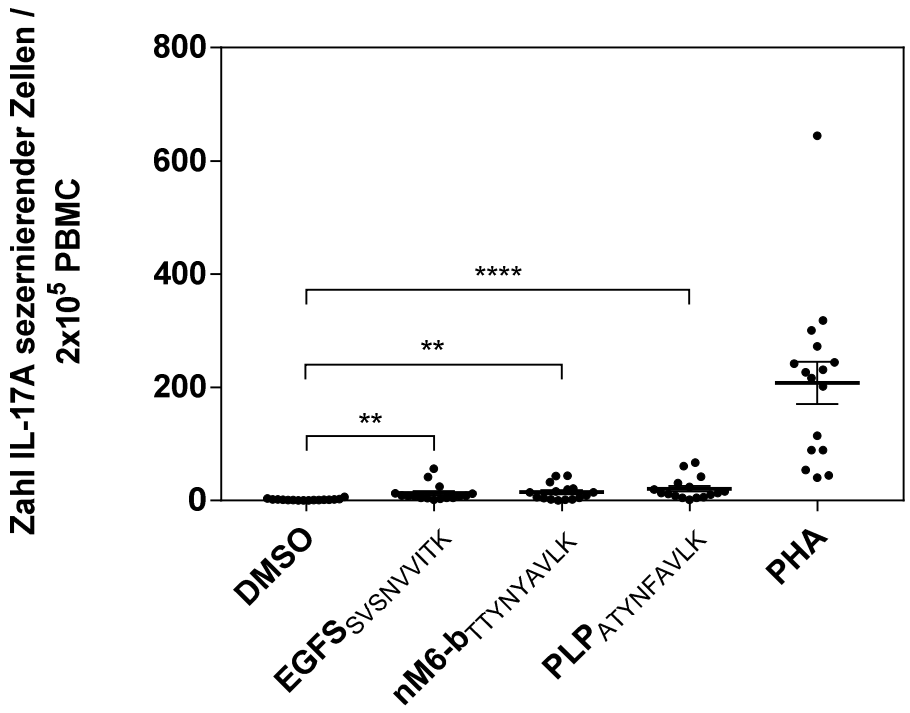
n = 16, die Daten sind als Mittelwerte ± Standardabweichung angegeben, der Prozentwert gibt das Verhältnis zur Negativkontrolle an.

	Negativ-kontrolle	**DMSO**	**Isotype Control**	**anti HLA-A,B,C**	**anti HLA-DP/DR/DQ**	**anti HLA-DR**	**anti HLA-DQ**
Mittelwert ± SD	1,889 ± 2,315 SD	1,729 ± 1,607 SD	1,986 ± 2,141 SD	2,299 ± 3,498 SD	0,7569 ± 0,7901 SD	1,743 ± 2,536 SD	2,229 ± 2,184 SD
Prozent	100,00%	91,53%	105,13%	121,70%	**40,07%**	92,27%	118,00%

3.8 Peptidspezifische Reaktivität im IL-17A ELISpot

Im IL-17A ELISpot war nach Zugabe der untersuchten Peptide in der Konzentration 3 µg/ml eine deutliche Zunahme der Zahl IL-17A sezernierender Zellen zu beobachten. Sowohl EGFS$_{SVSNVVITK}$ (*Uncorrected Dunn`s test, p = 0,0029*), als auch nM6-b$_{TTYNYAVLK}$ (*Uncorrected Dunn`s test, p = 0,0022*) und PLP$_{ATYNFAVLK}$ (*Uncorrected Dunn`s test, p < 0,0001*) stimulierten hier im Vergleich zur DMSO-Kontrolle signifikant eine peptidspezifische Zytokinsekretion.

Grafik 3.7 und Tabelle 3.12 zeigen die peptidspezifische Reaktivität IL-17A sezernierender Zellen.



Grafik 3.7: Peptidspezifische Reaktivität im IL-17A ELISpot

Eine vermehrte Zahl IL-17A sezernierender Zellen im Vergleich zur DMSO-Kontrolle konnte für alle drei untersuchten Peptide in einer Konzentration von 3 µg/ml beobachtet werden. Signifikante Unterschiede im Vergleich zur DMSO-Kontrolle sind durch Sterne gekennzeichnet (*Uncorrected Dunn`s test, * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001, **** p ≤ 0,0001*).

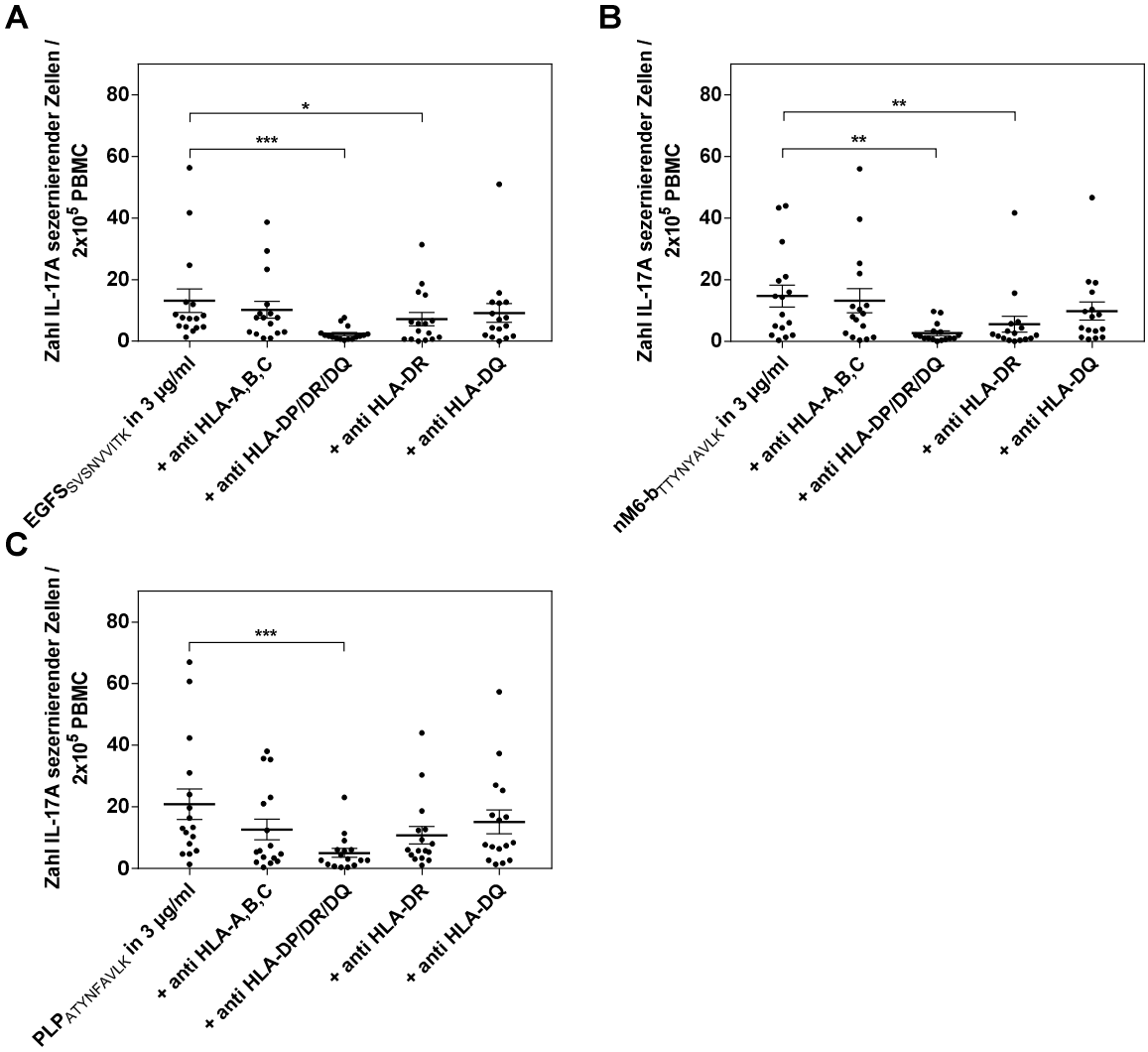
Tabelle 3.12: Peptidspezifische Reaktivität im IL-17A ELISpot

n = 16, die Daten sind als Mittelwerte ± Standardabweichung angegeben, der Prozentwert gibt das Verhältnis zur DMSO Kontrolle an.

	DMSO-Kontrolle	**$EGFS_{SVSNVVITK}$ in 3 µg/ml**	**nM6-$b_{TTYNYAVLK}$ in 3 µg/ml**	**$PLP_{ATYNFAVLK}$ in 3 µg/ml**	**PHA**
Mittelwert ± SD	1,729 ± 1,607 SD	13,13 ± 15,23 SD	14,69 ± 14,32 SD	20,85 ± 19,87 SD	208,1 ± 149,4 SD
Prozent	100,00%	**759,40%**	**849,62%**	**1205,90%**	

3.9 HLA Restriktion im IL-17A ELISpot

Im IL-17A ELISpot wurde die peptidspezifische Reaktivität gegenüber $EGFS_{SVSNVVITK}$ deutlich durch anti HLA-DP/DR/DQ (*Uncorrected Dunn`s test, p = 0,0003*) und auch durch anti-human HLA-DR (*Uncorrected Dunn`s test, p = 0,0448*) vermindert. Hieraus kann nicht nur geschlossen werden, dass $EGFS_{SVSNVVITK}$ MHC II restringiert ist, es kann noch weiter spezifiziert werden, dass der MHC-Subtyp HLA-DR an der Präsentation dieses Peptids beteiligt gewesen sein muss (Grafik 3.8 (A)). Für nM6-$b_{TTYNYAVLK}$ ergab sich ein ähnliches Ergebnis. Sowohl nach der Zugabe von anti HLA-DP/DR/DQ (*Uncorrected Dunn`s test, p = 0,0010*) wie auch anti-human HLA-DR (*Uncorrected Dunn`s test, p = 0,0081*) waren signifikant weniger Spots zu sehen, was eine Beteiligung von HLA-DR zeigt (Grafik 3.8 (B)). Lediglich für $PLP_{ATYNFAVLK}$ kann keine so klare Aussage gemacht werden. Anti HLA-DP/DR/DQ reduzierte klar die Zahl IL-17A sezernierender Zellen (*Uncorrected Dunn`s test, p = 0,0004*), was wiederum auf eine MHC II Restriktion schließen lässt. Jedoch verminderte anti-human HLA-DR zwar tendenziell die peptidspezifische Reaktivität auf $PLP_{ATYNFAVLK}$, aber nicht signifikant (*Uncorrected Dunn`s test, p = 0,1026*). Und auch anti-human HLA-A,B,C verminderte die Zahl der Spots relativ deutlich (*Uncorrected Dunn`s test, p = 0,0781*), was auf eine Mitbeteiligung von MHC I an der Präsentation von $PLP_{ATYNFAVLK}$ hinweist (Grafik 3.8 (C)).



Grafik 3.8: HLA-Restriktion von EGFSSVSNVVITK, nM6-bTTYNYAVLK und PLPATYNFAVLK im IL-17A ELISpot

Eine HLA-DR Restriktion konnte für EGFSSVSNVVITK (A) und nM6-bTTYNYAVLK (B) gezeigt werden. PLPATYNFAVLK (C) ist im IL-17A ELISpot MHC-II restringiert. Signifikante Unterschiede im Vergleich zur peptidspezifischen Reaktivität sind durch Sterne gekennzeichnet (*Uncorrected Dunn`s test, * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001, **** p ≤ 0,0001*).

Die Tabellen 3.13 – 3.15 fassen die Ergebnisse der Versuche zur MHC-Restriktion von EGFSSVSNVVITK, nM6-bTTYNYAVLK und PLPATYNFAVLK im IL-17A ELISpot zusammen.

Tabelle 3.13: HLA-Restriktion von EGFS$_{SVSNVVITK}$ im IL-17A ELISpot

n = 16, die Daten sind als Mittelwerte ± Standardabweichung angegeben, der Prozentwert gibt das Verhältnis zur peptidspezifischen Reaktivität ohne Zugabe von Antikörpern an.

	EGFS$_{SVSNVVITK}$ in 3 µg/ml				
		+ anti HLA-A,B,C	**+ anti HLA-DP/DR/DQ**	**+ anti HLA-DR**	**+ anti HLA-DQ**
Mittelwert ± SD	13,13 ± 15,23 SD	10,19 ± 10,91 SD	2,354 ± 2,186 SD	7,188 ± 8,775 SD	9,208 ± 12,17 SD
Prozent	100,00%	77,61%	**17,93%**	**54,74%**	70,13%

Tabelle 3.14: HLA-Restriktion von nM6-b$_{TTYNYAVLK}$ im IL-17A ELISpot

n = 16, die Daten sind als Mittelwerte ± Standardabweichung angegeben, der Prozentwert gibt das Verhältnis zur peptidspezifischen Reaktivität ohne Zugabe von Antikörpern an.

	nM6-b$_{TTYNYAVLK}$ in 3 µg/ml				
		+ anti HLA-A,B,C	**+ anti HLA-DP/DR/DQ**	**+ anti HLA-DR**	**+ anti HLA-DQ**
Mittelwert ± SD	14,69 ± 14,32 SD	13,23 ± 15,57 SD	2,646 ± 3,017 SD	5,563 ± 10,36 SD	9,833 ± 11,62 SD
Prozent	100,00%	90,06%	**18,01%**	**37,87%**	66,94%

Tabelle 3.15: HLA-Restriktion von PLP$_{ATYNFAVLK}$ im IL-17A ELISpot

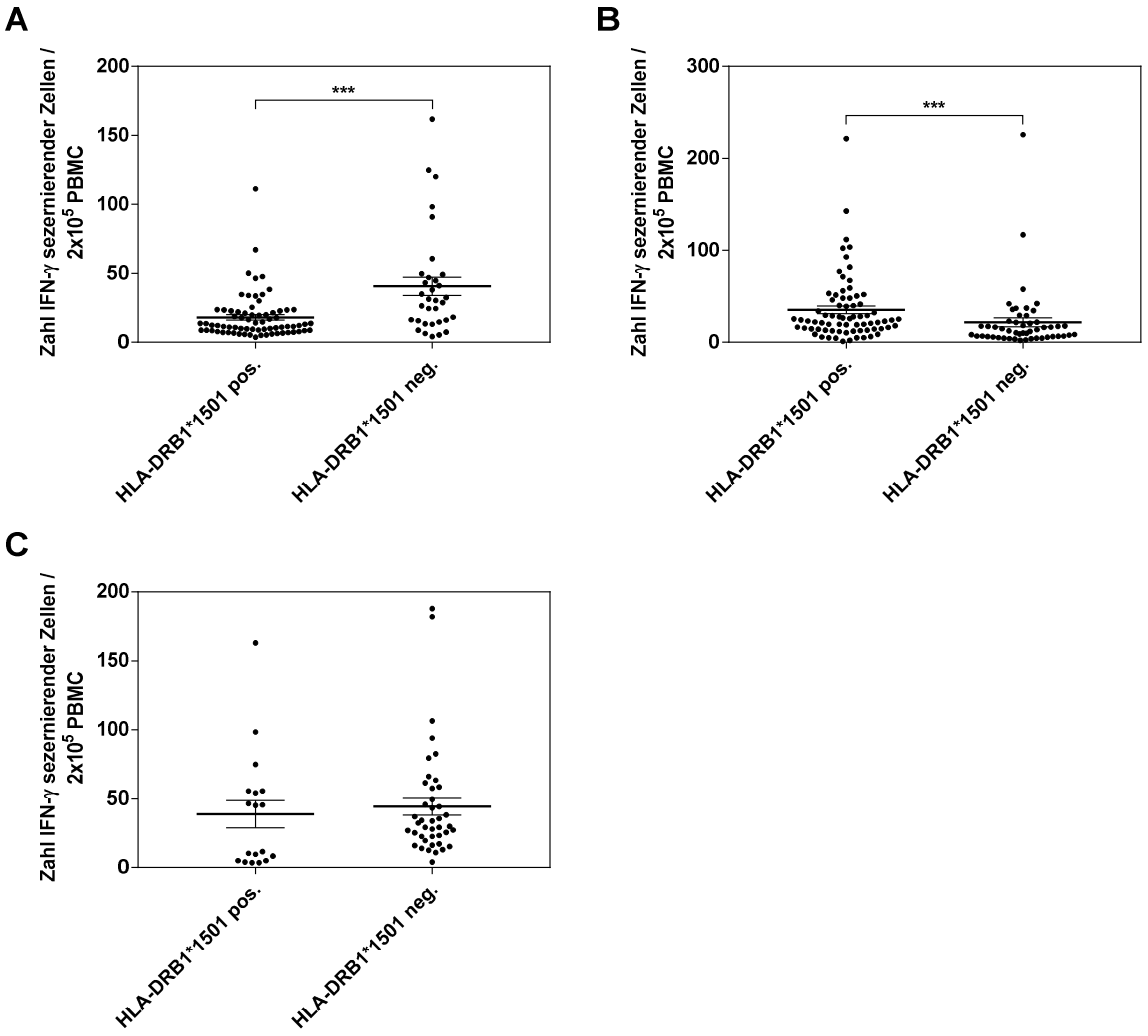
n = 16, die Daten sind als Mittelwerte ± Standardabweichung angegeben, der Prozentwert gibt das Verhältnis zur peptidspezifischen Reaktivität ohne Zugabe von Antikörpern an.

	PLP$_{ATYNFAVLK}$ in 3 µg/ml				
		+ anti HLA-A,B,C	**+ anti HLA-DP/DR/DQ**	**+ anti HLA-DR**	**+ anti HLA-DQ**
Mittelwert ± SD	20,85 ± 19,87 SD	12,6 ± 13,46 SD	5 ± 5,745 SD	10,77 ± 11,51 SD	15,1 ± 15,31 SD
Prozent	100,00%	60,43%	**23,98%**	51,65%	72,42%

3.10 Korrelation mit HLA-Haplotyp

Um die Immunantwort in Abhängigkeit vom HLA-Typ zu untersuchen, wurden die Reaktivitäten gegenüber den drei Peptiden EGFS$_{SVSNVVITK}$, nM6-b$_{TTYNYAVLK}$ und PLP$_{ATYNFAVLK}$ gepoolt und jeweils die HLA-DRB1*1501-positiven Personen den HLA-DRB1*1501-negativen Personen gegenübergestellt. Als HLA-DRB1*1501-positiv wurden dabei alle zusammengefasst, die homozygot oder heterozygot für dieses Allel waren. Diese Korrelation wurde für die Gruppe der Patienten im aktiven Schub, der Patienten in Remission und der gesunden Kontrollpersonen durchgeführt.

Im aktiven Schub zeigten die HLA-DRB1*1501-negativen Patienten eine signifikant höhere Zahl IFN-γ sezernierender Zellen im Vergleich zu den Trägern des untersuchten Allels (*Mann-Whitney U test, p = 0,0001*), während in der Remission das Verhältnis umgekehrt war, also für HLA-DRB1*1501 Homozygote und Heterozygote eine höhere Zytokinsekretion aufwiesen (*Mann-Whitney U test, p = 0,0002*). Bei den Kontrollpersonen zeigte sich im Vergleich der HLA-DRB1*1501-positiven und -negativen Personen kein Unterschied in der gepoolten Reaktivität auf die drei untersuchten Peptide. Grafik 3.9 und die Tabellen 3.16 – 3.18 zeigen die Ergebnisse des Vergleichs.



Grafik 3.9: Gepoolte Reaktivität im IFN-γ ELISpot in Abhängigkeit vom HLA-Typ

Daten zur Reaktivität gegen EGFS$_{SVSNVVITK}$, nM6-b$_{TTYNYAVLK}$ und PLP$_{ATYNFAVLK}$ wurden hier gepoolt und für Patienten im aktiven Schub (A), in Remission (B) und gesunde Kontrollpersonen (C) hinsichtlich des Vorhandenseins des Allels HLA-DRB1*1501 miteinander verglichen. Signifikante Unterschiede sind durch Sterne gekennzeichnet (*Mann-Whitney-U test, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p \leq 0,0001$*).

Tabelle 3.16: Vergleich der gepoolten Reaktivität im IFN-γ ELISpot abhängig vom HLA-DRB1*1501 Haplotyp bei Patienten im aktiven Schub

n = 105, die Daten sind als Mittelwerte ± Standardabweichung angegeben

	HLA-DRB1*1501 positiv (n = 72)	**HLA-DRB1*1501 negativ (n = 33)**
Mittelwert ± SD	18,03 ± 16,49 SD	40,6 ± 37,93 SD

Tabelle 3.17: Vergleich der gepoolten Reaktivität im IFN-γ ELISpot abhängig vom HLA-DRB1*1501 Haplotyp bei Patienten in Remission

n = 126, die Daten sind als Mittelwerte ± Standardabweichung angegeben

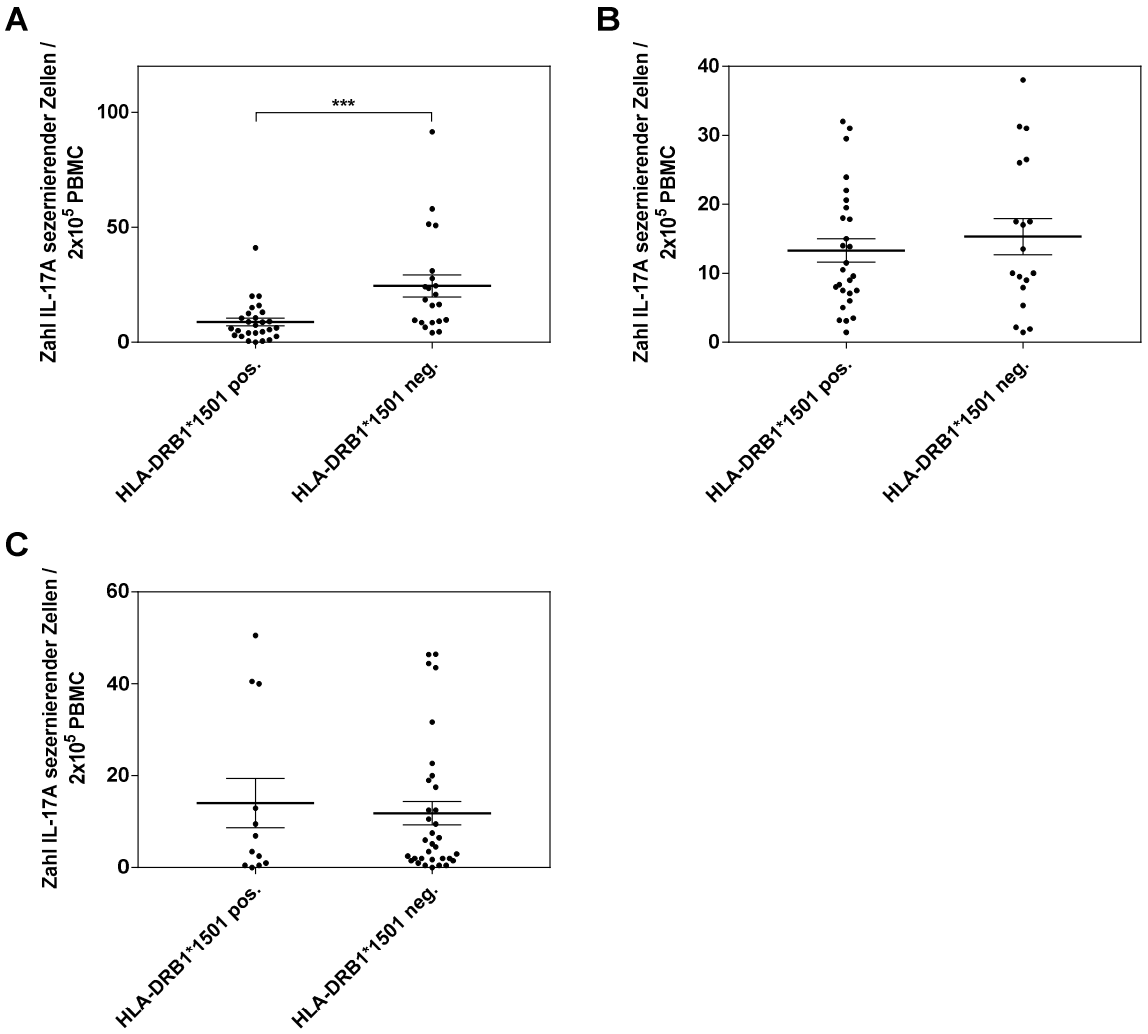
	HLA-DRB1*1501 positiv (n = 73)	**HLA-DRB1*1501 negativ (n = 51)**
Mittelwert ± SD	35,17 ± 35,86 SD	21,72 ± 34,67 SD

Tabelle 3.18: Vergleich der gepoolten Reaktivität im IFN-γ ELISpot abhängig vom HLA-DRB1*1501 Haplotyp bei gesunden Kontrollpersonen

n = 60, die Daten sind als Mittelwerte ± Standardabweichung angegeben

	HLA-DRB1*1501 positiv (n = 18)	**HLA-DRB1*1501 negativ (n = 42)**
Mittelwert ± SD	38,87 ± 42,34 SD	44,36 ± 39,37 SD

Auch im IL-17A ELISpot konnte für die HLA-DRB1*1501-negativen Patienten mit Erkrankungsschub eine höhere Spotanzahl nachgewiesen werden, als für die HLA-DRB1*1501-positiven Patienten (*Mann-Whitney U test, p=0.0003*), während bei Patienten in Remission kein signifikanter Unterschied festzustellen war. Auch bei den Kontrollpersonen gab es keinen relevanten Unterschied hinsichtlich der Zahl IL-17A produzierender Zellen in Abhängigkeit vom HLA-DRB1*1501 Haplotyp. Die Ergebnisse für den IL-17A ELISpot sind in Grafik 3.10 sowie den Tabellen 3.19 – 3.21 dargestellt.



Grafik 3.10: Gepoolte Reaktivität im IL-17A ELISpot in Abhängigkeit vom HLA-Typ

Daten zur Reaktivität gegen EGFS$_{SVSNVVITK}$, nM6-b$_{TTYNYAVLK}$ und PLP$_{ATYNFAVLK}$ wurden hier gepoolt und für Patienten im aktiven Schub (A), in Remission (B) und gesunde Kontrollpersonen (C) hinsichtlich des Vorhandenseins des Allels HLA-DRB1*1501 miteinander verglichen. Signifikante Unterschiede sind durch Sterne gekennzeichnet (*Mann-Whithney-U test, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p \leq 0,0001$*).

Tabelle 3.19: Vergleich der gepoolten Reaktivität im IL-17A ELISpot abhängig vom HLA-DRB1*1501 Haplotyp bei Patienten im aktiven Schub

n = 48, die Daten sind als Mittelwerte ± Standardabweichung angegeben

	HLA-DRB1*1501 positiv (n = 27)	**HLA-DRB1*1501 negativ (n = 21)**
Mittelwert ± SD	8,806 ± 8,573 SD	24,5 ± 21,91 SD

Tabelle 3.20: Vergleich der gepoolten Reaktivität im IL-17A ELISpot abhängig vom HLA-DRB1*1501 Haplotyp bei Patienten in Remission

n = 45, die Daten sind als Mittelwerte ± Standardabweichung angegeben

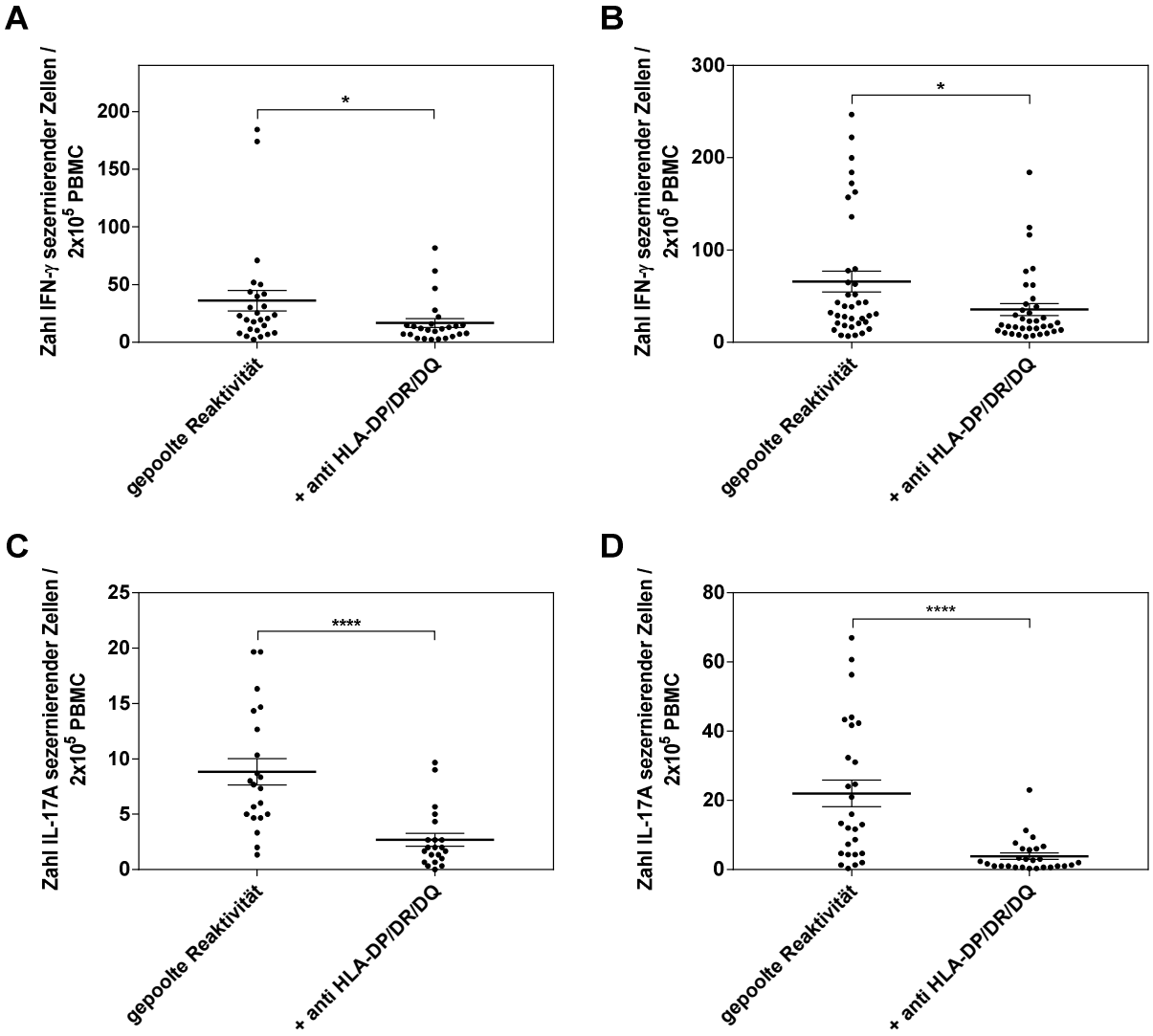
	HLA-DRB1*1501 positiv (n = 27)	**HLA-DRB1*1501 negativ (n = 18)**
Mittelwert ± SD	13,27 ± 8,815 SD	15,31 ± 11,11 SD

Tabelle 3.21: Vergleich der gepoolten Reaktivität im IL-17A ELISpot abhängig vom HLA-DRB1*1501 Haplotyp bei gesunden Kontrollpersonen

n = 45, die Daten sind als Mittelwerte ± Standardabweichung angegeben

	HLA-DRB1*1501 positiv (n = 12)	**HLA-DRB1*1501 negativ (n = 33)**
Mittelwert ± SD	14,03 ± 18,47 SD	11,83 ± 14,66 SD

Ein Vergleich der MHC II Restriktion der gepoolten Reaktivität zwischen HLA-DRB1*1501-positiven und HLA-DRB1*1501-negativen Personen zeigte, dass durch den Antikörper anti HLA-DP/DR/Q sowohl im IFN-γ als auch im IL-17A ELISpot die Anzahl Zytokin sezernierender Zellen in beiden Gruppen gleichermaßen vermindert wird (Grafik 3.11). Der HLA-DRB1*1501 Haplotyp hat also keinen Einfluss auf die Möglichkeit der Blockade der Immunantwort mittels des verwendeten Antikörpers.



Grafik 3.11: MHC II Restriktion in Abhängigkeit vom HLA-BRB1*1501 Haplotyp

Die gepoolten Reaktivitäten im IFN-γ (A und B) und IL-17A ELISpot (C und D) sowie deren Blockade mittels anti HLA-DP/DR/DQ wurden für HLA-BRB1*1501-positive (A und C) und -negative (B und D) Personen aufgetragen. In allen Gruppen lässt sich eine MHC II Restriktion der Immunantwort beobachten (*Mann-Whithney-U test, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p \leq 0,0001$*).

4. Diskussion

4.1 Untersuchung der spezifischen Immunantwort anhand von PBMCs

In der vorliegenden Arbeit wurde die spezifische Immunantwort auf die drei kürzlich entdeckten Antigene EGFS$_{SVSNVVITK}$, nM6-b$_{TTYNYAVLK}$ und PLP$_{ATYNFAVLK}$ unter Einsatz von PBMCs untersucht (122). Es wurde entschieden, die ganze PBMC-Fraktion zu testen, um so das Milieu, welches in vivo herrscht, möglichst gut abbilden zu können (160,161). Zwar wurden periphere Zellen verwendet anstatt beispielsweise die zu untersuchende Zellpopulation aus Liquor zu isolieren, jedoch repräsentieren diese ausreichend genau die Zusammensetzung im ZNS, da Lymphozyten ständig über die Blut Hirn Schranke ins ZNS transmigrieren (4,44,162). Eine weitere Möglichkeit wäre die Testung antigenspezifischer T Zell-Linien gewesen, wie sie häufig angewandt wird (163–165). Bei diesen Untersuchungen wird jedoch schon vor der eigentlichen Testung eine Selektion der gewünschten Zellpopulation vorgenommen, was eine noch größere Verfälschung gegenüber der natürlich vorkommenden Zellzusammensetzung bedeuten würde (60).

4.2 IFN-γ und IL-17A ELISpot Assay

Zur Untersuchung antigenspezifischer T Zell-Antworten bietet sich der ELISpot - bei entsprechendem Handling der Proben - als besonders sensitive Methode an und wird vielfach zu diesem Zwecke eingesetzt (166–172). Insbesondere besitzt der ELISpot eine bessere Sensitivität als ELISA, wohl weil gebildetes Zytokin direkt an den spezifischen Antikörper auf der Membran gebunden wird und nicht von anderen Zellen aufgenommen werden kann (173,174). Da in der vorliegenden Arbeit potenziell sehr kleine Unterschiede in der Immunreaktivität vor und nach Zugabe der MHC spezifischen Antikörper gemessen werden sollten, war eine hohe Sensitivität und Spezifität unbedingt notwendig. Deshalb wurde entschieden, den ELISpot zur Messung der T Zell-Antwort in Form von IFN-γ und IL-17A Sekretion zu verwenden. Diese beiden Zytokine wurden gewählt, da deren Produzenten unter anderem Th1 und Th17 Zellen sind, welche ganz entscheidend an der Pathogenese der MS und ihrer Modellerkrankung EAE beteiligt sind (43). Ihre Rolle wurde bereits weiter oben ausführlich diskutiert. IFN-γ wird allerdings nicht nur von Th1 Zellen produziert, sondern auch von anderen T Zell-Populationen, NK Zellen, Neutrophilen, ILC1s und intraepithelialen Lymphozyten. Neben Th17 Zellen sind außerdem CD8$^+$ T Zellen, NK

Zellen, γ:δ T Zellen, Neutrophile und ILC3s an der IL-17A Produktion beteiligt (60). Da keine Isolation einzelner Zelltypen vorgenommen wurde, kann also nicht ausgeschlossen werden, dass auch andere Zelltypen spezifisch auf die eingesetzten Antigene reagierten und die gemessenen Zytokine produziert haben. Umgekehrt kann die Beteiligung weiterer Zelltypen wie $CD8^+$ T Zellen oder B Zellen beziehungsweise deren Interaktion mit $CD4^+$ T Zellen durch die alleinige Messung der IFN-γ und IL-17A Sekretion nicht ausreichend untersucht werden (43,62,77). Eine Erfassung der B Zell-Aktivität könnte beispielsweise durch die Messung von IL-10 mittels ELISpot erfolgen (60).

4.3 Peptidspezifische Reaktivität bei Patienten und Kontrollpersonen

In Untersuchungen, welche dieser Arbeit vorangegangen sind, wurde eine gesteigerte Reaktivität (im Sinne einer erhöhten Zahl IFN-γ und IL-17A sezernierender Zellen) gegenüber $EGFS_{SVSNVVITK}$ und $PLP_{ATYNFAVLK}$ im IFN-γ ELISpot sowie gegen $EGFS_{SVSNVVITK}$, nM6-$b_{TTYNYAVLK}$ und $PLP_{ATYNFAVLK}$ im IL-17A ELISpot beobachtet (122). Wir konnten erneut belegen, dass diese Peptide die Zahl spezifischer Zytokin sezernierender Zellen in Patienten, welche an MS erkrankt sind, und auch bei einigen gesunden Kontrollpersonen erhöhen. Die Erkennung körpereigener Antigene durch autoreaktive T Zellen allein kann also nicht die Ursache für die Entstehung einer MS sein. In Gesunden muss es noch einen protektiven Faktor geben, welcher in Kranken fehlt oder defekt ist. Hier kommen die regulatorischen T Zellen ins Spiel, deren Rolle bereits oben erläutert wurde.

4.3.1 Untersuchte Autoantigene

Die drei in der vorliegenden Arbeit untersuchten Autoantigene $EGFS_{SVSNVVITK}$, nM6-$b_{TTYNYAVLK}$ und $PLP_{ATYNFAVLK}$ wurden erst kürzlich als solche identifiziert. Sie waren aus Hirngewebe von an MS erkrankten Personen isoliert worden und hatten im IFN-γ und IL-17A ELISpot eine erhöhte Zahl Zytokin sezernierender Zellen bewirkt (122).

Lediglich für PLP-Epitope existieren bereits weitere Arbeiten im Zusammenhang mit der MS, jedoch nicht für das in dieser Arbeit untersuchte Peptid $PLP_{ATYNFAVLK}$ (43). Andere PLP-Epitope wurden von verschiedenen Gruppen bereits häufiger als Targets in der Autoimmunpathogenese der MS identifiziert (43,164,175,176).

Tabelle 4.1 versucht einen Überblick über die bisher am Menschen untersuchten Epitope von PLP zu geben. Abbildung 4.1 zeigt, wo diese Epitope innerhalb von PLP liegen und welche Regionen sich besonders als immunogen erwiesen haben. Es muss jedoch bedacht werden, dass die zitierten Arbeiten unterschiedliche Methoden verwendet haben und daher auch keine einheitliche Beurteilung der Immunogenität der untersuchten Peptide gegeben war. Das in dieser Arbeit untersuchte Peptid ATYNFAVLK ($PLP_{ATYNFAVLK}$), entsprechend der Aminosäuren 261-269 von PLP (130), liegt dabei in einer Region, die am Menschen bislang eher selten untersucht wurde. Mit diesem Peptid überlappende Regionen waren jedoch auch in Arbeiten anderer Gruppen immunogen (163,164,172,177). Minohara et al. zeigten ebenfalls die MHC II Restriktion eines Peptids bestehend aus den Aminosäuren 256-276 von PLP (163). Im Gegensatz hierzu fanden Trotter et al. keine Immunogenität der beinahe identischen Sequenz 254-276 (165).

Tabelle 4.1: Am Menschen untersuchte PLP-Epitope

Die Tabelle gibt einen Überblick über bisher am Menschen untersuchte PLP-Epitope. Sie zeigt, ob eine Immunreaktion ausgelöst werden konnte und gibt, falls bekannt, die HLA-Restriktion der entsprechenden Sequenz an.

PLP - Sequenz	HLA - Restriktion	Immunogenität Patienten (und Kontroll-personen)	Literaturstelle
3-11	HLA-A2	+	(172)
30-49	HLA-DR2	+	(176)
33-53	HLA-DQ	+	(163)
38-45	HLA-A3	+	(172)
39-47		+	(172)
40-60	HLA-DR2b	+	(164,178–181)
41-58		+	(182–184)
44-76			(179)
45-53	HLA-A3	+	(185,186)
58-65	HLA-B44	+	(172)
58-74		+	(187)
63-72	HLA-A2	+	(172)
80-88	HLA-A2	+	(186,188)
85-104			(189)
88-108		+	(190)
89-106	HLA-DR2a, HLA-DR2b	+	(178,180,181)

			(164,179,181)
89-109	HLA-DR, HLA-DQ	+	(163)
95-114		+	(183)
95-115	HLA-DR, HLA-DQ	+	(163)
95-116	HLA-DR2, w15^{+}	+	(189)
95-117	HLA-DR 15 (2)	+	(179)
			(180)
100-119			(183)
103-116		+	(190)
103-120			(164,178,180,181)
104-117	HLA-DR	+	(191)
105-124	HLA-DR2, w15^{+}		(189)
117-137			(180)
117-150			(179)
118-139			(189)
125-143			(164,178,181)
130-148			(189)
131-151	HLA-DR, HLA-DQ	+	(163)
139-151		+	(192)
			(179,180,183)
139-154		+	(190)
	HLA-DR2b		(164,178,181)
139-155			(189)
142-153	HLA-DR	+	(191)
145-159			(189)
154-162		+	(172)
161-177		+	(187)
165-185		+	(163)
172-191	HLA-DR2a		(178)
174-194		+	(163)
178-191		+	(180)
			(183)
180-199	HLA-DR2	+	(193)
183-202	HLA-DQ	+	(163)
184-199	HLA-DR4, -DR7, -DR13	+	(182–184,194)
185-206	HLA-DR 15 (2)	+	(179)
			(180)
190-209	HLA-DR4, -DR7, -DR13	+	(182–184,194)
	HLA-DQ	+	(163)
195-206			(178)
202-210		+	(172)

207-226	HLA-DQ	+	(163)
207-231			(179)
223-231	HLA-A2	+	(172)
225-233	HLA-B35, HLA-B51	+	(172)
238-254		+	(187)
254-276			(179)
256-276	HLA-DR	+	(163)
261-269	HLA-DR, DQ, DP	+	(122)
262-276		+	(182)
265-273		+	(172)

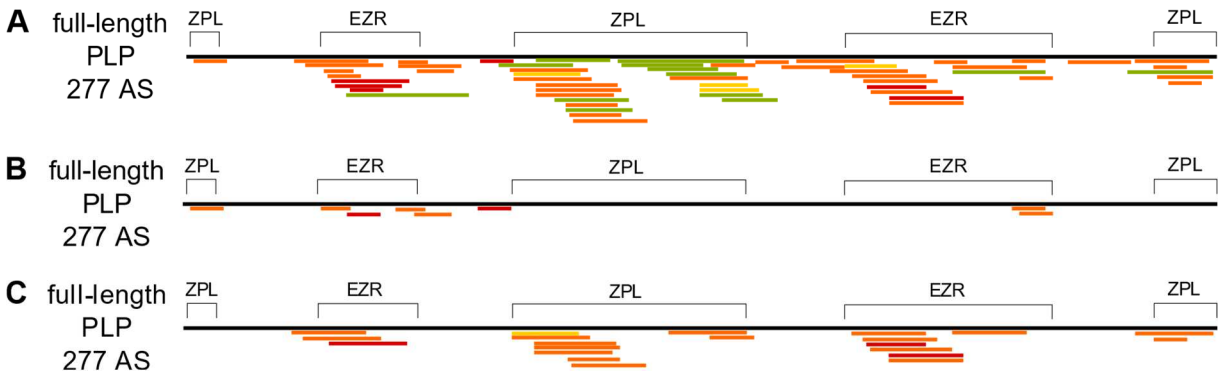


Abbildung 4.1: Immunogenität von PLP-Epitopen bei MS Patienten und Kontrollpersonen

Untersuchungen anhand von T Zell-Linien von Patienten und Kontrollpersonen. Domänen, welche im Zytoplasma (ZPL) beziehungsweise Extrazellulärraum (EZR) liegen, sind gekennzeichnet. Die dazwischenliegenden Abschnitte durchspannen die Zellmembran. Die Immunogenität der Epitope ist farblich gekennzeichnet (grün = keine Immunogenität; gelb = Immunogenität durch einige Gruppen nachgewiesen, durch andere widerlegt; orange = Immunogenität nachgewiesen; rot = Immunogenität durch mehrere Gruppen nachgewiesen). (A) zeigt eine Übersicht über bisher am Menschen untersuchte PLP-Epitope. (B) zeigt die untersuchten MHC I restringierten Epitope und (C) die MHC II restringierten Epitope.

Auch anhand verschiedener Tiermodelle sind PLP Epitope, welche mit $PLP_{ATYNFAVLK}$ überlappen, bereits untersucht worden: Kaushansky et al. betrachteten verschiedene PLP-Epitope, unter anderem die Sequenz 257-276, in welcher die Sequenz 261-269, die in der vorliegenden Arbeit untersucht wird, enthalten ist. Zu diesem Zweck wurden Mäuse, welche transgen für DRB1*1501 oder DQB1*0602 waren, sowie DRB1*1502-Tg-Mäuse als Kontrolle immunisiert. Die PLP-Sequenz 257-276 bewirkte insbesondere in DQB1*0602-Tg-Mäusen eine vermehrte Proliferation von spezifischen Zellen, welche aus den Lymphknoten der Tiere isoliert wurden. Eine Induktion von EAE gelang jedoch durch dieses Peptid nicht. Eine Bestimmung der beteiligten Zytokine zeigte keine vermehrte Sekretion proinflammatorischer Zytokine mit Ausnahme von IL-17 (195). In der vorliegenden Arbeit hatte die Stimulation von PBMCs mit $PLP_{ATYNFAVLK}$ hingegen zu einer vermehrten Proliferation IFN-γ und IL-17A produzierender Zellen geführt. Anhand verschiedener Mausmodelle sind durch Greer et al. ferner die PLP-Epitope 250-269 und 260-276 untersucht worden, welche ebenfalls die Sequenz 261-209 enthalten. Bei SJL/J (H-2^s) Mäusen, welche IA^s exprimieren, waren die Sequenzen 250-269 und 260-276 immunogen, indem sie eine verstärkte Proliferation von spezifische Zellen bewirkten, welche aus Lymphknoten der Tiere isoliert worden waren (175). Dieses Ergebnis passt zu der in der vorliegenden Arbeit gemachten Beobachtung, dass MHC II entscheidend an der Präsentation von $PLP_{ATYNFAVLK}$ beteiligt sein muss, da eine Blockade von MHC II mittels anti HLA-DP/DR/DQ zu einer deutlichen Abnahme der IFN-γ und IL-17A sezernierenden Zellen führte. Bei B10.S (H-2^s) Mäusen, welche ebenfalls IA^s auf ihren APC tragen, erwies sich die Sequenz 260-276 jedoch als nicht immunogen (175). Ebenso konnte bei Balb/cPt (H-2^d) Mäusen, die IA^d, welches MHC I „entspricht“ (60), exprimieren, die Stimulation von Lymphknotenzellen mit der Sequenz 260-276 keine verstärkte Proliferation bewirken (175). Auch in der vorliegenden Arbeit hatte die Blockade von MHC I durch anti HLA-A,B,C keinen Einfluss auf die peptidspezifische Reaktivität gegen $PLP_{ATYNFAVLK}$ im IFN-γ und IL-17A ELISpot.

4.3.2 Einfluss von DMSO und Antikörpern auf die Zahl Zytokin sezernierender Zellen

Ein Vergleich der DMSO-Kontrollen mit den Negativkontrollen zeigte, dass DMSO in der verwendeten Konzentration die Zahl Zytokin sezernierender Zellen kaum beeinflusste. In größeren Konzentrationen kann es jedoch in vitro antiinflammatorische Eigenschaften besitzen und die Proliferation von Lymphozyten unterdrücken (196). Daneben sind direkte zytotoxische Effekte durch Schädigung der Mitochondrien berichtet worden (197). Andere Autoren konnten einen solchen Zusammenhang dagegen nicht belegen (198).

Die untersuchten Antikörper hingegen hatten teils stimulierende, teils hemmende Effekte. Anti-human HLA-A,B,C und anti-human HLA-DR induzierten im Vergleich zur Negativkontrolle eine größere Zahl IFN-γ sezernierender Zellen, hatten also eine stimulierende Wirkung. Hier könnte die Immunogenität des Antikörpers selbst einen Erklärungsansatz darstellen. Die verwendeten Antikörper entstammen dem Wirtsorganismus Maus, sind also „fremd“ für das menschliche Immunsystem. Besonders Aggregate solcher Antikörper können schon in geringer Dosis immunogen wirken (199). Immunglobuline können von APCs aufgenommen, prozessiert und auf MHC II für $CD4^+$ T Zellen präsentiert werden (200,201). Humanisierte Antikörper sind zwar etwas weniger immunogen, tragen jedoch beispielsweise $CD4^+$ T Zell-Epitope ausgerechnet in den CDR, welche spezifisch für den jeweiligen B Zell-Klon sind. Hier kann der Austausch weniger Aminosäuren eine geringere Immunogenität bei gleichbleibender Affinität bewirken (202). Auch in der klinischen Anwendung proteinbasierter Therapeutika ist induzierte Immunogenität ein Problem. Klassischerweise werden Antikörper gegen das verabreichte Biologikum gebildet. Dies kann unter Mitbeteiligung von T Zellen oder unabhängig passieren (203). Eine andere Möglichkeit, weshalb anti-human HLA-A,B,C und anti-human HLA-DR eine im Vergleich zur Negativkontrolle größere Zahl IFN-γ sezernierender Zellen bewirken, könnte die Blockade der Funktion regulatorischer Zellpopulationen durch den Antikörper sein. Regulatorische $CD8^+$ $CD25^+$ $FoxP3^+$ Zellen unterdrücken in vitro die Proliferation autoreaktiver $CD4^+$ Klone und die Sekretion von IFN-γ und IL-17A (72). Es wurden jedoch regulatorische $CD8^+$ Populationen, die sowohl von IFN-γ als auch von MHC I abhängig sind und zytolytische Aktivität gegen pathogene $CD4^+$ T Zellen ausüben, beschrieben (67). Tierexperimentell wurde gezeigt, dass das Fehlen von funktionsfähigem MHC I und $CD8^+$ T Zellen einen schwerwiegenderen Verlauf der EAE

zur Folge hat (204). Die Blockade der adäquaten Funktion regulatorischer Zellpopulationen, könnte also auch in der vorliegenden Arbeit zu einer verminderten Kontrolle autoreaktiver $CD4^+$ Zellen geführt haben, die dann ungebremst IFN-γ sezernierten.

Anti-HLA-DP/DR/DQ verminderte für sich genommen die Hintergrundaktivität im IL-17A ELISpot. Eine direkte Zytotoxizität des Antikörpers scheint jedoch unwahrscheinlich, da in der verwendeten Formulierung insbesondere kein Natriumazid enthalten war (205).

4.3.3 Titrierbarkeit der Immunantwort

Im IL-17A ELISpot konnte eine steigende Zahl IL-17A sezernierender Zellen mit steigender Antigenkonzentration gezeigt werden. $PLP_{ATYNFAVLK}$ bewirkte in der höchsten Konzentration allerdings eine geringere Reaktivität als in der zweithöchsten. Im IFN-γ ELISpot konnten wir ebenfalls tendenziell eine Dosisabhängigkeit der Immunantwort beobachten.

Auch von anderen Gruppen wurde die eingesetzte Antigenkonzentration - neben der Affinität des Antigens zu seinem Rezeptor - als wesentlicher Faktor für die Stärke der T Zell-Aktivierung beschrieben (206–209). Ebenso besteht im Tiermodell eine Schwellendosis für die Induktion der EAE und der Grad der Demyelinisierung scheint von der in diesem Falle eingesetzten MBP Dosis abzuhängen (210,211).

Andererseits sind höhere Dosen von Antigen auch mit einer verstärkten Ausbildung anerger beziehungsweise immunregulatorischer Phänotypen einhergehend, was einen Mechanismus der peripheren Toleranz darstellt (212). Lever et al. postulieren einen glockenförmigen Verlauf der T Zell-Aktivierung, unter anderem abhängig von der Dosis des untersuchten Antigens und dessen Affinität (213). So steigt die Zytokinproduktion mit steigender Dosis eines pMHC-Liganden zunächst an, fällt jedoch ab einem Schwellenwert - spezifisch für den jeweiligen Liganden - wieder. Für $PLP_{ATYNFAVLK}$ konnte in dieser Versuchsreihe ebenfalls ein Rückgang der Spotzahlen in der höchsten Konzentration im Vergleich zur nächstkleineren Konzentration beobachtet werden. Dies könnte Zufall und der geringen Stichprobengröße zuzuschreiben sein. Ein anderer Erklärungsansatz wäre jedoch, dass regulatorische Mechanismen erst ab einer bestimmten Antigenkonzentration greifen können.

4.4 MHC-Restriktion

Die Bedeutung von MHC bei der Pathogenese der MS und anderer Autoimmunerkrankungen wurde bislang sowohl mittels genetischer Assoziationsstudien (35,39,214) als auch strukturell untersucht (89). So konnte etwa gezeigt werden, dass auf MHC präsentierte Peptide Targets bei der Immunreaktion darstellen und dass Unterschiede in deren Bindungsverhalten zu MHC Molekülen bestehen, welche die Ausprägung der Immunantwort mit verursachen (215,216). Für die vorliegende Arbeit wurde entschieden, die MHC Restriktion der getesteten Peptide funktionell im ELISpot zu zeigen, wie zuvor beschrieben (171). Die Blockade ausgewählter MHC Klassen und Subtypen mittels spezifischer monoklonaler Antikörper sollte die Immunreaktion, messbar im ELISpot als Zahl Zytokin sezernierender Zellen, beeinflussen.

4.4.1 Bestimmung der MHC-Restriktion mittels spezifischer monoklonaler Antikörper

Die verwendeten Antikörper wurden von ihren Herstellern ursprünglich zwar nicht für funktionelle Assays entwickelt, in der Literatur wird ein solcher Gebrauch jedoch beschrieben (217–227). Bis auf anti-HLA-DP/DR/DQ, welcher den Subtyp IgG 1 aufweist, sind alle verwendeten Antikörper vom Isotyp IgG 2a, κ. Um den Erfolg des Assay nicht zu gefährden, wurden ausschließlich Natriumazid freie und möglichst wenig Endotoxin enthaltende Antikörper verwendet. Natriumazid beeinträchtigt die mitochondriale Energiegewinnung und wirkt somit zytotoxisch (205,228). Umgekehrt bewirken möglicherweise enthaltene Endotoxine eine Proliferation und Zytokinsekretion der T Zellen, welche unabhängig von den in dieser Arbeit untersuchten Antigenen ist (229). Dies galt es zu vermeiden.

Der hier eingesetzte Kontrollantikörper wird vom Hersteller BioLegend eigentlich als Negativkontrolle für die Flow Zytometrie empfohlen. Einige Autoren erwähnen indessen auch eine Verwendung in funktionellen Untersuchungen (217–219). Der Klon MOPC-173 exprimiert Mouse IgG 2a, κ, somit ist dieser Antikörper sehr gut als Kontrolle für anti-human HLA-A,B,C, anti-human HLA-DR und anti-human, anti-pig HLA-DQ geeignet. Zu anti-HLA-DP/DR/DQ passt er etwas weniger gut, da dieser einem anderen IgG Isotyp entspricht als alle übrigen Antikörper. Anti-human HLA-A,B,C entstammt dem Klon W6/32, welcher ebenfalls einen Antikörper des Isotyps Mouse IgG 2a, κ produziert. Dieser wurde unter anderem bereits zur Blockade

Rezeptor-spezifischer Signalwege und der T Zell-Stimulation (220,221) sowie zur Verhinderung NK Zell-vermittelter Lyse (222) eingesetzt. Andererseits konnten einige Autoren eine Aktivierung von T Zellen nach Zugabe von mAb W6/32 beobachten (230,231). Turco et al. wiesen nach Zugabe des Antikörpers eine gesteigerte CD2 induzierte T Zell-Proliferation in weniger als 30 % ihrer untersuchten PBMC Präparate nach. Nach Stimulation der PBMCs mit mAb OKT3 oder mAb BMA 031 besaß mAb W6/32 allerdings einen inhibitorischen Effekt. Der Antikörper hatte also eine gegensätzliche Wirkung, je nachdem, welcher Signalweg gerade aktiv war (231). Auch in der vorliegenden Arbeit erhöhte anti-human HLA-A,B,C für sich genommen die Rate Zytokin sezernierender Zellen. Dieser stimulierende Effekt trat aber nicht bei allen Patienten auf. Auch hier könnten unterschiedliche Signalwege aktiv gewesen sein und der Antikörper teils stimulierend, teils inhibitorisch gewirkt haben. Der vom Klon PdV5.2 produzierte anti-HLA-DP/DR/DQ vom Isotyp Mouse monoclonal IgG 1 (κ light chain) wurde schon zur in vitro Blockade von T Zell-Effektorfunktionen verwendet (232). Anti-human HLA-DR ist ein Antikörper des Isotyps Mouse IgG 2a, κ und wird vom Klon L243 exprimiert. Eine Blockade der antigenspezifischen Aktivierung von T Zellen wurde in der Literatur beschrieben (223,224). Anti-human, anti-pig HLA-DQ, welcher vom Klon SPV-L3 produziert wird und den Isotyp Mouse monoclonal IgG 2a, κ aufweist, wurde von anderen Autoren zur Blockade antigenspezifischer T Zell-Antworten (225) und Restriktionsbestimmung eingesetzt (226,227).

Die Stimulation mit den getesteten Peptiden EGFS$_{SVSNVVITK}$, nM6-b$_{TTYNYAVLK}$ und PLP$_{ATYNFAVLK}$ führte sowohl bei Patienten mit MS als auch bei gesunden Kontrollpersonen zu einer gesteigerten IFN-γ und IL-17A Sekretion von PBMCs. Die untenstehende Abbildung 4.2 zeigt schematisch die Aktivierung einer spezifischen T Zelle durch ein Antigen.

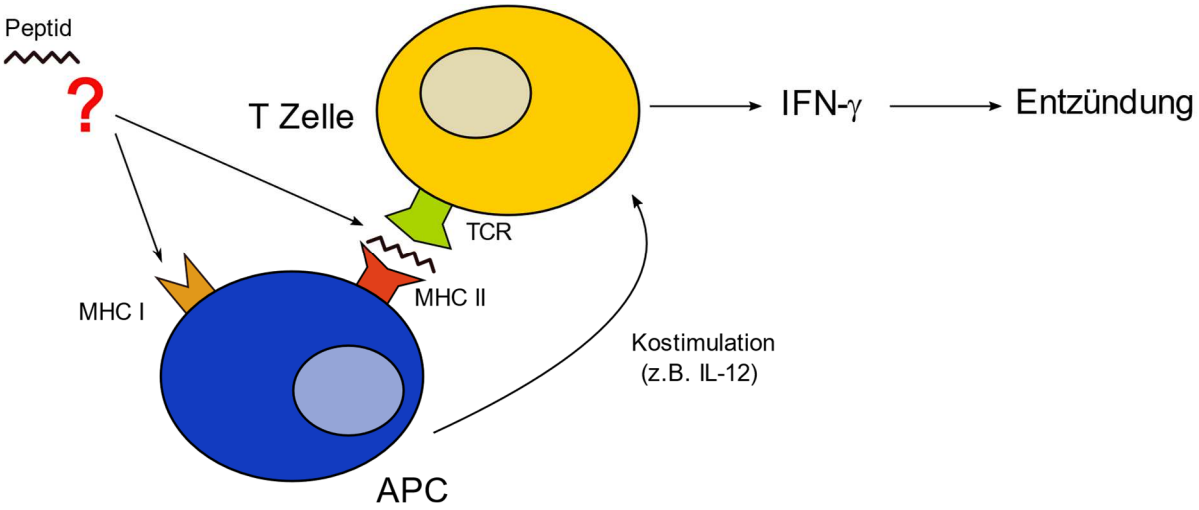


Abbildung 4.2: Präsentation eines Antigens auf MHC II und Erkennung desselben durch eine spezifische T Zelle

In dieser Studie sollte untersucht werden, ob die Peptide $EGFS_{SVSNVVITK}$, nM6-$b_{TTYNYAVLK}$ und $PLP_{ATYNFAVLK}$ auf MHC I oder MHC II bzw. den Subtypen HLA-DR und HLA-DQ präsentiert werden. Bindet ein Peptid auf einem MHC Molekül und wird dieser Komplex von einer spezifischen T Zelle erkannt, so proliferiert die T Zelle und sezerniert beispielsweise IFN-γ, welches im Körper proinflammatorisch wirkt und im IFN-γ ELISpot nachgewiesen werden kann.

Durch Zugabe des Antikörpers anti HLA-DP/DR/DQ konnte die Zytokinsekretion sowohl im IFN-γ als auch im IL-17A ELISpot deutlich gesenkt werden. Hieraus lässt sich schließen, dass MHC II bei der Präsentation der Peptide beteiligt gewesen sein muss. Im IL-17A ELISpot konnte die HLA-Restriktion der untersuchten Peptide sogar noch weiter spezifiziert und gezeigt werden, dass HLA-DR in die Präsentation involviert ist. Abbildung 4.3 veranschaulicht die Blockade der Antigenpräsentation durch einen spezifischen Antikörper.

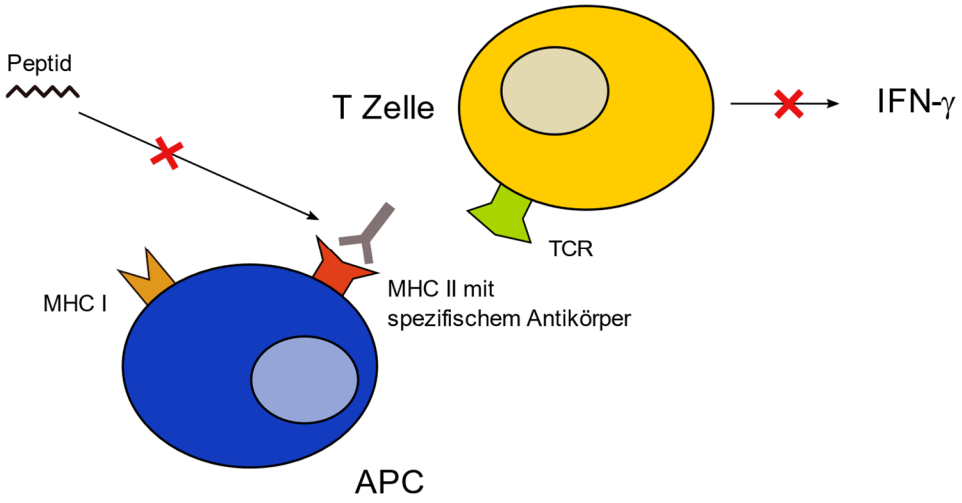


Abbildung 4.3: Blockade der Antigenpräsentation durch MHC II spezifischen Antikörper

Wird nun das MHC Molekül mittels spezifischem Antikörper blockiert, kann das Peptid nicht binden und somit keine Stimulation der T Zelle und auch kein Nachweis einer IFN-γ Sekretion erfolgen.

4.4.2 Peptid-MHC-Interaktion

Üblicherweise werden längere Peptide auf MHC II präsentiert, welche die offene Bindungsstelle an den Enden überragen. Kürzere Peptide mit einer Länge von 8 bis 10 Aminosäuren binden vor allem an MHC I, welches eine geschlossene Bindungsstelle besitzt (233). Die nachfolgende Abbildung 4.4 zeigt nochmals MHC I und MHC II im Vergleich.

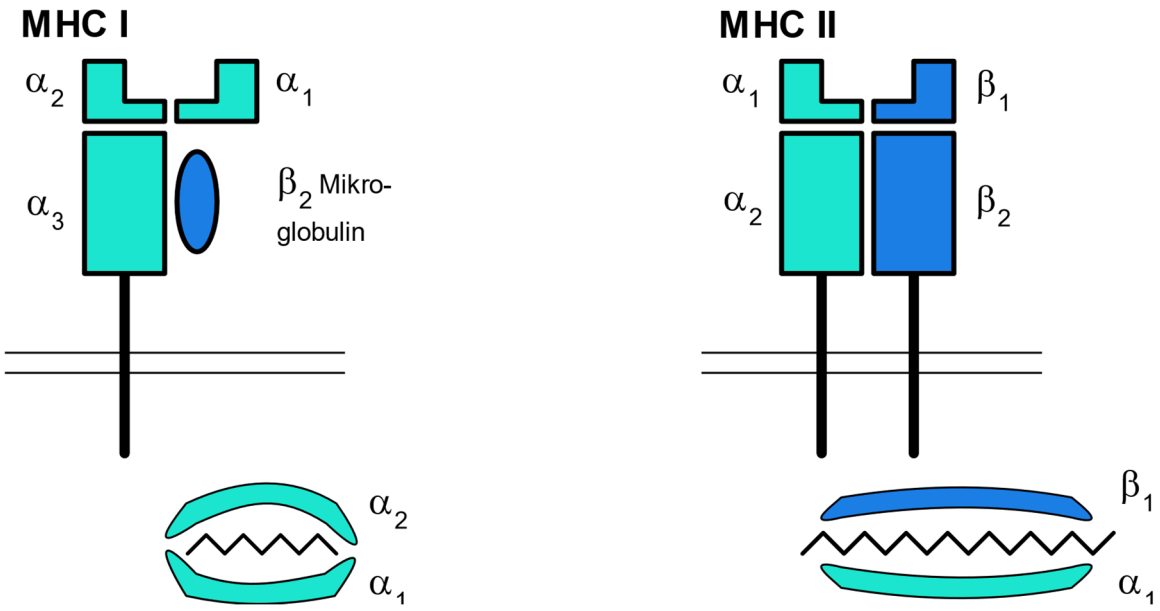


Abbildung 4.4: MHC Moleküle

MHC I besteht aus je einer α_1, α_2 und einer α_3 Kette. Letztere ist in der Zellmembran verankert und mit β_2 Mikroglobulin assoziiert. Die MHC I Bindestelle wird von α_1 und α_2 gebildet, besitzt eine geschlossene Konfiguration und bindet daher bevorzugt Peptide mit einer Länge von 8-10 Aminosäuren.

MHC II besteht aus vier Ketten: α_1, α_2, β_1 und β_2. Die Peptidbindestelle von MHC II wird von α_1 und β_1 gebildet, ist an den Enden offen und bindet längere Peptide.

Trotzdem ist es keineswegs unmöglich, dass die von uns untersuchten Peptide mit einer Länge von 9 Aminosäuren an MHC II binden. So konnte man zeigen, dass nur geringe strukturelle Anforderungen für MHC II Liganden bestehen. Unter diesen Bedingungen können sogar sehr kurze Peptide mit einer Länge von 6 Aminosäuren präsentiert werden, T Zellen aktivieren und zur Entstehung einer EAE führen (234). Ferner bestehen Hinweise, dass es gerade schwach bindende MHC Liganden sind, die Toleranzmechanismen entgehen und so die Entwicklung von EAE und anderen Autoimmunerkrankungen bewirken (235,236). Dies wird durch Abbildung 4.5 veranschaulicht. Liu et al. konnten nachweisen, dass Ac1-9, ein immunogenes MBP-Epitop, welches I-A^u in PL/J Mäusen mit geringer Affinität bindet, nicht in der Lage ist, sich entwickelnde T Zell-Populationen zu modulieren, während stärker affine Varianten durchaus in der Lage sind, eine Depletion entsprechender autoreaktiver Klone herbeizuführen (237). Dies geht Hand in Hand mit der Beobachtung, dass hochaffine Varianten wie Ac1-11(4A) zwar in vitro sehr effizient Zellen stimulieren, jedoch nicht in

der Lage sind, eine Immunantwort in vivo auszulösen. Die schwach bindende Variante Ac1-11 hingegen kann EAE auslösen (238,239). Von anderen Gruppen wird hingegen postuliert, dass Sequenzen, welche immunogen wirken, eher gut an MHC Moleküle binden (175,240).

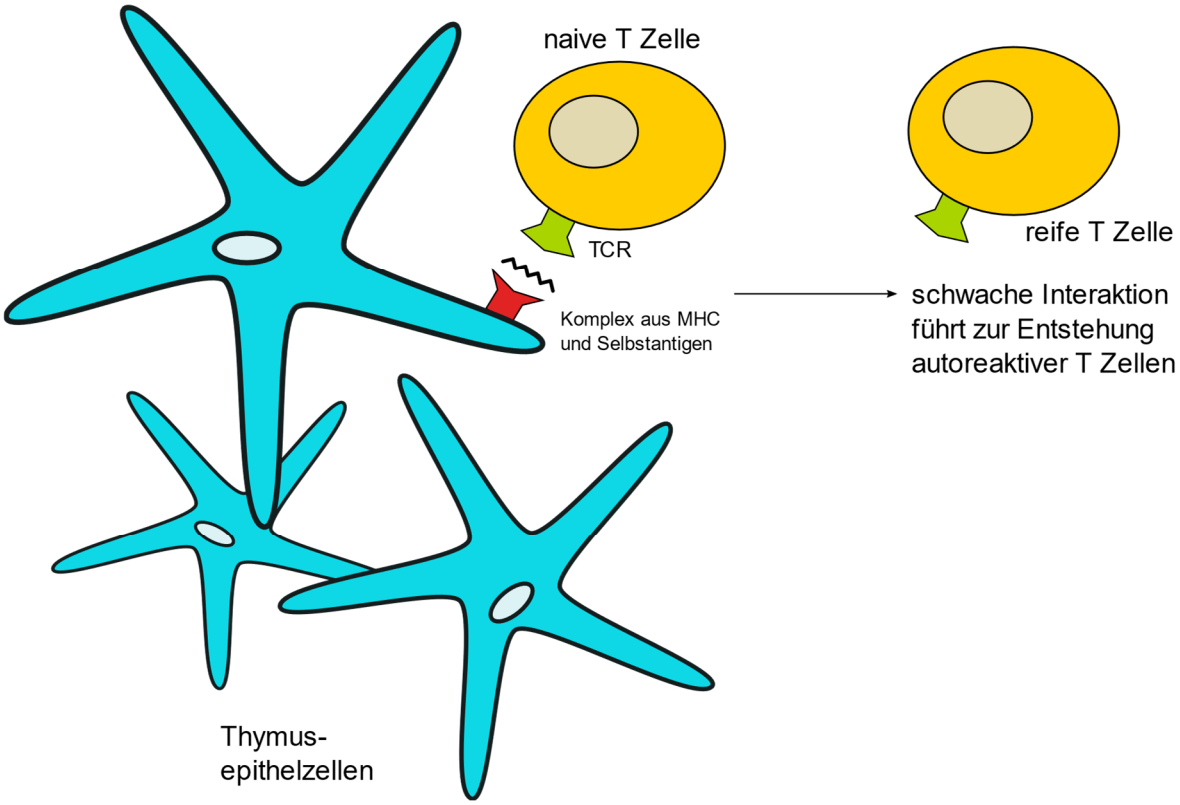


Abbildung 4.5: Fehlerhafte Negative Selektion

Besitzt das präsentierte Peptid nur eine schwache Affinität zum MHC Molekül, kann keine ausreichend starke Interaktion zwischen dem TCR und dem Peptid-MHC-Komplex zustande kommen. In der Folge überleben autoreaktive T Zellen, welche zur Entstehung von Autoimmunerkrankungen wie der MS führen können.

Bislang ist unbekannt, ob die in dieser Studie verwendeten Peptide starke oder schwache MHC II Liganden sind. Vorausgesetzt sie besitzen eine schwache Affinität zum MHC-Rezeptor, wäre es jedoch denkbar, dass peptidspezifische T Zellen existieren, die der Induktion von Toleranz entkommen sind. Diese erkennen die präsentierten Peptide, reagieren mit einer gesteigerten Zytokinsekretion und triggern eine Autoimmunreaktion in Patienten mit MS.

4.4.3 Präsentation von Peptiden auf MHC I und MHC II unter natürlichen und experimentellen Bedingungen

Die Peptid-MHC-Komplexe, aus denen schließlich die für diese Arbeit verwendeten Peptide eluiert wurden, waren post mortem aus Hirngewebe von drei an MS erkrankten Patienten isoliert worden (122). Die genaue Herkunft der Peptide war zunächst nicht weiter spezifiziert worden. Im Versuch hingegen entstammt das Peptid, welches präsentiert werden soll, dem Extrazellulärraum. In der Einleitung wurde beschrieben, wie MHC Moleküle normalerweise beladen werden und das Prinzip der Kreuzpräsentation erläutert. Während MHC I intrazelluläre Peptide präsentiert, werden extrazelluläre Antigene in der Regel auf MHC II geladen (90–93). Eine Präsentation auf MHC II erscheint unter den artefiziellen Bedingungen des Assay also die naheliegendste Möglichkeit zu sein. Im ZNS allerdings, wo Neurone und Oligodendrozyten residieren, könnte das Peptid von diesen selbst auch auf MHC I präsentiert werden. MHC I wird physiologisch unter anderem im sich entwickelnden ZNS exprimiert und ist ferner bedeutsam für Neuroplastizität (241,242). Unter entzündlichen Bedingungen kann die MHC I Expression auf Oligodendrozyten und Astrozyten jedoch stark hochreguliert werden (96,243). Ein Beispiel stellt die Infektion mit Theiler´s murine encephalomyelitis virus, einer demyelinisierenden Modellerkrankung für die MS, dar. Diese führt sowohl bei suszeptiblen als auch resistenten Mausstämmen zu einer Hochregulation von MHC I. Bei Tieren, welche erkranken, persistiert dieser Zustand allerdings (244). Unter entzündlichen Bedingungen im ZNS ist es also wahrscheinlich, dass die untersuchten Peptide auf MHC I präsentiert wurden und zytotoxische T Zellen aktivierten. Intrazelluläre Peptide, die ja normalerweise nur auf MHC I geladen werden, können durch Kreuzpräsentation allerdings auch auf MHC II gelangen.

In gesunden adulten Gehirnen finden sich geringe Mengen MHC II in den Meningen und der Neurohypophyse, während es in der Großhirnrinde selten anzutreffen ist (245). Bei erkrankten Personen wurde MHC II jedoch auf Mikroglia und Makrophagen in entzündlichen und degenerativen Läsionen gefunden. Oligodendrozyten und Astrozyten hingegen exprimierten kein MHC II und nur wenig MHC I (99,245). Andere Quellen fanden jedoch, dass HLA-DR auf normalen Astrozyten vorkommt und durch IFN-γ, also auch im entzündeten Gehirn, vermehrt exprimiert wird (246).

Somit könnten zwar $CD4^+$ T Zellen spezifisch für ZNS Antigene in der Peripherie vorhanden sein, wo sie der Blutentnahme zugänglich sind und für den ELISpot Assay

entnommen wurden. Es ist jedoch nicht ausgeschlossen, dass die Immunreaktion im ZNS hauptsächlich MHC I getrieben war.

4.4.4 ZNS-Milieu

Ein weiterer Punkt, der beachtet werden muss, ist, dass im ZNS ein anderes Milieu herrscht als in der Peripherie, welche durch Untersuchung der im Blut vorhandenen PBMCs zugänglich ist, sodass Schlussfolgerungen nur bedingt möglich sind (240). Dieses Milieu wird im gesunden Zustand durch die Blut-Hirn-Schranke aufrechterhalten. Endothelzellen, Perizyten, Astrozyten und auf jeder Seite eine Basalmembran sowie tight junctions, die den parazellulären Weg versperren, hindern Pathogene, periphere Immunzellen und potenziell neurotoxische Substanzen am Eintritt ins ZNS. Viele spezifische Carrier ermöglichen jedoch den kontrollierten Austausch von Stoffwechselprodukten, um das homöostatische Gleichgewicht im ZNS aufrecht zu erhalten. Im Falle einer Entzündung des ZNS, sei es durch Infektionen oder Autoimmunerkrankungen, ist diese Barriere allerdings gestört – häufig schon vor dem Auftreten der ersten Symptome (247). Die Endothelzellen zeigen dann Chemokine auf ihrer Oberfläche, welche peripheren Immunzellen den Eintritt ins ZNS erleichtern (248). Auch tight junctions und Basalmembran sind in ihrer Funktion gestört, was ebenfalls zu einer Verstärkung des Entzündungsgeschehens und zur Behinderung von Regenerationsprozessen führen kann (249,250). Im akuten Schub befinden sich also die meisten Effektorzellen am Ort des entzündlichen Geschehens. Auch im Tiermodell wandern $CD4^+$ Zellen mit Erkrankungsbeginn ins ZNS ein, während sie im Blut nur noch in geringer Anzahl nachweisbar sind (251). Um die Immunantwort hinsichtlich der HLA-Restriktion zu untersuchen, wäre es demnach sinnvoll, Liquor zu gewinnen und daraus Zellen für den ELISpot Assay aufzureinigen. Einige Autoren beschreiben jedoch, dass direkte Lymphabflusswege aus dem ZNS in zervikale Lymphknoten bestehen und somit Zellen und Effektormoleküle wieder in die Peripherie gelangen können (252,253). Daher ist die Annahme gerechtfertigt, dass PBMCs das Zellrepertoire im ZNS ausreichend gut darstellen.

Wenngleich im ELISpot Assay also nicht ganz ideal die Bedingungen im ZNS abgebildet werden, so wurde doch eine MHC II Restriktion der untersuchten Antigene gezeigt. Somit lässt sich schlussfolgern, dass in den untersuchten Individuen $CD4^+$ Populationen präsent sind, die Autoantigene erkennen. Hinweise auf die Rolle von

$CD4^+$ T Zellen, insbesondere Th1 und Th17, und der Risikoallele HLA-DR15 und -DQ6 in der Pathogenese der MS wurden bereits oben erläutert.

4.4.5 Alternative Ansätze zur Restriktionsbestimmung

Zwar kann im ELISpot Assay eine Aussage darüber gemacht werden, ob ein bestimmter HLA Typ an der Präsentation des Antigens beteiligt gewesen ist, jedoch könnten sich im ZNS und dem dortigen Milieu ganz andere Vorgänge abspielen als in vitro. Daher wäre es sinnvoll, die Fragestellung zusätzlich im Tierversuch zu untersuchen.

Hierzu werden transgene Mäuse benötigt, welche einen bestimmten humanen HLA-Haplotyp exprimieren. Zusätzlich zum HLA muss noch ein humanes CD4-Transgen eingeführt und murines MHC II entfernt werden (254,255). Mittels solcher Modelle lässt sich die HLA-Restriktion gegebener Epitope bestimmen und sie korrelieren sehr gut mit der humanen T Zell-Antwort (256). So wurde etwa der Beitrag von HLA-DR und von HLA-DQ Allelen zur Erkrankungswahrscheinlichkeit an MS, deren Kopplungsungleichgewicht beim Menschen eine Einschätzung erschwert, mithilfe eines von Luckey et al. generierten Mausmodells erforscht. Dabei konnte gezeigt werden, dass HLA-DR für die Entstehung der Erkrankung unbedingt wichtig ist und dass verschiedene HLA-DQ Allele modulierende oder verschlimmernde Effekte haben können (42).

Eine weitere Möglichkeit ist die Beeinflussung der Expression bestimmter Gene auf Ebene der Translation mittels siRNA. Beispielsweise wurde ein Knockdown von HLA Klasse I in T Zellen ebenfalls beschrieben (257). Auch DCs können nach geringfügigen Modifikationen siRNA aufnehmen. Brück et al. zeigten, dass durch targeting von p40 in vivo die IFN-γ und IL-17A Expression ZNS-infiltrierender Zellen und die Entwicklung von EAE verhindert werden konnte (258). Durch Knockdown von CD40 und IL-23 in DCs produzierten diese mehr IL-10, was mit einer geringeren Erkrankungsschwere assoziiert war (259). Das Eingreifen mittels siRNA stellt also einen etablierten Ansatz zur Erforschung der Rolle einzelner Faktoren bei demyelinisierenden ZNS-Erkrankungen dar und könnte zur Erforschung der HLA-Restriktion bestimmter Autoantigene eingesetzt werden. Zur Unterbindung der MHC I oder MHC II Expression könnten NLRC5/class I transactivator oder CIITA entsprechende Angriffspunkte darstellen (97).

Mit CRISPR/Cas9 steht seit einigen Jahren eine potente und für bestimmte Fragestellungen überlegene Alternative zur siRNA zur Verfügung, welche ein gezieltes „genome editing“ ermöglicht (260–263). Abrahimi et al. beschreiben die Unterbindung der MHC II Expression durch targeting des Klasse II Transaktivator Gens mittels CRISPR/Cas9 (264).

4.5 Korrelation der peptidspezifischen Reaktivität mit dem HLA-Haplotyp

Zahlreiche genetische Studien haben die Bedeutung von HLA-DR bei der Entstehung von MS gezeigt. HLA-DRB1*1501 ist das wichtigste und zuerst entdeckte Risikoallel für die Entwicklung einer MS. Auch der Verlauf der Erkrankung kann beeinflusst werden, was bereits weiter oben ausführlich dargelegt wurde (10,35,36,40–42).

Wir konnten beobachten, dass sich die Anzahl IFN-γ und IL-17A sezernierender Zellen im aktiven Schub zwischen Trägern von HLA-DRB1*1501 und Patienten ohne dieses Allel signifikant unterscheidet, wobei HLA-DRB1*1501 positive Patienten weniger Zytokin sezernierende Zellen aufwiesen. Hingegen konnte bei HLA-DRB1*1501 positiven Patienten in Remission eine höhere Zahl IFN-γ sezernierender Zellen im Vergleich zu HLA-DRB1*1501 negativen Patienten in Remission gemessen werden. Hinsichtlich der Restriktion der untersuchten Antigene zeigte sich kein Unterschied zwischen Trägern und Nicht-Trägern des Risikoallels HLA-DRB1*1501. Bei beiden Gruppen war eine MHC II Restriktion zu beobachten.

Jelcic et al. fanden eine vermehrte autologe Proliferation von $CD4^+$ T Zellen bei HLA-$DR15^+$ im Vergleich zu HLA-$DR15^-$ Patienten in Remission. Diese autolog proliferierenden T Zellen tragen brain-homing Moleküle und können Antigene, welche in MS Läsionen präsentiert werden, erkennen. Im akuten Schub zeigte sich hingegen eine verminderte Proliferation (77). Diese Beobachtung kann erklärt werden, wenn man davon ausgeht, dass autoimmunpathogene Zellen im Schub vermehrt ins ZNS wandern. Auch in der vorliegenden Arbeit, welche ausschließlich periphere Zellen untersucht hat, ist die Anzahl Zytokin sezernierender Zellen bei HLA-$DR15^+$ Patienten im aktiven Schub im Vergleich zu Patienten, die dieses Risikoallel nicht tragen, vermindert. Bei in Remission befindlichen Patienten weisen hingegen die HLA-$DR15^+$ Personen eine größere Zahl Antigen spezifischer Zytokin sezernierender Zellen auf.

Im Gegensatz hierzu beobachteten Mohme et al. eine gesteigerte autologe Proliferation von T Zellen bei Trägern des Risikoallels HLA-DR15. Diese war vor allem

von $CD4^+$ T Zellen dominiert. Ein signifikanter Unterschied ergab sich in dieser Studie jedoch nur zwischen HLA-$DR15^-$ Kontrollpersonen und HLA-$DR15^+$ Patienten (265).

5. Zusammenfassung und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde funktionell die MHC Restriktion mittels Blockade durch spezifische Antikörper für drei neue Autoantigene der MS untersucht. Dabei konnte eine MHC II Restriktion der untersuchten Epitope im IFN-γ ELISpot sowie HLA-DR Restriktion im IL-17A ELISpot gezeigt werden. Dies bestätigt erneut die wesentliche Bedeutung von $CD4^+$ T Zellen in der Pathogenese der MS. Außerdem wurden Unterschiede in der Zahl Zytokin sezernierender Zellen zwischen HLA-DRB1*1501-positiven und -negativen Patienten, die gerade einen Schub der Erkrankung erlitten, festgestellt. Dies bekräftigt die Stellung von HLA-DRB1*1501 als Risikoallel und zeigt, dass dessen aberrierende Funktion Einfluss auf den Krankheitsverlauf nehmen kann.

Die Interaktion zwischen dem Peptid-MHC-Komplex und dem TCR stellt außerdem ein vielversprechendes Target für neue Therapieansätze dar, was unter anderem auch Gegenstand aktueller Forschung ist. Sogenannte „altered peptide ligands“ (APL) können, sofern sie ihre Spezifität für den betreffenden TCR beibehalten, immunmodulatorisch wirken, indem sie die T Zell-Antwort beeinflussen (266–268). APL induzieren bei Bindung an den TCR keine Proliferation und induzieren bei nachfolgender Stimulation mit dem immunogenen Peptid Anergie (269,270). Die Applikation von MBP verwandten APL, die besonders stark an die entsprechenden MHC II Moleküle binden, kann der EAE-Entwicklung in vivo vorbeugen (271,272). Jedoch wurden auch unerwünschte Effekte beobachtet. Bielekova et al. beobachteten in einer Phase II klinischen Studie Hypersensitivitätsreaktionen und Exazerbation der MS. Diese waren auf eine T Zell-Aktivierung gegen den APL und Kreuzreaktivität mit dem nativen Antigen zurückzuführen (273). Eine andere Möglichkeit ist die Blockade von MHC II durch spezifische Peptide, welche die Bindung des Autoantigens an MHC II und somit letztendlich die Aktivierung und Proliferation von T Zellen verhindern (274). Weissert et al. fanden, dass die Immunisierung mit einem Peptid, welches eine sehr starke Affinität zu MHC II besitzt, der Entstehung von EAE vorbeugen kann. Im Gegensatz zu den APL liegt hierbei keine Sequenzhomologie zum Autoantigen vor (275). Dadurch ist das Problem der Aktivierung durch Kreuzreaktivitäten autoantigener T Zell-Populationen gebannt. Auch spezifische Antikörper stellen einen vielversprechenden Therapieansatz dar. Neumann et al. zeigten anhand des SSX2 103-111/HLA-A*0201 Komplexes, dass Antikörper, welche spezifisch mit diesem

interagieren, T Zell-Antworten blockieren können. Hierfür muss der Antikörper jedoch eine höhere Affinität zum Peptid-MHC Komplex besitzen als der entsprechende TCR (276).

Mit der Untersuchung der HLA-Restriktion von drei erst kürzlich entdeckten Autoantigenen trägt die vorliegende Arbeit zum Verständnis der pathogenetischen Mechanismen, welche zur Entstehung der MS führen, bei. Je umfassender dies gelingt, desto eher können neue und spezifischere Therapieoptionen, wie etwa APL, etabliert werden. Die Erforschung von potenziellen Autoantigenen und deren Erkennung durch ein fehlgeleitetes Immunsystem liefert hierzu einen Beitrag.

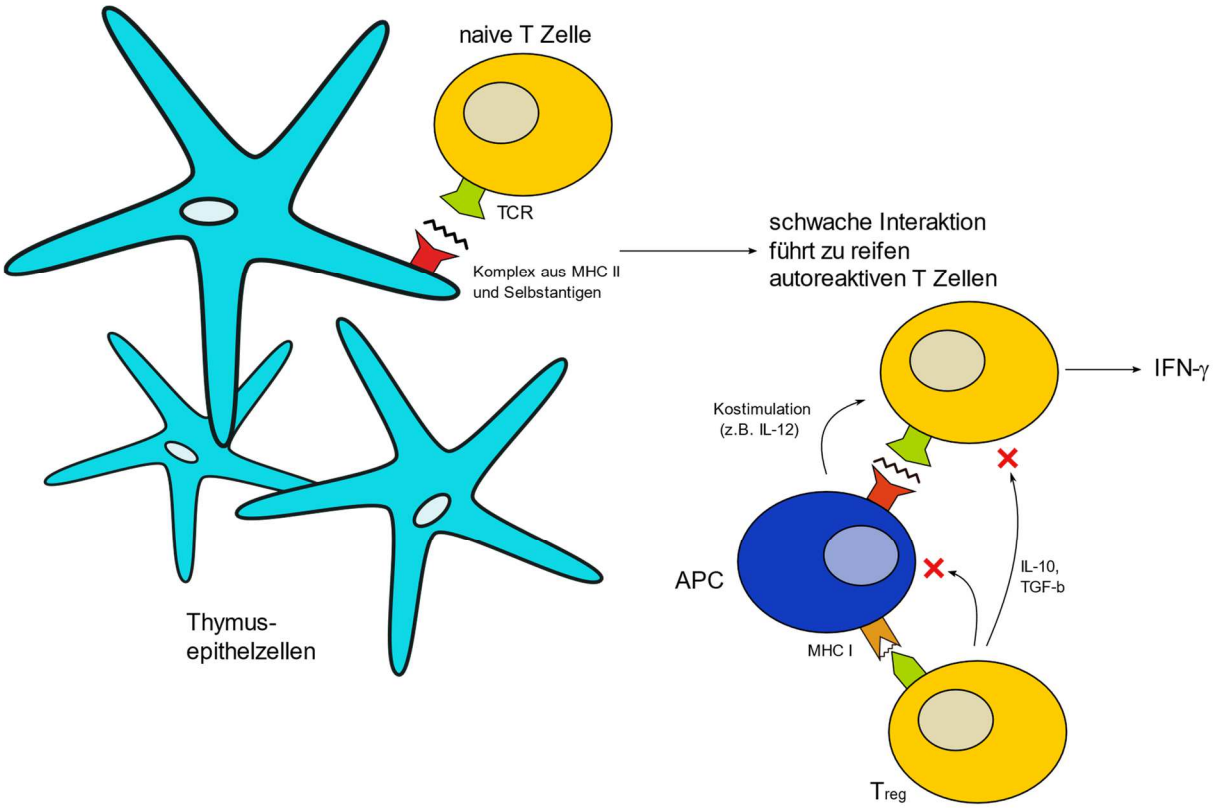
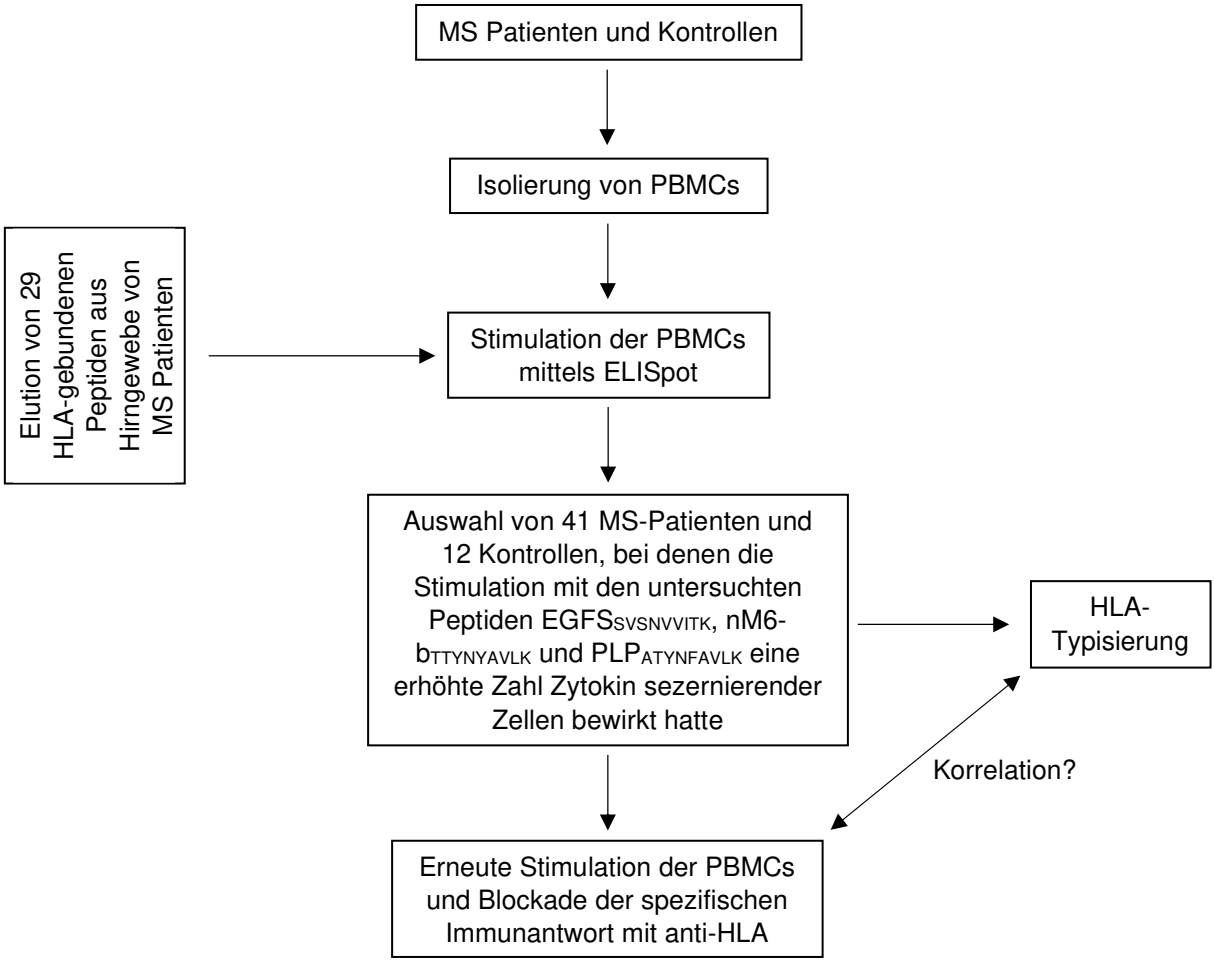


Abbildung 5.1: Übersicht

6. Anhang

6.1 Flowchart zur vorliegenden Arbeit



6.2 Abkürzungsverzeichnis

ALA	α-Linolensäure
APC	Antigenpräsentierende Zellen
APL	Altered Peptide Ligands
BMI	Body Mass Index
CII TA	MHC transactivator
CD	Cluster of differentiation
CDR	Complementarity determining region
CIS	Clinically isolated syndrome
CMV	Zytomegalievirus
DC	Dendritische Zelle

DMSO	Dimethylsulphoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EAE	Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis
EBV	Epstein-Barr Virus
EDSS	Expanded Disability Status Scale
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFS	Epidermal growth factor receptor substrate
ELISpot	Enzyme Linked Immuno Spot Assay
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FBS	Fetal bovine serum
HERV	Humane endogene Retroviren
HHV-6	Humanes Herpesvirus 6
HIV	Humanes Immunodefizienz Virus
HLA	Human leucocyte antigen
HRQOL	Health-Related Quality of Life
HSV	Herpes simplex Virus
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
ILC	Innate lymphoid cell
JC	John Cunningham
MIIC	MHC class II-enriched compartment
mAb	Monoklonaler Antikörper
MBP	Myelin basic protein
MHC	Major Histocompatibility Complex
MOG	Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein
MRT	Magnetresonanztomographie
MS	Multiple Sklerose
NK Zellen	Natürliche Killerzellen
nM6-b	Neuronal membrane glycoprotein M6-b
NLRC5	NOD-like receptor family CARD domain containing 5 Class II
PBMCs	Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes

PBS	Phosphate buffered saline
PHA	Phytohämagglutinin
PLP	Proteolipidprotein
pMHC	Peptid-MHC-Komplex
PP-MS	Primary progressive MS
PR-MS	Progressive relapsing MS
PRSS2	Protease Serine 2
RFX	Regulatory factor X
rpm	Revolutions per minute
RR-MS	Relapsing remitting MS
RNA	Ribonukleinsäure
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SEM	Standard error of the mean
SERT	Serotonintransporter
siRNA	Short interfering RNA
SNP	Single nucleotide polymorphism
SP-MS	Secondary progressive MS
TAP	Transporter associated with antigen processing
TCR	T Zell Rezeptor
Tg-Mäuse	Transgene Mäuse
TGF	Transforming growth factor
TNF	Tumornekrosefaktor
T_{reg}	Regulatorische T Zellen
VLA-4	Very late antigen 4
VZV	Varizella Zoster Virus
ZNS	Zentrales Nervensystem

6.3 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1	Regulatorische T Zellen	S. 16
Abbildung 1.2	MHC Moleküle	S. 20
Abbildung 1.3	Toleranzinduktion im Thymus	S. 25
Abbildung 1.4	PLP und DM-20	S. 28
Grafik 3.1	Titration von EGFS$_{SVSNVVITK}$ und PLP$_{ATYNFAVLK}$ im IFN-γ ELISpot	S. 45
Grafik 3.2	Titration von EGFS$_{SVSNVVITK}$, nM6-b$_{TTYNYAVLK}$ und PLP$_{ATYNFAVLK}$ im IL-17A ELISpot	S. 48
Grafik 3.3	Einfluss von DMSO und Antikörpern auf die Zahl IFN-γ sezernierender Zellen	S. 50
Grafik 3.4	Peptidspezifische Reaktivität im IFN-γ ELISpot	S. 52
Grafik 3.5	HLA-Restriktion von EGFS$_{SVSNVVITK}$ und PLP$_{ATYNFAVLK}$ im IFN-γ ELISpot	S. 53
Grafik 3.6	Einfluss von DMSO und Antikörpern auf die Zahl IL-17A sezernierender Zellen	S. 55
Grafik 3.7	Peptidspezifische Reaktivität im IL-17A ELISpot	S. 56
Grafik 3.8	HLA-Restriktion von EGFS$_{SVSNVVITK}$, nM6-b$_{TTYNYAVLK}$ und PLP$_{ATYNFAVLK}$ im IL-17A ELISpot	S. 58
Grafik 3.9	Gepoolte Reaktivität im IFN-γ ELISpot in Abhängigkeit vom HLA-Typ	S. 61
Grafik 3.10	Gepoolte Reaktivität im IL-17A ELISpot in Abhängigkeit vom HLA-Typ	S. 63
Grafik 3.11	MHC II Restriktion in Abhängigkeit vom HLA-BRB1*1501 Haplotyp	S. 65
Abbildung 4.1	Immunogenität von PLP-Epitopen bei MS Patienten und Kontrollpersonen	S. 70
Abbildung 4.2	Präsentation eines Antigens auf MHC II und Erkennung desselben durch eine spezifische T Zelle	S. 76
Abbildung 4.3	Blockade der Antigenpräsentation durch MHC II spezifischen Antikörper	S. 77
Abbildung 4.4	MHC Moleküle	S. 78
Abbildung 4.5	Fehlerhafte Negative Selektion	S. 79
Abbildung 5.1	Übersicht	S. 86

6.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1	Deskriptive Statistik aller Studienteilnehmer	S. 32
Tabelle 2.2	Deskriptive Statistik aller im IFN-γ ELISpot untersuchten Personen	S. 33
Tabelle 2.3	Deskriptive Statistik aller im IL-17A ELISpot untersuchten Personen	S. 34
Tabelle 3.1	Titration von EGFS$_{SVSNVVITK}$ im IFN-γ ELISpot	S. 46
Tabelle 3.2	Titration von nM6-b$_{TTYNYAVLK}$ im IFN-γ ELISpot	S. 46
Tabelle 3.3	Titration von PLP$_{ATYNFAVLK}$ im IFN-γ ELISpot	S. 46
Tabelle 3.4	Titration von EGFS$_{SVSNVVITK}$ im IL-17A ELISpot	S. 49
Tabelle 3.5	Titration von nM6-b$_{TTYNYAVLK}$ im IL-17A ELISpot	S. 49
Tabelle 3.6	Titration von PLP$_{ATYNFAVLK}$ im IL-17A ELISpot	S. 49
Tabelle 3.7	Einfluss von DMSO und Antikörpern im IFN-γ ELISpot	S. 51
Tabelle 3.8	Peptidspezifische Reaktivität im IFN-γ ELISpot	S. 52
Tabelle 3.9	MHC-Restriktion von EGFS$_{SVSNVVITK}$ im IFN-γ ELISpot	S. 54
Tabelle 3.10	MHC-Restriktion von PLP$_{ATYNFAVLK}$ im IFN-γ ELISpot	S. 54
Tabelle 3.11	Einfluss von DMSO und Antikörpern im IL-17A ELISpot	S. 55
Tabelle 3.12	Peptidspezifische Reaktivität im IL-17A ELISpot	S. 57
Tabelle 3.13	MHC-Restriktion von EGFS$_{SVSNVVITK}$ im IL-17A ELISpot	S. 59
Tabelle 3.14	MHC-Restriktion von nM6-b$_{TTYNYAVLK}$ im IL-17A ELISpot	S. 59
Tabelle 3.15	MHC-Restriktion von PLP$_{ATYNFAVLK}$ im IL-17A ELISpot	S. 59
Tabelle 3.16	Vergleich der gepoolten Reaktivität im IFN-γ ELISpot abhängig vom HLA-DRB1*1501 Haplotyp bei Patienten im aktiven Schub	S. 62
Tabelle 3.17	Vergleich der gepoolten Reaktivität im IFN-γ ELISpot abhängig vom HLA-DRB1*1501 Haplotyp bei Patienten in Remission	S. 62
Tabelle 3.18	Vergleich der gepoolten Reaktivität im IFN-γ ELISpot abhängig vom HLA-DRB1*1501 Haplotyp bei gesunden Kontrollpersonen	S. 62
Tabelle 3.19	Vergleich der gepoolten Reaktivität im IL-17A ELISpot abhängig vom HLA-DRB1*1501 Haplotyp bei Patienten im aktiven Schub	S. 64

Tabelle 3.20	Vergleich der gepoolten Reaktivität im IL-17A ELISpot abhängig vom HLA-DRB1*1501 Haplotyp bei Patienten in Remission	S. 64
Tabelle 3.21	Vergleich der gepoolten Reaktivität im IL-17A ELISpot abhängig vom HLA-DRB1*1501 Haplotyp bei gesunden Kontrollpersonen	S. 64
Tabelle 4.1	Am Menschen untersuchte PLP-Epitope	S. 68-70

6.5 Materialliste

Verbrauchsmaterialien:	**Bestell-nummer**	**Hersteller/ Lieferfirma**	**Firmensitz**
15 ml Tubes, steril, Cellstar®, PP	188271	Greiner Bio-One	Kremsmünster, Österreich
50 ml Tubes, steril, Cellstar®, PP	227261	Greiner Bio-One	Kremsmünster, Österreich
BRANDplates®, 96-well, pureGrade™ PS, unsteril	781602	Brand	Wertheim, Deutschland
BD Microlance™3 Kanülen 1,2 x 40 mm 18G x 1 1/2	304622	Becton, Dickinson and Company	Franklin Lakes, Vereinigte Staaten
Combitips advanced®, 5.0 ml	0030089-669	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Costar® 2mL Stripette®	4486/ CORN4486	Corning/ Omnilab	New York, Vereinigte Staaten/ Bremen, Deutschland
Cryolabels for Laser Printer	LCRY-1700/ x5481	Diversified Biotech/ Roth	Dedham, Vereinigte Staaten/ Karlsruhe, Deutschland
Cryotubes, steril	121261	Greiner Bio-One	Kremsmünster, Österreich
DNA LoBindTubes	0030108051	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Einmal-Reagenzreservoirs, Bio-pure™	AXC9.1	Roth	Karlsruhe, Deutschland
Eppendorf Safe-Lock Tubes	0030123328	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
ep T.I.P.S Standard 50-1000 µl	0030 000.919	Eppendorf	Hamburg, Deutschland

ep T.I.P.S Standard/Bulk 2-200 µl	0030 000.870	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Filtropur S 0.2	83.1826.001	Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
Haemacytometer-Deckgläser	1184/ L189.1	Thermo Fisher Scientific Gerhard Menzel/ Roth	Braunschweig, Deutschland und Waltham, Vereinigte Staaten/ Karlsruhe, Deutschland
Injectomat Spritze 50 ml, mit Kanüle	9000701	Fresenius Kabi	Bad Homburg, Deutschland
Kleenex® Kosmetiktücher	21400	Kimberley-Clark Professional®	Roswell, Vereinigte Staaten
Laborhandschuhe Peha-soft® nitrile fino powderfree S, M	9421964, 9421974	Hartmann	Heidenheim, Deutschland
Microcentrifuge Tubes, sterile, 0,5 ml	3633-875/ 211-0122	Labcon/ VWR	Petaluma, Vereinigte Staaten/ Radnor, Vereinigte Staaten
Microcentrifuge Tubes, sterile, 1,5 ml	3613-875/ 211-0091	Labcon/ VWR	Petaluma, Vereinigte Staaten/ Radnor, Vereinigte Staaten
Millex-GV Filter, 0,22 µm, PVDF, 13 mm	SLGV013SL	Merck Millipore	Billerica, Vereinigte Staaten
Millex-HV Filter, 0,45 µm, PVDF, 13 mm	SLHV013SL	Merck Millipore	Billerica, Vereinigte Staaten
Nalgene™ Kryoröhrchen für die Langzeitlagerung	5000-0020	Thermo Fisher Scientific	Waltham, Vereinigte Staaten
NuncEasYFlask 75cm²	156800	Thermo Fisher Scientific	Waltham, Vereinigte Staaten
Nunc™ MicroWell™ Platten mit Nunclon™ Delta Oberfläche	163320	Thermo Fisher Scientific	Waltham, Vereinigte Staaten
Pipettenspitzen 20 µl, farblos	70.1116	Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
Pipettenspitzen lose 2-200 µl	732008/ 6132323	Brand/ VWR	Wertheim, Deutschland/ Radnor, Vereinigte Staaten
Pipettenspitzen lose 5-300 µl	732010/ 6132324	Brand/ VWR	Wertheim, Deutschland/ Radnor, Vereinigte Staaten

Rotilabo® -Aluminiumfolie	1770.1	Roth	Karlsruhe, Deutschland
SafeSealSurPhob Spitzen, 1250 µl, steril	VT0270	Biozym	Hessisch Oldendorf, Deutschland
Serological Pipette, sterile 5 ml	606160	Greiner Bio-One	Kremsmünster, Österreich
Serological Pipette, sterile 10 ml	607160	Greiner Bio-One	Kremsmünster, Österreich
Serological Pipette, sterile 25 ml	760107	Greiner Bio-One	Kremsmünster, Österreich
Sicherheitsmonovette Serum-Gel 7,5 ml	01.1602	Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
S-Monovette 9ml K3E	02.1066.001	Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
Transferpipette 3,5 ml	86.1171.001	Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
Zellkulturschale, PS, 145/20 mm, steril, CELLSTAR®	639160	Greiner Bio-One	Kremsmünster, Österreich

Kits:	**Bestell-nummer**	**Hersteller/ Lieferfirma**	**Firmensitz**
Human IFN-γELISpot^{PRO} (ALP); Contents: Enzyme-conjugated detection mAb (7-B6-1-ALP), Positive control (anti-CD3 mAb), Substrate (BCIP/NBT-plus), 10 Pre-coated white plates (mAb 1-D1K)	3420-2APW-10	Mabtech	Nacka Strand, Schweden
Human IL-17A ELISpot^{PLUS} (ALP); Contents: Biotinylated detection mAb (MT504), Streptavidin-ALP, anti-CD3 mAb, Substrate (BCIP/NBT-plus), 10 Pre-coated white plates (mAb MT44.6)	3520-4APW-10	Mabtech	Nacka Strand, Schweden

Chemikalien, Zellkulturmedien und Zusätze:	**Bestellnummer**	**Hersteller/ Lieferfirma**	**Firmensitz**
Dimethylsulphoxide	D2438	Sigma-Aldrich	St. Louis, Vereinigte Staaten
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS)	D8537	Sigma-Aldrich	St. Louis, Vereinigte Staaten
Ethanol, Rotipuran® ≥ 99,8 %, p.a.	9065.1	Roth	Karlsruhe, Deutschland
Fetal bovine serum 500 ml Lot Nr. 0317A	S 0115	Biochrom - Harvard Bioscience	Holliston, Vereinigte Staaten
Heparin-Natrium 25.000 I.E.		Ratiopharm	Ulm, Deutschland
HLA-DP/DR/DQ Antikörper (PdV5.2)	sc-130013 L	Santa Cruz Bio-technology	Dallas, Vereinigte Staaten
HLA-DQ Antibody (MHC II) [clone SPV-L3]	V2581SAF-100UG	NSJ Bio-reagents	San Diego, Vereinigte Staaten
L-Glutamin 200 mM, 100ml	25030081	Thermo Fisher Scientific	Waltham, Vereinigte Staaten
Lymphoprep 500 ml	07851	Stemcell Technolo-gies	Vancouver, Canada
Penicillin / Streptomycin 100ml	15140122	Thermo Fisher Scientific	Waltham, Vereinigte Staaten
Phytohemagglutinin-M Phaseolus Vulgaris	526511/CALB526511-20mg	Merck Millipore (Calbiochem)/ VWR	San Diego, Vereinigte Staaten/ Radnor, Vereinigte Staaten
RNeasy Micro Kit (50)	74004	Qiagen	Hilden, Deutschland
RPMI Medium 1640, 500ml	21875-034	Thermo Fisher Scientific	Waltham, Vereinigte Staaten
Trypanblau (C.I. 23850)	CN76.1	Roth	Karlsruhe, Deutschland
Türks Lösung	1092770100	Merck Millipore	Billerica, Vereinigte Staaten
Ultra-LEAF™ Purified anti-human HLA-A,B,C Antibody	311428	Bio Legend	San Diego, Vereinigte Staaten
Ultra-LEAF™ Purified anti-human HLA-DR Antibody	307648	Bio Legend	San Diego, Vereinigte Staaten

Ultra-LEAF™ Purified Mouse IgG2a, κ Isotype Ctrl Antibody	400264	Bio Legend	San Diego, Vereinigte Staaten
Ultra Pure Water, sterile	L0015	Biochrom	Holliston, Vereinigte Staaten

Medien:	**Zusammensetzung**
Einfriermedium	80% Zellmedium + 20 % DMSO
Zellmedium	RPMI-Medium + 10% FBS + 1% L-Glutamin + 1% Penicillin / Streptomycin

Peptid Nummer:	**Sequenz**	**Protein**	**Abkürzung**	**Quantität**	**Lagerung**
6	SVSNVVITK	Epidermal growth factor receptor substrate 15	EGFS	20 mg / 1 ml	-20 °C
7	TTYNYAVLK	Neuronal membrane glycoprotein M6-b	nM6-b	20 mg / 1 ml	-20 °C
10	ATYNFAVLK	Myelin Proteolipid Protein	PLP	20 mg / 1 ml	-20 °C

Anti-körper Nummer	**Klon**	**Hersteller**	**Spezifität**	**Isotyp**	**Reinheit**	**Quantität**	**Lagerung**
1	MOPC-173	BioLegend	isotype control	Mouse IgG2a, κ	Ultra-LEAF™ (low endo-toxin, azide-free)	1 mg / 1 ml	4 °C
2	W6/32	BioLegend	anti-human HLA-A,B,C	Mouse IgG2a, κ	Ultra-LEAF™ (low endo-toxin, azide-free)	1 mg / 1 ml	4 °C
3	PdV5.2	Santa Cruz Bio-technology	anti-human HLA-DP/DR/DQ	Mouse mono-clonal IgG_1 (κ light chain)	azide-free	200 µg / 0,1 ml	4 °C
4	L243	BioLegend	anti-human HLA-DR	Mouse IgG2a, κ	Ultra-LEAF™ (low endo-toxin, azide-free)	1 mg / 1 ml	4 °C
5	SPV-L3	NSJ Bio-reagents	anti-human, anti-pig HLA-DQ	Mouse mono-clonal IgG2a, κ	BSA-free, sodium azide-free	100 µg / 0,1 ml	-20 °C

Geräte:	**Bestellnummer**	**Hersteller/ Lieferfirma**	**Firmensitz**
Autoclav VE 150		Systec	Linden, Deutschland
Centrifuge 5810 R		Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Centrifuge 5418 R		Eppendorf	Hamburg, Deutschland
ELISpot Reader		AID	Straßberg, Deutschland
Eppendorf Research® plus, 8-Kanal, 10 – 100 µL	3122000035	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Eppendorf Research® plus, Einkanal, 0.1 – 2.5 µL	3120000011	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Eppendorf Research® plus, Einkanal, 0.5 – 10 µL	3120000020	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Eppendorf Research® plus, Einkanal, 2 – 20 µL	3120000038	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Eppendorf Research® plus, Einkanal, 10 – 100 µL	3120000046	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Eppendorf Research® plus, Einkanal, 20 – 200 µL	3120000054	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Eppendorf Research® plus, Einkanal, 100 – 1000 µL	3120000062	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Flüssigkeits-Absaugsystem BVC control	727201	Vacubrand	Wertheim, Deutschland
Inkubator HERA cell 150	51026280	Thermo Fisher Scientific	Waltham, Vereinigte Staaten
Kaltlichtquelle KL 1500	150.200	Schott	Mainz, Deutschland
Kühlschrank, Forma 900 Series (Modell 905)		Thermo Fisher Scientific	Waltham, Vereinigte Staaten
Kühlschrank, Liebherr Premium		Liebherr	Bulle, Schweiz
Kühlschrank Liebherr TGS 5200 (Profi Line)		Liebherr	Bulle, Schweiz
Kühlschrank Tischmodell, Liebherr KT 1830 (Comfort Line)		Liebherr	Bulle, Schweiz

Mikroskop OLYMPUS CK30-200		Olympus	Shinjuku, Japan
Multipette®plus	4982000012	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Neubauer-improved Counting Chamber	0640010	Superior Marienfeld	Lauda-Königshofen, Deutschland
Pipetboy	155 016	Integra	Biebertal, Deutschland
Scotsman ICE System		Scotsman	Mailand, Italien
Solartaschenrechner	LN01.1	Roth	Karlsruhe, Deutschland
Stereomikroskop MS5		Leica	Wetzlar, Deutschland
Sicherheitswerkbank Herasafe KS12		Thermo Fisher Scientific	Waltham, Vereinigte Staaten
Stickstofflagerbehälter Cryotherm Apollo®		Kryotherm	Kirchen, Deutschland
Stickstofftank Espace 331, Gaz		Air Liquide	Paris, Frankreich
Transferpette® -12, 30-300 µl	703632	Brand	Wertheim, Deutschland
Varifuge 3.0 R		Heraeus	Hanau, Deutschland
Vortex-Reagenzglasmixer	7-2020	neoLab	Heidelberg, Deutschland
Wärme- und Trockenschrank, ED115 Binder, Tuttlingen		Binder	Tuttlingen, Deutschland
Wasserbad	WB07	A. Hartenstein	Burgwedel, Deutschland

Software:	**Hersteller**	**Firmensitz**
AID EliSpot Software Version 6.x	Advanced Imaging Devices	Straßberg, Deutschland
Microsoft® Office Excel® 2007	Microsoft Corporation	Redmond, Vereinigte Staaten
GraphPad Prism 7	GraphPad Software	La Jolla, Kalifornien, Vereinigte Staaten

6.6 Tabellen

Tabelle 6.1: Charakteristika der Studienteilnehmer

EDSS = expanded disability status scale, RRMS = relapsing remitting multiple sclerosis, SPMS = secondary progressive multiple sclerosis, PPMS = primary progressive multiple sclerosis, ADEM = acute disseminated encephalomyelitis, CIS = clinically isolated syndrome, RIS = radiologically isolated syndrome, m = männlich, w = weiblich, J = Jahre, M = Monate, +/+ = homozygot positiv, +/- = heterozygot positiv, -/- = negativ, * Patienten, die in Vorversuchen nach Stimulation mit den untersuchten Peptiden eine Aktivierung >200% im Vergleich zur DMSO-Kontrolle gezeigt hatten, A = Screening, B = Blockade von HLA mittels spezifischer Antikörper im IFN-γ ELISpot, C = Titration im IFN-γ ELISpot, D = Blockade von HLA mittels spezifischer Antikörper im IL-17A ELISpot, E = Titration im IL-17A ELISpot, F = Serumanalyse, [1] zum Zeitpunkt der Probenentnahme, [2] von der Studie ausgeschlossen, da Diagnose unklar.

ID	Alter in Jahren	Geschlecht	Krankheits-verlauf	Krankheits-aktivität	Krankheits-dauer	HLA-DRB1*1501	Oligoklona-le Banden	EDSS[1]	Immunmo-dulatori-sche Therapie	Weitere Vorerkran-kungen	Besonder-heiten	Proben ver-wendet für
MS_01	43	w	RRMS	aktiv	17 J	(+/-)	positiv	4	Kortison-Intervall-therapie	Z.n. Resektion eines Ganglio-glioms Höhe BWK 10-12 (1996); Meningeom der hinteren Schädel-grube		B, F
MS_02*	45	m	CIS	aktiv	nicht be-kannt	(-/-)	positiv	1	keine	keine bekannt		B, C
MS_03*	23	w	RRMS	aktiv	10 M	(+/-)	positiv	1,5	Dimethyl-fumarat	keine bekannt		D, E
MS_04*	57	w	SPMS	aktiv	34 J	(+/-)	positiv	6,5	Kortison-Intervall-therapie	keine bekannt	Proben-entnah-me nach Beginn einer Korti-sonstoß-therapie	B
MS_05*	22	m	CIS	aktiv	nicht be-kannt	(-/-)	positiv	1	keine	Psoriasis		B, C
MS_06*	37	m	RRMS	aktiv	1 J	(+/-)	positiv	1,5	Dimethyl-fumarat	keine bekannt		D, E
MS_07*	42	w	RRMS	aktiv	3 M	(+/-)	positiv	2,5	keine	keine bekannt		B
MS_08*	37	w	RRMS	aktiv	3 W	(+/-)	positiv	3	keine	Borderline-Persönlich-keits-störung, rezidivieren-de depressive Verstim-mungen, V.a. PCO-Syndrom		B
MS_09*	58	m	RRMS	aktiv	6 M	(-/-)	negativ	2,5	keine	keine bekannt		B, D, E
MS_10*	27	w	RRMS	aktiv	1,5 J	(-/-)	positiv	1	keine	keine bekannt	Proben-entnah-me nach Beginn	B, C

											einer Korti-sonstoß-therapie	
MS_ 11*	37	w	RRMS	aktiv	1 M	(-/-)	positiv	1	keine	mittel-gradige Trikuspidal-insuffizienz, Z.n. peripherer Pulmonal-embolie		B
MS_ 12*	51	w	RRMS	aktiv	18 J	(-/-)	negativ	4,5	Glatira-mer-acetat	NMDA-R-Enzephalitis		D, E
MS_ 13*	50	w	RRMS	aktiv	8 J	(-/-)	positiv	1	keine	Z.n. mehrmali-gem Bandschei-benprolaps der HWS		D, E
MS_ 14	27	m	RRMS	aktiv	7 J	(+/-)	positiv	1,5	Teriflunomide	keine bekannt		A, F
MS_ 15	34	m	RRMS	aktiv	10 J	(+/-)	positiv	3,5	keine	Z. n. lichtprovo-ziertem Ekzem unter Lamotrigin; Organisch affektive Störung		A, B, F
MS_ 16	68	w	PPMS mit aufge-setzten Schüben	aktiv	22 J	(-/-)	nicht bekannt	8	Kortison-Intervall-therapie	Vorbeste-hende Tetra-parese; aktuell Nitrit-positiver HWI; Tachy-arrhythmia absoluta bei Vorhof-flimmern DD Vorhof-flattern 2:1-Überleitung; Hypo-thyreose; Allergie auf Penicillin		A, F
MS_ 17	53	w	RRMS	aktiv	11 J	(+/-)	nicht bekannt	2,5	Kortison-Intervall-therapie, Prednisolon, Azathio-prin	arterielle Hypertonie; depressive Störung; V.a. Sjögren Syndrom		A, B, F
MS_ 18	34	w	RRMS	aktiv	7 J	(-/-)	positiv	4	Fingoli-mod, Kortison-Intervall-therapie	keine bekannt		A, F
MS_ 19*	29	m	RRMS	Re-mis-sion	2 J	(-/-)	positiv	1,5	Natalizu-mab	keine bekannt		D, E
MS_ 20*	44	w	RRMS	Re-mis-sion	20 J	(+/-)	nicht bekannt	1,5	Interferon -beta 1a	keine bekannt		B
MS_ 21*	24	w	RRMS	Re-mis-sion	9 M	(+/-)	positiv	1	Interferon -beta 1a	keine bekannt		D, E

MS_ 22*	23	w	RRMS	Re-mis-sion	10 M	(-/-)	positiv	2,5	Interferon -beta 1a	keine bekannt		B
MS_ 23*	45	m	RRMS	Re-mis-sion	6 J	(+/-)	positiv	3	Dimethyl-fumarat	keine bekannt		B
MS_ 24*	29	w	RRMS	Re-mis-sion	14 J	(+/+)	negativ	0	keine	keine bekannt		D, E
MS_ 25*	44	m	RRMS	Re-mis-sion	2 J	(+/-)	positiv	3,5	Interferon -beta 1b	keine bekannt		D, E
MS_ 26*	44	w	RRMS	Re-mis-sion	9 J	(-/-)	positiv	2,5	keine	keine bekannt		B, D, E
MS_ 27*	42	w	RRMS	Re-mis-sion		(+/-)	nicht bekannt	nicht bekannt	nicht bekannt	keine bekannt		B, C, D, E
MS_ 28	25	m	RRMS	Re-mis-sion	2,5 J	(+/-)	positiv	0	Interferon -beta 1b	keine bekannt		B, C, F
MS_ 28.1 *	26	m	RRMS	Re-mis-sion	3 J	(+/-)	positiv	0	Interferon -beta 1b	keine bekannt		B
MS_ 29*	23	w	RRMS	Re-mis-sion	1 M	(-/-)	positiv	0	keine	keine bekannt		B, C
MS_ 30*	54	w	RRMS	Re-mis-sion	3 M	(-/-)	nicht bekannt	2	Interferon -beta 1a	Vorhof-flimmern, arterielle Hypertonie		D, E
MS_ 31	27	w	CIS	Re-mis-sion	2 J	(-/-)	nicht bekannt	0	Glatira-mer-acetat	keine bekannt		A, B, F
MS_ 32	52	w	CIS	Re-mis-sion	9 M	(-/-)	positiv	0	Interferon -beta 1a	keine bekannt		A, F
MS_ 33	44	w	RRMS	Re-mis-sion	3 J	(+/-)	positiv	2,5	Dimethyl-fumarat	keine bekannt		A, B, F
MS_ 34	28	w	CIS	Re-mis-sion	8 M	(-/-)	positiv	0	Glatira-mer-acetat	keine bekannt		A, B, C, F
MS_ 35	26	w	RRMS	Re-mis-sion	3 J	(-/-)	positiv	0	Glatira-mer-acetat	keine bekannt		A, B, F
MS_ 36	64	w	SPMS	Re-mis-sion	17 J	(-/-)	positiv	6,5	keine	keine bekannt		A, B, F
MS_ 37[2]	19	m										A, F
MS_ 38	34	w	RRMS	Re-mis-sion	5 J	(+/-)	positiv	0	Dimethyl-fumarat	keine bekannt		A, F
MS_ 39	24	w	CIS	Re-mis-sion	4 M	(+/-)	positiv	0	keine	Vit.-D-Mangel, substituiert		A, B, F
MS_ 40	22	w	ADEM/RIS	Re-mis-sion	1,5 J	(-/-)	negativ	0	keine	keine bekannt		A, B, F
C_ 01*	24	m		Kon-trolle		(-/-)						B
C_ 02*	21	w		Kon-trolle		(-/-)						B
C_ 03*	24	m		Kon-trolle		(+/-)						B
C_ 04*	50	w		Kon-trolle		(+/-)						D, E
C_ 05*	46	w		Kon-trolle		(-/-)						B, D, E
C_ 06*	18	w		Kon-trolle		(-/-)						D, E

C_ 08*	20	m		Kon-trolle		(-/-)						D, E
C_ 09	29	w		Kon-trolle		(+/-)						A, F
C_ 10	34	w		Kon-trolle		(-/-)						A, F
C_ 11	23	m		Kon-trolle		(-/-)						A, F
C_ 12	50	w		Kon-trolle		(+/-)						A, F

Tabelle 6.2: Übersicht über alle durchgeführten Versuche

* Patienten, die in Vorversuchen nach Stimulation mit den untersuchten Peptiden eine Aktivierung > 200% im Vergleich zur DMSO-Kontrolle gezeigt hatten, [1] Screening bisher nicht getesteter Personen auf eine Aktivierung > 200% nach Stimulation mit den untersuchten Peptiden, X = im IFN-γ ELISpot getestet, Y = im IL-17A ELISpot getestet, die HLA-Restriktion der Peptide $EGFS_{SVSNVVITK}$, nM6-$b_{TTYNYAVLK}$ und $PLP_{ATYNFAVLK}$ sollte durch Zugabe der HLA-spezifischen Antikörper 1-5 getestet werden: 1 = Kontrollantikörper, 2 = anti-human HLA-A,B,C, 3 = anti HLA-DP/DR/DQ, 4 = anti-human HLA-DR, 5 = anti-human, anti-pig HLA-DQ, bei doppelt gemessen Werten gingen beide in die Gesamtauswertung ein, indem für die betreffende Variable pro Patient ein Mittelwert gebildet wurde.

ID	Screening[1]	$EGFS_{SVSNVVITK}$						nM6-$b_{TTYNYAVLK}$						$PLP_{ATYNFAVLK}$					
		Titration	+1	+2	+3	+4	+5	Titration	+1	+2	+3	+4	+5	Titration	+1	+2	+3	+4	+5
MS_01			X	X	X	X	X		X	X	X	X	X		X	X	X	X	X
MS_02*		X	XX	XX	XX	XX	XX		X	X	X	X	X		X	X	X	X	X
MS_03*		Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
MS_04*					X		X										X		
MS_05*		X	XX	XX	XX	XX	XX		X	X	X	X	X		X	X	X	X	X
MS_06*		Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
MS_07*					X		X										X	X	
MS_08*					X		X								X	X	XX	XX	X
MS_09*		Y	Y	Y	XY	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	XY	Y	Y
MS_10*		X	XX	XX	XX	XX	XX		X	X	X	X	X		X	X	X	X	X
MS_11*					X		X								X	X	XX	X	X
MS_12*		Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
MS_13*		Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
MS_14	X																		
MS_15	X		X	X	X	X	X		X	X	X	X	X		X	X	X	X	X
MS_16	X																		
MS_17	X				X		XX												
MS_18	X																		
MS_19*		Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
MS_20*															X	X	X	X	X
MS_21*		Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
MS_22*					X		X										X	X	
MS_23*					X		X										X	X	
MS_24*		Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
MS_25*		Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
MS_26*		Y	Y	Y	XY	Y	XY	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	XY	XY	Y
MS_27*		Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	XY	XY	XY	XY	XY	XY
MS_28														X	X	X	X	X	X
MS_			X	X	X	X	X		X	X	X	X	X		X	X	X	X	X

28.1*																			
MS_ 29*			X	X	X	X	X	X	X X	X X	X X	X X	X X		X	X	X	X	X
MS_ 30*		Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
MS_ 31	X		X	X	X	X	X		X	X	X	X	X		X	X	X	X	X
MS_ 32	X																		
MS_ 33	X		X	X	X	X	X		X	X	X	X	X		X	X	X	X	X
MS_ 34	X		X X	X X	X X	X X	X X		X X	X X	X X	X X	X X	X	X X X	X X X	X X X	X X X	X X X
MS_ 35	X				X		X X										X	X	
MS_ 36	X		X	X	X	X	X		X	X	X	X	X		X	X	X	X	X
MS_ 37	X																		
MS_ 38	X																		
MS_ 39	X						X												
MS_ 40	X														X	X	X	X	X
C_ 01*															X	X	X	X	X
C_ 02*															X	X	X	X	X
C_ 03*					X		X X										X	X	
C_ 04*		Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
C_ 05*		Y	Y	Y	X Y	Y	X X Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	X Y	X Y	Y
C_ 06*		Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
C_ 08*		Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
C_ 09	X																		
C_ 10	X																		
C_ 11	X																		
C_ 12	X																		

Tabelle 6.3: Eluierte Peptide

Der im Text anstatt der Peptidnummer verwendete Ausdruck ist in Klammern angegeben. Nur die grau hinterlegten Peptide wurden in dieser Studie verwendet, um die Zytokinsekretion von PBMCs zu stimulieren. Zur Identifikation der zugehörigen Proteine wurden die Datenbanken UniProt (154) und NCBI (155) herangezogen (Stand: 26.09.2017).

Peptid Nummer	Sequenz	Vorkommen beim Menschen
1	MEVEDNRSQVETD	Aquaporin 4
2	DFDPLPPVTSPVKAPTPSG	Myc box-dependent-interacting protein 1
3	YIIDNKGIDSDA	Cathepsin S
4	RISPDQGQQFAQML	Clathrin, heavy chain
5	YSIITPNILRL	Complement C3, Epididymis secretory sperm binding protein Li 62p
6 (EGFS$_{SVSNVVITK}$)	SVSNVVITK	Epidermal growth factor receptor substrate 15
7 (nM6-b$_{TTYNYAVLK}$)	TTYNYAVLK	Neuronal membrane glycoprotein M6-b
8	HGSKYLATASTMD	Myelin Basic Protein
9	KNIVTPRTPPPSQ	Myelin Basic Protein
10 (PLP$_{ATYNFAVLK}$)	ATYNFAVLK	Myelin Proteolipid Protein
11	DLSQVAAISNDLK	Neurofilament light polypeptide
12	SVNGKVLSK	Unbekannt
13	GGSVYKYASFQVENDQ	Protein transport protein Sec24C
14	AVVEPYNSILTTHTT	Tubulin alpha-chain
15	LERIQIQEAAKKKPG	Testican-2
16	YAVAVVKKDSG	Transferrin
17	EQVFSKYGQISE	Cold-inducible RNA-binding protein
18	VISLEGKPL	Cofilin-1
20	AVNAHSNILK	MICOS complex subunit MIC60
22	LRVAPEEHPVL	Actin-like protein
23	MNNREVLEQVEHGY	Tyrosine-protein kinase Fyn
24	RVAPEEHPVLLTEAPLNPK	Actin-like protein
25	SNTPILVDGKDVMPEVN	Glucose-6-phosphate isomerase
26	ASAIKSmFSGE	Unbekannt
27	KNIIDAFNGGISLV	Unbekannt
28	DVIDNDSWRIW	multifunctional protein ADE2
29	VVNrLLTPTHSF	Ensconsin
30	KNIVTP-Cit-TPPPSQ	Unbekannt, 92,3% Ähnlichkeit mit Myelin Basic Protein
31	VVN-Cit-LLTPTHSF	Unbekannt, 91,7% Ähnlichkeit mit Encosin and microtubule-associated protein 7 (MAP7), mRNA

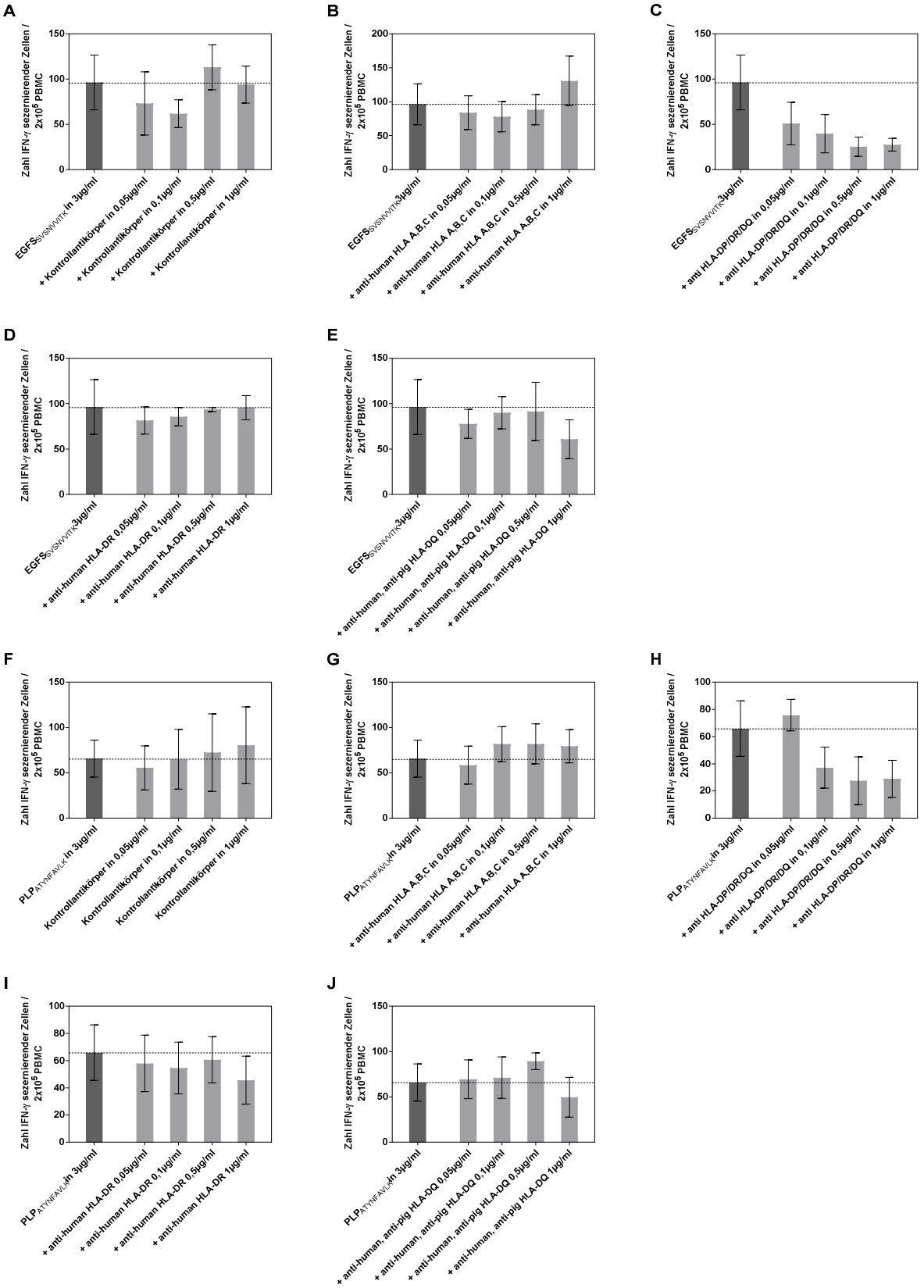
Tabelle 6.4: Screening

Es wurden 19 Personen daraufhin untersucht, ob durch eines oder mehrere der drei Peptide EGFSSVSNVVITK, nM6-bTTYNYAVLK und PLPATYNFAVLK eine Zunahme der Spot Counts um mehr als 200% im Vergleich zur DMSO Kontrolle bewirkt werden konnte. + = in die Studie eingeschlossen, EDSS = expanded disability status scale, RRMS = relapsing remitting multiple sclerosis, SPMS = secondary progressive multiple sclerosis, PPMS = primary progressive multiple sclerosis, ADEM = acute disseminated encephalomyelitis, CIS = clinically isolated syndrome, RIS = radiologically isolated syndrome, m = männlich, w = weiblich, J = Jahre, M = Monate, +/+ = homozygot positiv, +/- = heterozygot positiv, -/- = negativ, 1 zum Zeitpunkt der Probenentnahme, 2 von der Studie ausgeschlossen, da Diagnose unklar.

ID	Alter in Jahren	Geschlecht	Krankheits-verlauf	Krankheits-aktivität	Krankheits-dauer	HLA-DRB1*1501	Oligo-klonale Banden	EDSS[1]	Immun-modulato-rische Therapie	Weitere Vor-erkrankun-gen	Besonder-heiten
MS_ 01+	43	w	RRMS	aktiv	17 J	+/-	positiv	4	Kortison-Intervall-therapie	Z.n. Resektion eines Ganglioglioms Höhe BWK 10-12 (1996); Meningeom 1cm hintere Schädelgrube	
MS_ 14	27	m	RRMS	aktiv	7 J	+/-	positiv	1,5	Teriflunomide (Aubagio)	keine bekannt	
MS_ 15+	34	m	RRMS	aktiv	10 J	+/-	positiv	3,5	keine	Z. n. lichtprovozier-tem Ekzem unter Lamotrigin; Organisch affektive Störung (ICD-10: F 06.3)	
MS_ 16	68	w	PPMS mit aufge-setzten Schü-ben	aktiv	22 J	-/-	nicht bekannt	8	Kortison-Intervall-therapie	vorbestehende Tetraparese; aktuell Nachweis Nitrit-positiver HWI; Tachyarrhyth-mia absoluta bei Vorhofflimmern DD Vorhofflattern 2:1-Überleitung; Hypothyreose; Allergie auf Penicillin (Herzrasen, Unwohlsein)	
MS_ 17+	53	w	RRMS	aktiv	11 J	+/-	nicht bekannt	2,5	Kortison-Intervall-therapie, Prednisolon, Azathioprin	arterielle Hypertonie; depressive Störung; V.a. Sjögren Syndrom	
MS_ 18	34	w	RRMS	aktiv	7 J	-/-	positiv	4	Fingolimod (Gilenya), Kortison-Intervall-therapie	keine bekannt	
MS_ 28+	25	m	RRMS	Re-mission	2,5 J	+/-	positiv	0	Interferon-beta 1b	keine bekannt	
MS_ 31+	27	w	CIS	Re-mission	2 J	-/-	nicht bekannt	0	Glatiramer-acetat	keine bekannt	

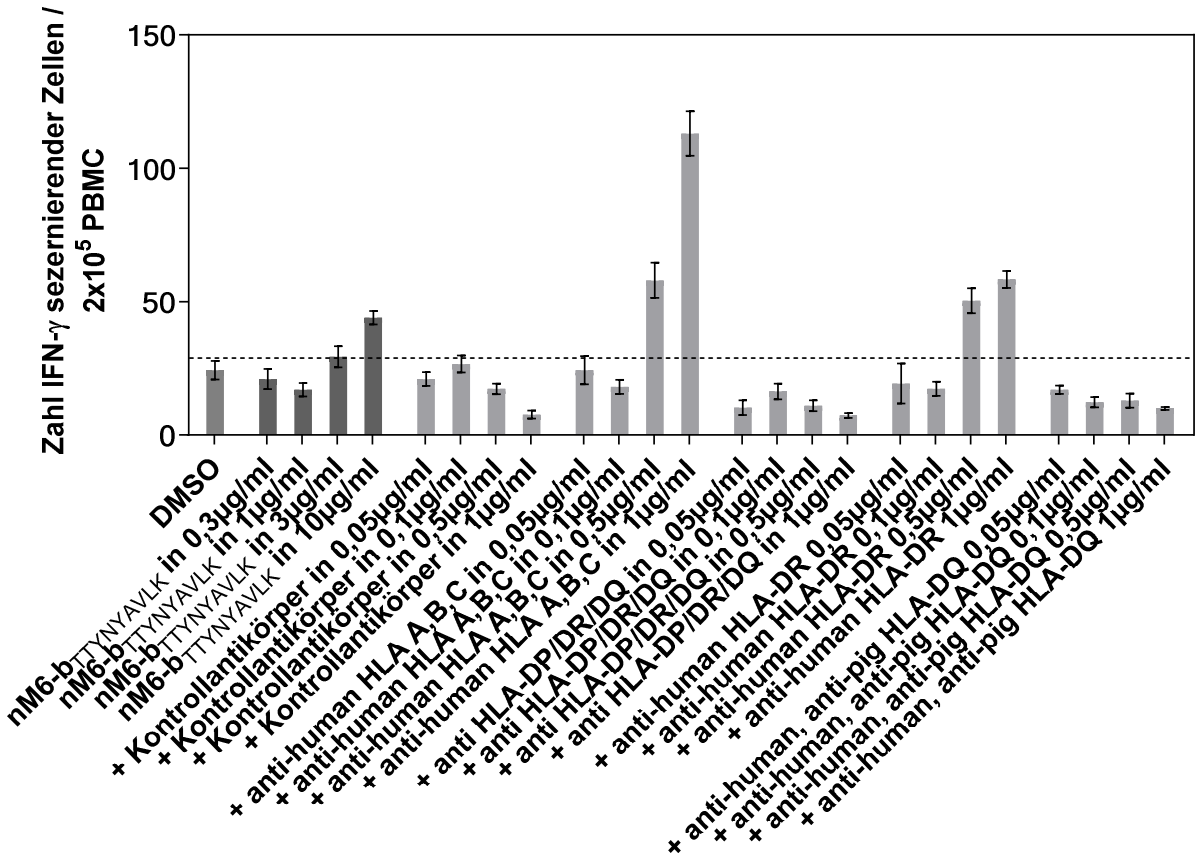
MS_ 32	52	w	CIS	Re-mission	9 M	-/-	positiv	0	Interferon-beta 1a	keine bekannt	
MS_ 33+	44	w	RRMS	Re-mission	3 J	+/-	positiv	2,5	Dimethyl-fumarat	keine bekannt	
MS_ 34+	28	w	CIS	Re-mission	8 M	-/-	positiv	0	Glatiramer-acetat	keine bekannt	
MS_ 35+	26	w	RRMS	Re-mission	3 J	-/-	positiv	0	Glatiramer-acetat	keine bekannt	
MS_ 36+	64	w	SPMS	Re-mission	17 J	-/-	positiv	6,5	keine	keine bekannt	
MS_ 37[2]	19	m				-/-				AML aus Myelodysplas-tischem Syndrom (ICD10: C94.0); Makulablutung beidseits 5/16; mögliche Migräne ohne Aura	
MS_ 38	34	w	RRMS	Re-mission	5 J	+/-	positiv	0	Dimethyl-fumarat	keine bekannt	
MS_ 39+	24	w	CIS	Re-mission	4 M	+/-	positiv	0	keine	Vitamin-D-Mangel, substituiert	
MS_ 40+	22	w	ADEM/ RIS	Re-mission	1,5 J	-/-	negativ	0	keine	keine bekannt	
C_ 09	29	w		Kontrolle		+/-					
C_ 10	34	w		Kontrolle		-/-					
C_ 11	23	m		Kontrolle		-/-					
C_ 12	50	w		Kontrolle		+/-					

6.7 Grafiken


A
Zahl IFN-γ sezernierender Zellen / 2x10^5 PBMC
150
100
50
0
EGFS SYSNVVITK in 3µg/ml
+ Kontrollantikörper in 0,05µg/ml
+ Kontrollantikörper in 0,1µg/ml
+ Kontrollantikörper in 0,5µg/ml
+ Kontrollantikörper in 1µg/ml
B
Zahl IFN-γ sezernierender Zellen / 2x10^5 PBMC
200
150
100
50
0
EGFS SYSNVVITK 3µg/ml
+ anti-human HLA A,B,C in 0,05µg/ml
+ anti-human HLA A,B,C in 0,1µg/ml
+ anti-human HLA A,B,C in 0,5µg/ml
+ anti-human HLA A,B,C in 1µg/ml
C
Zahl IFN-γ sezernierender Zellen / 2x10^5 PBMC
150
100
50
0
EGFS SYSNVVITK 3µg/ml
+ anti HLA-DP/DR/DQ in 0,05µg/ml
+ anti HLA-DP/DR/DQ in 0,1µg/ml
+ anti HLA-DP/DR/DQ in 0,5µg/ml
+ anti HLA-DP/DR/DQ in 1µg/ml
D
Zahl IFN-γ sezernierender Zellen / 2x10^5 PBMC
150
100
50
0
EGFS SYSNVVITK 3µg/ml
+ anti-human HLA-DR 0,05µg/ml
+ anti-human HLA-DR 0,1µg/ml
+ anti-human HLA-DR 0,5µg/ml
+ anti-human HLA-DR 1µg/ml
E
Zahl IFN-γ sezernierender Zellen / 2x10^5 PBMC
150
100
50
0
EGFS SYSNVVITK 3µg/ml
+ anti-human, anti-pig HLA-DQ 0,05µg/ml
+ anti-human, anti-pig HLA-DQ 0,1µg/ml
+ anti-human, anti-pig HLA-DQ 0,5µg/ml
+ anti-human, anti-pig HLA-DQ 1µg/ml
F
Zahl IFN-γ sezernierender Zellen / 2x10^5 PBMC
150
100
50
0
PLP ATYNFAVLK in 3µg/ml
Kontrollantikörper in 0,05µg/ml
Kontrollantikörper in 0,1µg/ml
Kontrollantikörper in 0,5µg/ml
Kontrollantikörper in 1µg/ml
G
Zahl IFN-γ sezernierender Zellen / 2x10^5 PBMC
150
100
50
0
PLP ATYNFAVLK in 3µg/ml
+ anti-human HLA A,B,C in 0,05µg/ml
+ anti-human HLA A,B,C in 0,1µg/ml
+ anti-human HLA A,B,C in 0,5µg/ml
+ anti-human HLA A,B,C in 1µg/ml
H
Zahl IFN-γ sezernierender Zellen / 2x10^5 PBMC
100
80
60
40
20
0
PLP ATYNFAVLK in 3µg/ml
+ anti HLA-DP/DR/DQ in 0,05µg/ml
+ anti HLA-DP/DR/DQ in 0,1µg/ml
+ anti HLA-DP/DR/DQ in 0,5µg/ml
+ anti HLA-DP/DR/DQ in 1µg/ml
I
Zahl IFN-γ sezernierender Zellen / 2x10^5 PBMC
100
80
60
40
20
0
PLP ATYNFAVLK in 3µg/ml
+ anti-human HLA-DR 0,05µg/ml
+ anti-human HLA-DR 0,1µg/ml
+ anti-human HLA-DR 0,5µg/ml
+ anti-human HLA-DR 1µg/ml
J
Zahl IFN-γ sezernierender Zellen / 2x10^5 PBMC
150
100
50
0
PLP ATYNFAVLK in 3µg/ml
+ anti-human, anti-pig HLA-DQ 0,05µg/ml
+ anti-human, anti-pig HLA-DQ 0,1µg/ml
+ anti-human, anti-pig HLA-DQ 0,5µg/ml
+ anti-human, anti-pig HLA-DQ 1µg/ml

Grafik 6.1: Titration der Antikörper im IFN-γ ELISpot (S. 109)

Die Peptide EGFS$_{SVSNVVITK}$ (A-E) und PLP$_{ATYNFAVLK}$ (F-J) wurden in der Konzentration 3 µg/ml eingesetzt. Der Kontrollantikörper (A, F), sowie anti-human HLA-A,B,C (B, G), anti HLA-DP/DR/DQ (C, H), anti-human HLA-DR (D, I) und anti-human, anti-pig HLA-DQ (E, J) wurden in Konzentrationen von 0,05 µg/ml, 0,1 µg/ml, 0,5 µg/ml und 1 µg/ml getestet. Aufgrund dieser Ergebnisse wurden die Antikörper in der Folge in 0,5 µg/ml eingesetzt.



Grafik 6.2: Titration von nM6-b$_{TTYNYAVLK}$ und der Antikörper im IFN-γ ELISpot

nM6-b$_{TTYNYAVLK}$ wurde in Konzentrationen von 0,3 µg/ml, 1 µg/ml, 3 µg/ml und 10 µg/ml getestet, die Antikörper in Konzentrationen von 0,05 µg/ml, 0,1 µg/ml, 0,5 µg/ml und 1 µg/ml gegen eine Peptidkonzentration von 3 µg/ml.

6.8 Statistische Auswertung

Titration von EGFS$_{SVSNVVITK}$ im IL-17A ELISpot:

Kruskal-Wallis Test (alpha = 0,05)			
	Anzahl der Gruppen	P-Wert	Signifikanz
	7	<0,0001	****
Multiple Comparisons (alpha = 0,05)			
	Zahl der Vergleiche		
	4		
Uncorrected Dunn´s Test			
	Mean rank diff.	P-Wert	Signifikanz
DMSO vs. EGFS$_{SVSNVVITK}$ in 0.3 µg/ml	3,375	0,7685	ns
DMSO vs. EGFS$_{SVSNVVITK}$ in 1 µg/ml	-5	0,6628	ns
DMSO vs. EGFS$_{SVSNVVITK}$ in 3 µg/ml	-37,69	0,0010	**
DMSO vs. EGFS$_{SVSNVVITK}$ in 10 µg/ml	-48,63	<0,0001	****

Titration von nM6-b$_{TTYNYAVLK}$ im IL-17A ELISpot:

Kruskal-Wallis Test (alpha = 0,05)			
	Anzahl der Gruppen	P-Wert	Signifikanz
	7	<0,0001	****
Multiple Comparisons (alpha = 0,05)			
	Zahl der Vergleiche		
	4		
Uncorrected Dunn´s Test			
	Mean rank diff.	P-Wert	Signifikanz
DMSO vs. nM6-b$_{TTYNYAVLK}$ in 0.3 µg/ml	0,09375	0,9935	ns
DMSO vs. nM6-b$_{TTYNYAVLK}$ in 1 µg/ml	-18,59	0,1050	ns
DMSO vs. nM6-b$_{TTYNYAVLK}$ in 3 µg/ml	-35,69	0,0019	**
DMSO vs. nM6-b$_{TTYNYAVLK}$ in 10 µg/ml	-42,34	0,0002	***

Titration von PLP$_{ATYNFAVLK}$ im IL-17A ELISpot:

Kruskal-Wallis Test (alpha = 0,05)			
	Anzahl der Gruppen	P-Wert	Signifikanz
	7	<0,0001	****
Multiple Comparisons (alpha = 0,05)			
	Zahl der Vergleiche		
	4		
Uncorrected Dunn´s Test			
	Mean rank diff.	P-Wert	Signifikanz
DMSO vs. PLP$_{ATYNFAVLK}$ in 0.3 µg/ml	1,656	0,8852	0,8852
DMSO vs. PLP$_{ATYNFAVLK}$ in 1 µg/ml	-19,53	0,0886	0,0886
DMSO vs. PLP$_{ATYNFAVLK}$ in 3 µg/ml	-47,63	<0,0001	<0,0001
DMSO vs. PLP$_{ATYNFAVLK}$ in 10 µg/ml	-45,34	<0,0001	<0,0001

Einfluss von DMSO und Antikörpern im IFN-γ ELISpot:

Kruskal-Wallis Test (alpha = 0,05)			
	Anzahl der Gruppen	P-Wert	Signifikanz
	7	0,0011	**
Multiple Comparisons (alpha = 0,05)			

	Zahl der Vergleiche		
	6		
Uncorrected Dunn´s Test			
	Mean rank diff.	P-Wert	Signifikanz
Negativkontrolle vs. DMSO	-13,65	0,3156	ns
Negativkontrolle vs. Kontrollantikörper	-0,5202	0,9731	ns
Negativkontrolle vs. anti HLA-A,B,C	-38,47	0,0128	*
Negativkontrolle vs. anti HLA-DP/DR/DQ	11,82	0,3889	ns
Negativkontrolle vs. anti HLA-DR	-40,86	0,0038	**
Negativkontrolle vs. anti HLA-DQ	-0,0592	0,9966	ns

Peptidspezifische Reaktivität im IFN-γ ELISpot:

Kruskal-Wallis Test (alpha = 0,05)			
	Anzahl der Gruppen	P-Wert	Signifikanz
	5	<0,0001	****
Multiple Comparisons (alpha = 0,05)			
	Zahl der Vergleiche		
	3		
Uncorrected Dunn´s Test			
	Mean rank diff.	P-Wert	Signifikanz
DMSO vs. EGFS$_{SVSNVVITK}$	-16,1	0,0990	ns
DMSO vs. nM6-b$_{TTYNYAVLK}$	-0,1515	0,9904	ns
DMSO vs. PLP$_{ATYNFAVLK}$	-33,26	0,0004	***

MHC-Restriktion von EGFS$_{SVSNVVITK}$ im IFN-γ ELISpot:

Kruskal-Wallis Test (alpha = 0,05)			
	Anzahl der Gruppen	P-Wert	Signifikanz
	6	0,0434	*
Multiple Comparisons (alpha = 0,05)			
	Zahl der Vergleiche		
	5		
Uncorrected Dunn´s Test			
	Mean rank diff.	P-Wert	Signifikanz
EGFS$_{SVSNVVITK}$ vs. + Kontrollantikörper	4,621	0,6710	ns
EGFS$_{SVSNVVITK}$ vs. + anti HLA-A,B,C	-14,11	0,1947	ns
EGFS$_{SVSNVVITK}$ vs. + anti HLA-DP/DR/DQ	19,04	0,0290	*
EGFS$_{SVSNVVITK}$ vs. + anti HLA-DR	-2,152	0,8432	ns
EGFS$_{SVSNVVITK}$ vs. + anti HLA-DQ	9,667	0,2675	ns

MHC-Restriktion von PLP$_{ATYNFAVLK}$ im IFN-γ ELISpot:

Kruskal-Wallis Test (alpha = 0,05)			
	Anzahl der Gruppen	P-Wert	Signifikanz
	6	0,2561	ns
Multiple Comparisons (alpha = 0,05)			
	Zahl der Vergleiche		
	5		
Uncorrected Dunn´s Test			
	Mean rank diff.	P-Wert	Signifikanz
PLP$_{ATYNFAVLK}$ vs. + Kontrollantikörper	8,761	0,4610	ns
PLP$_{ATYNFAVLK}$ vs. + anti HLA-A,B,C	-0,2914	0,9804	ns

PLP$_{ATYNFAVLK}$ vs. + anti HLA-DP/DR/DQ	23,12	0,0321	*
PLP$_{ATYNFAVLK}$ vs. + anti HLA-DR	1,643	0,8801	ns
PLP$_{ATYNFAVLK}$ vs. + anti HLA-DQ	2,867	0,8094	ns

Einfluss von DMSO und Antikörpern im IL-17A ELISpot:

Kruskal-Wallis Test (alpha = 0,05)			
	Anzahl der Gruppen	P-Wert	Signifikanz
	7	0,0352	*
Multiple Comparisons (alpha = 0,05)			
	Zahl der Vergleiche		
	6		
Uncorrected Dunn´s Test			
	Mean rank diff.	P-Wert	Signifikanz
Negativkontrolle vs. DMSO	1,219	0,9154	ns
Negativkontrolle vs. Kontrollantikörper	-3,438	0,7644	ns
Negativkontrolle vs. anti HLA-A,B,C	-2,938	0,7979	ns
Negativkontrolle vs. anti HLA-DP/DR/DQ	28,5	0,0130	*
Negativkontrolle vs. anti HLA-DR	8,25	0,4721	ns
Negativkontrolle vs. anti HLA-DQ	-8,188	0,4754	ns

Peptidspezifische Reaktivität im IL-17A ELISpot:

Kruskal-Wallis Test (alpha = 0,05)			
	Anzahl der Gruppen	P-Wert	Signifikanz
	5	<0,0001	****
Multiple Comparisons (alpha = 0,05)			
	Zahl der Vergleiche		
	3		
Uncorrected Dunn´s Test			
	Mean rank diff.	P-Wert	Signifikanz
DMSO vs. EGFS$_{SVSNVVITK}$	-24,44	0,0029	**
DMSO vs. nM6-b$_{TTYNYAVLK}$	-25,19	0,0022	**
DMSO vs. PLP$_{ATYNFAVLK}$	-32,19	<0,0001	****

MHC Restriktion von EGFS$_{SVSNVVITK}$ im IL-17A ELISpot:

Kruskal-Wallis Test (alpha = 0,05)			
	Anzahl der Gruppen	P-Wert	Signifikanz
	5	0,0027	**
Multiple Comparisons (alpha = 0,05)			
	Zahl der Vergleiche		
	4		
Uncorrected Dunn´s Test			
	Mean rank diff.	P-Wert	Signifikanz
EGFS$_{SVSNVVITK}$ vs. + anti HLA-A,B,C	4,906	0,5501	ns
EGFS$_{SVSNVVITK}$ vs. + anti HLA-DP/DR/DQ	29,94	0,0003	***
EGFS$_{SVSNVVITK}$ vs. + anti HLA-DR	16,47	0,0448	*
EGFS$_{SVSNVVITK}$ vs. + anti HLA-DQ	8,688	0,2899	ns

MHC Restriktion von nM6-b$_{TTYNYAVLK}$ im IL-17A ELISpot:

Kruskal-Wallis Test (alpha = 0,05)			
	Anzahl der Gruppen	P-Wert	Signifikanz
	5	0,0023	**
Multiple Comparisons (alpha = 0,05)			
	Zahl der Vergleiche		
	4		
Uncorrected Dunn´s Test			
	Mean rank diff.	P-Wert	Signifikanz
nM6-$b_{TTYNYAVLK}$ in vs. + anti HLA-A,B,C	3,781	0,6450	ns
nM6-$b_{TTYNYAVLK}$ in vs. + anti HLA-DP/DR/DQ	26,91	0,0010	**
nM6-$b_{TTYNYAVLK}$ in vs. + anti HLA-DR	21,72	0,0081	**
nM6-$b_{TTYNYAVLK}$ in vs. + anti HLA-DQ	6,5	0,4284	ns

MHC Restriktion von $PLP_{ATYNFAVLK}$ im IL-17A ELISpot:

Kruskal-Wallis Test (alpha = 0,05)			
	Anzahl der Gruppen	P-Wert	Signifikanz
	5	0,0092	**
Multiple Comparisons (alpha = 0,05)			
	Zahl der Vergleiche		
	4		
Uncorrected Dunn´s Test			
	Mean rank diff.	P-Wert	Signifikanz
$PLP_{ATYNFAVLK}$ in vs. + anti HLA-A,B,C	14,47	0,0781	ns
$PLP_{ATYNFAVLK}$ in vs. + anti HLA-DP/DR/DQ	28,88	0,0004	***
$PLP_{ATYNFAVLK}$ in vs. + anti HLA-DR	13,41	0,1026	ns
$PLP_{ATYNFAVLK}$ in vs. + anti HLA-DQ	7,469	0,3631	ns

Korrelation der gepoolten Reaktivität im IFN-γ ELISpot mit dem HLA-DRB1*1501 Haplotyp:

Mann-Whitney U Test (alpha = 0,5)	HLA-DRB1*1501 neg. vs. HLA-DRB1*1501 pos.		
	Unterschied der Mediane (actual / Hodges-Lehmann)	P-Wert	Signifikanz
Aktiver Schub	18,17 / 13,67	0,0001	***
Remission (nicht aktiv)	-11,67 / -10,17	0,0002	***
Kontrollpersonen	2,667 / 10,17	0,2333	ns

Korrelation der gepoolten Reaktivität im IL-17A ELISpot mit dem HLA-DRB1*1501 Haplotyp:

Mann-Whitney U Test (alpha = 0,5)	HLA-DRB1*1501 neg. vs. HLA-DRB1*1501 pos.		
	Unterschied der Mediane (actual / Hodges-Lehmann)	P-Wert	Signifikanz
Aktiver Schub	12,25 / 10,17	0,0003	***
Remission (nicht aktiv)	1,25 / 1,5	0,6755	ns
Kontrollpersonen	-0,04167 / 0,5	0,8741	ns

MHC II Restriktion im IFN-γ ELISpot abhängig vom HLA-DRB1*1501 Haplotyp:

Mann-Whitney U Test (alpha = 0,5)	+ anti HLA-DP/DR/DQ vs. gepoolte Reaktivität		
	Unterschied der Mediane (actual / Hodges-Lehmann)	P-Wert	Signifikanz
HLA-DRB1*1501 pos.	-10,11 / -9,417	0,0173	*
HLA-DRB1*1501 neg.	-18,42 / -13	0,0161	*

MHC II Restriktion im IL-17A ELISpot abhängig vom HLA-DRB1*1501 Haplotyp:

Mann-Whitney U Test (alpha = 0,5)	+ anti HLA-DP/DR/DQ vs. gepoolte Reaktivität		
	Unterschied der Mediane (actual / Hodges-Lehmann)	P-Wert	Signifikanz
HLA-DRB1*1501 pos.	-5,667 / -5,333	<0,0001	****
HLA-DRB1*1501 neg.	-11,33 / -11,33	<0,0001	****

7. Literaturverzeichnis

1. Calabrese M, Favaretto A, Martini V, Gallo P. Grey matter lesions in MS: from histology to clinical implications. Prion. 2013;7(1):20–7. doi:10.4161/pri.22580
2. Dendrou CA, Fugger L, Friese MA. Immunopathology of multiple sclerosis. Nat Rev Immunol. 2015;15(9):545. doi:10.1038/nri3871
3. Martin R, Sospedra M, Rosito M, Engelhardt B. Current multiple sclerosis treatments have improved our understanding of MS autoimmune pathogenesis. Eur J Immunol. 2016;46(9):2078–90. doi:10.1002/eji.201646485
4. Weissert R. The immune pathogenesis of multiple sclerosis. J Neuroimmune Pharmacol. 2013;8(4):857–66. doi:10.1007/s11481-013-9467-3
5. Popescu BFG, Lucchinetti CF. Pathology of demyelinating diseases. Annu Rev Pathol. 2012;7185–217. doi:10.1146/annurev-pathol-011811-132443
6. Nikolakopoulou AM, Dutta R, Chen Z, Miller RH, Trapp BD. Activated microglia enhance neurogenesis via trypsinogen secretion. Proc Natl Acad Sci U S A. 2013;110(21):8714–9. doi:10.1073/pnas.1218856110
7. Milo R, Miller A. Revised diagnostic criteria of multiple sclerosis. Autoimmun Rev. 2014;13(4-5):518–24. doi:10.1016/j.autrev.2014.01.012
8. Pugliatti M, Rosati G, Carton H, Riise T, Drulovic J, Vecsei L, Milanov I. The epidemiology of multiple sclerosis in Europe. Eur J Neurol. 2006;13(7):700–22. doi:10.1111/j.1468-1331.2006.01342.x
9. Ajdacic-Gross V, Schmid M, Mutsch M, Steinemann N, Wyl V v., Bopp M. The change in the sex ratio in multiple sclerosis is driven by birth cohort effects. Eur J Neurol. 2017;24(1):98–104. doi:10.1111/ene.13160
10. Ascherio A, Munger KL. Environmental risk factors for multiple sclerosis. Part I: the role of infection. Ann Neurol. 2007;61(4):288–99. doi:10.1002/ana.21117
11. Mackenzie IS, Morant SV, Bloomfield GA, MacDonald TM, O'Riordan J. Incidence and prevalence of multiple sclerosis in the UK 1990-2010: A descriptive study in the General Practice Research Database. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 2014;85(1):76–84. doi:10.1136/jnnp-2013-305450
12. Koch-Henriksen N, Sørensen PS. The changing demographic pattern of multiple sclerosis epidemiology. The Lancet Neurology. 2010;9(5):520–32. doi:10.1016/S1474-4422(10)70064-8
13. Narula S. Pediatric multiple sclerosis: updates in epidemiology, clinical features and management. Neurodegener Dis Manag. 2016;6(6s):3–7. doi:10.2217/nmt-2016-0046
14. Scalfari A, Knappertz V, Cutter G, Goodin DS, Ashton R, Ebers GC. Mortality in patients with multiple sclerosis. Neurology. 2013;81(2):184–92. doi:10.1212/WNL.0b013e31829a3388
15. Kakalacheva K, Lünemann JD. Environmental triggers of multiple sclerosis. FEBS Lett. 2011;585(23):3724–9. doi:10.1016/j.febslet.2011.04.006
16. Rhead B, Baarnhielm M, Gianfrancesco M, Mok A, Shao X, Quach H, Shen L, Schaefer C, Link J, Gyllenberg A, Hedstrom AK, Olsson T, Hillert J, Kockum I, Glymour MM, Alfredsson L, Barcellos LF. Mendelian randomization shows a

causal effect of low vitamin D on multiple sclerosis risk. Neurol Genet. 2016;2(5):e97. doi:10.1212/NXG.0000000000000097

17. Pierrot-Deseilligny C, Souberbielle J-C. Vitamin D and multiple sclerosis: An update. Mult Scler Relat Disord. 2017;1435–45. doi:10.1016/j.msard.2017.03.014
18. Correale J, Gaitan MI. Multiple sclerosis and environmental factors: the role of vitamin D, parasites, and Epstein-Barr virus infection. Acta Neurol Scand. 2015;132(199):46–55. doi:10.1111/ane.12431
19. Mentis A-FA, Dardiotis E, Grigoriadis N, Petinaki E, Hadjigeorgiou GM. Viruses and endogenous retroviruses in multiple sclerosis: From correlation to causation. Acta Neurol Scand. 2017. doi:10.1111/ane.12775
20. Chastain EML, Miller SD. Molecular mimicry as an inducing trigger for CNS autoimmune demyelinating disease. Immunol Rev. 2012;245(1):227–38. doi:10.1111/j.1600-065X.2011.01076.x
21. Wucherpfennig KW, Strominger JL. Molecular mimicry in T cell-mediated autoimmunity: viral peptides activate human T cell clones specific for myelin basic protein. Cell. 1995;80(5):695–705.
22. Olson JK, Croxford JL, Calenoff MA, Dal Canto MC, Miller SD. A virus-induced molecular mimicry model of multiple sclerosis. J Clin Invest. 2001;108(2):311–8. doi:10.1172/JCI13032
23. Olson JK, Eagar TN, Miller SD. Functional activation of myelin-specific T cells by virus-induced molecular mimicry. J Immunol. 2002;169(5):2719–26.
24. Correale J, Farez MF. The impact of environmental infections (parasites) on MS activity. Mult Scler. 2011;17(10):1162–9. doi:10.1177/1352458511418027
25. Poorolajal J, Bahrami M, Karami M, Hooshmand E. Effect of smoking on multiple sclerosis: a meta-analysis. J Public Health (Oxf). 2016. doi:10.1093/pubmed/fdw030
26. Briggs FB, Gunzler DD, Ontaneda D, Marrie RA. Smokers with MS have greater decrements in quality of life and disability than non-smokers. Mult Scler. 2017;1352458516685169. doi:10.1177/1352458516685169
27. Ramanujam R, Hedstrom A-K, Manouchehrinia A, Alfredsson L, Olsson T, Bottai M, Hillert J. Effect of Smoking Cessation on Multiple Sclerosis Prognosis. JAMA Neurol. 2015;72(10):1117–23. doi:10.1001/jamaneurol.2015.1788
28. Liu Z, Zhang T-T, Yu J, Liu Y-L, Qi S-F, Zhao J-J, Liu D-W, Tian Q-B. Excess Body Weight during Childhood and Adolescence Is Associated with the Risk of Multiple Sclerosis: A Meta-Analysis. Neuroepidemiology. 2016;47(2):103–8. doi:10.1159/000450854
29. Han JM, Levings MK. Immune Regulation in Obesity-Associated Adipose Inflammation. J Immunol. 2013;191(2):527–32. doi:10.4049/jimmunol.1301035
30. Dorans KS, Massa J, Chitnis T, Ascherio A, Munger KL. Physical activity and the incidence of multiple sclerosis. Neurology. 2016;87(17):1770–6. doi:10.1212/WNL.0000000000003260

31. Bjornevik K, Chitnis T, Ascherio A, Munger KL. Polyunsaturated fatty acids and the risk of multiple sclerosis. Mult Scler. 2017;1352458517691150. doi:10.1177/1352458517691150
32. Zhao G, Etherton TD, Martin KR, Gillies PJ, West SG, Kris-Etherton PM. Dietary alpha-linolenic acid inhibits proinflammatory cytokine production by peripheral blood mononuclear cells in hypercholesterolemic subjects. Am J Clin Nutr. 2007;85(2):385–91.
33. Jelinek GA, Livera AM de, Marck CH, Brown CR, Neate SL, Taylor KL, Weiland TJ. Lifestyle, medication and socio-demographic determinants of mental and physical health-related quality of life in people with multiple sclerosis. BMC Neurol. 2016;16(1):235. doi:10.1186/s12883-016-0763-4
34. Compston A. The genetic epidemiology of multiple sclerosis. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 1999;354(1390):1623–34. doi:10.1098/rstb.1999.0507
35. Rioux JD, Goyette P, Vyse TJ, Hammarström L, Fernando MMA, Green T, Jager PL de, Foisy S, Wang J, Bakker PIW de, Leslie S, McVean G, Padyukov L, Alfredsson L, Annese V, Hafler DA, Pan-Hammarström Q, Matell R, Sawcer SJ, Compston AD, Cree BAC, Mirel DB, Daly MJ, Behrens TW, Klareskog L, Gregersen PK, Oksenberg JR, Hauser SL. Mapping of multiple susceptibility variants within the MHC region for 7 immune-mediated diseases. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009;106(44):18680–5. doi:10.1073/pnas.0909307106
36. Oksenberg JR, Baranzini SE, Sawcer S, Hauser SL. The genetics of multiple sclerosis: SNPs to pathways to pathogenesis. Nat Rev Genet. 2008;9(7):516–26. doi:10.1038/nrg2395
37. International Multiple Sclerosis Genetics Consortium, Beecham AH, Patsopoulos NA, Xifara DK, Davis MF, Kemppinen A, Cotsapas C, Shah TS, Spencer C, Booth D, Goris A, Oturai A, Saarela J, Fontaine B, Hemmer B, Martin C, Zipp F, D'alfonso S, Martinelli-Boneschi F, Taylor B, Harbo HF, Kockum I, Hillert J, Olsson T, Ban M, Oksenberg JR, Hintzen R, Barcellos LF, Agliardi C, Alfredsson L, Alizadeh M, Anderson C, Andrews R, Søndergaard HB, Baker A, Band G, Baranzini SE, Barizzone N, Barrett J, Bellenguez C, Bergamaschi L, Bernardinelli L, Berthele A, Biberacher V, Binder TMC, Blackburn H, Bomfim IL, Brambilla P, Broadley S, Brochet B, Brundin L, Buck D, Butzkueven H, Caillier SJ, Camu W, Carpentier W, Cavalla P, Celius EG, Coman I, Comi G, Corrado L, Cosemans L, Cournu-Rebeix I, Cree BAC, Cusi D, Damotte V, Defer G, Delgado SR, Deloukas P, Di Sapio A, Dilthey AT, Donnelly P, Dubois B, Duddy M, Edkins S, Elovaara I, Esposito F, Evangelou N, Fiddes B, Field J, Franke A, Freeman C, Frohlich IY, Galimberti D, Gieger C, Gourraud P-A, Graetz C, Graham A, Grummel V, Guaschino C, Hadjixenofontos A, Hakonarson H, Halfpenny C, Hall G, Hall P, Hamsten A, Harley J, Harrower T, Hawkins C, Hellenthal G, Hillier C, Hobart J, Hoshi M, Hunt SE, Jagodic M, Jelčić I, Jochim A, Kendall B, Kermode A, Kilpatrick T, Koivisto K, Konidari I, Korn T, Kronsbein H, Langford C, Larsson M, Lathrop M, Lebrun-Frenay C, Lechner-Scott J, Lee MH, Leone MA, Leppä V, Liberatore G, Lie BA, Lill CM, Lindén M, Link J, Luessi F, Lycke J, Macciardi F, Männistö S, Manrique CP, Martin R, Martinelli V, Mason D, Mazibrada G, McCabe C, Mero

I-L, Mescheriakova J, Moutsianas L, Myhr K-M, Nagels G, Nicholas R, Nilsson P, Piehl F, Pirinen M, Price SE, Quach H, Reunanen M, Robberecht W, Robertson NP, Rodegher M, Rog D, Salvetti M, Schnetz-Boutaud NC, Sellebjerg F, Selter RC, Schaefer C, Shaunak S, Shen L, Shields S, Siffrin V, Slee M, Sorensen PS, Sorosina M, Sospedra M, Spurkland A, Strange A, Sundqvist E, Thijs V, Thorpe J, Ticca A, Tienari P, van Duijn C, Visser EM, Vucic S, Westerlind H, Wiley JS, Wilkins A, Wilson JF, Winkelmann J, Zajicek J, Zindler E, Haines JL, Pericak-Vance MA, Ivinson AJ, Stewart G, Hafler D, Hauser SL, Compston A, McVean G, Jager PD, Sawcer SJ, McCauley JL. Analysis of immune-related loci identifies 48 new susceptibility variants for multiple sclerosis. Nat Genet. 2013;45(11):1353. doi:10.1038/ng.2770

38. Hollenbach JA, Oksenberg JR. The immunogenetics of multiple sclerosis: A comprehensive review. J Autoimmun. 2015;6413–25. doi:10.1016/j.jaut.2015.06.010
39. Lincoln MR, Ramagopalan SV, Chao MJ, Herrera BM, Deluca GC, Orton S-M, Dyment DA, Sadovnick AD, Ebers GC. Epistasis among HLA-DRB1, HLA-DQA1, and HLA-DQB1 loci determines multiple sclerosis susceptibility. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009;106(18):7542–7. doi:10.1073/pnas.0812664106
40. Pan G, Simpson S JR, van der Mei I, Charlesworth JC, Lucas R, Ponsonby A-L, Zhou Y, Wu F, Taylor BV. Role of genetic susceptibility variants in predicting clinical course in multiple sclerosis: a cohort study. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 2016;87(11):1204–11. doi:10.1136/jnnp-2016-313722
41. Isobe N, Keshavan A, Gourraud P-A, Zhu AH, Datta E, Schlaeger R, Caillier SJ, Santaniello A, Lizée A, Himmelstein DS, Baranzini SE, Hollenbach J, Cree BAC, Hauser SL, Oksenberg JR, Henry RG. Association of HLA Genetic Risk Burden With Disease Phenotypes in Multiple Sclerosis. JAMA Neurol. 2016;73(7):795–802. doi:10.1001/jamaneurol.2016.0980
42. Luckey D, Bastakoty D, Mangalam AK. Role of HLA class II genes in susceptibility and resistance to multiple sclerosis: Studies using HLA transgenic mice. J Autoimmun. 2011;37(2):122–8. doi:10.1016/j.jaut.2011.05.001
43. Riedhammer C, Weissert R. Antigen Presentation, Autoantigens, and Immune Regulation in Multiple Sclerosis and Other Autoimmune Diseases. Front Immunol. 2015;6322. doi:10.3389/fimmu.2015.00322
44. Sallusto F, Impellizzieri D, Basso C, Laroni A, Uccelli A, Lanzavecchia A, Engelhardt B. T-cell trafficking in the central nervous system. Immunol Rev. 2012;248(1):216–27. doi:10.1111/j.1600-065X.2012.01140.x
45. Jones AP, Kermode AG, Lucas RM, Carroll WM, Nolan D, Hart PH. Circulating immune cells in multiple sclerosis. Clin Exp Immunol. 2017;187(2):193–203. doi:10.1111/cei.12878
46. Deczkowska A, Baruch K, Schwartz M. Type I/II Interferon Balance in the Regulation of Brain Physiology and Pathology. Trends Immunol. 2016;37(3):181–92. doi:10.1016/j.it.2016.01.006
47. Abdolahi M, Yavari P, Honarvar NM, Bitarafan S, Mahmoudi M, Saboor-Yaraghi AA. Molecular Mechanisms of the Action of Vitamin A in Th17/Treg Axis in

Multiple Sclerosis. J Mol Neurosci. 2015;57(4):605–13. doi:10.1007/s12031-015-0643-1

48. Fletcher JM, Lalor SJ, Sweeney CM, Tubridy N, Mills KHG. T cells in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. Clin Exp Immunol. 2010;162(1):1–11. doi:10.1111/j.1365-2249.2010.04143.x
49. Jäger A, Dardalhon V, Sobel RA, Bettelli E, Kuchroo VK. Th1, Th17, and Th9 effector cells induce experimental autoimmune encephalomyelitis with different pathological phenotypes. J Immunol. 2009;183(11):7169–77. doi:10.4049/jimmunol.0901906
50. Olsson T. Cytokines in neuroinflammatory disease: Role of myelin autoreactive T cell production of interferon-gamma. J Neuroimmunol. 1992;40(2-3):211–8. doi:10.1016/0165-5728(92)90135-8
51. Correale J, Gilmore W, McMillan M, Li S, McCarthy K, Le T, Weiner LP. Patterns of cytokine secretion by autoreactive proteolipid protein-specific T cell clones during the course of multiple sclerosis. J Immunol [Internet]. 1995;154(6):2959–68. Available from: http://www.jimmunol.org/content/154/6/2959.full.pdf
52. Olsson T, Zhi WW, Höjeberg B, Kostulas V, Jiang YP, Anderson G, Ekre HP, Link H. Autoreactive T lymphocytes in multiple sclerosis determined by antigen-induced secretion of interferon-gamma. J Clin Invest. 1990;86(3):981–5. doi:10.1172/JCI114800
53. Panitch H, Haley A, Hirsch R, Johnson K. Exacerbations of multiple sclerosis in patients treated with gamma interferon. The Lancet. 1987;329(8538):893–5. doi:10.1016/S0140-6736(87)92863-7
54. Volpe E, Battistini L, Borsellino G. Advances in T Helper 17 Cell Biology: Pathogenic Role and Potential Therapy in Multiple Sclerosis. Mediators Inflamm. 2015;2015475158. doi:10.1155/2015/475158
55. Jadidi-Niaragh F, Mirshafiey A. Th17 cell, the new player of neuroinflammatory process in multiple sclerosis. Scand J Immunol. 2011;74(1):1–13. doi:10.1111/j.1365-3083.2011.02536.x
56. O'Connor RA, Prendergast CT, Sabatos CA, Lau CWZ, Leech MD, Wraith DC, Anderton SM. Cutting edge: Th1 cells facilitate the entry of Th17 cells to the central nervous system during experimental autoimmune encephalomyelitis. J Immunol. 2008;181(6):3750–4.
57. Domingues HS, Mues M, Lassmann H, Wekerle H, Krishnamoorthy G. Functional and pathogenic differences of Th1 and Th17 cells in experimental autoimmune encephalomyelitis. PLoS One. 2010;5(11):e15531. doi:10.1371/journal.pone.0015531
58. Paroni M, Maltese V, Simone M de, Ranzani V, Larghi P, Fenoglio C, Pietroboni AM, Riz MA de, Crosti MC, Maglie S, Moro M, Caprioli F, Rossi R, Rossetti G, Galimberti D, Pagani M, Scarpini E, Abrignani S, Geginat J. Recognition of viral and self-antigens by TH1 and TH1/TH17 central memory cells in patients with multiple sclerosis reveals distinct roles in immune surveillance and relapses. J Allergy Clin Immunol. 2017;140(3):797–808. doi:10.1016/j.jaci.2016.11.045

59. Basdeo SA, Cluxton D, Sulaimani J, Moran B, Canavan M, Orr C, Veale DJ, Fearon U, Fletcher JM. Ex-Th17 (Nonclassical Th1) Cells Are Functionally Distinct from Classical Th1 and Th17 Cells and Are Not Constrained by Regulatory T Cells. J Immunol. 2017;198(6):2249–59. doi:10.4049/jimmunol.1600737
60. Murphy KM, Weaver C. Janeway's immunobiology. 9th ed. New York, London: GS Garland Science Taylor & Francis Group; 2017. 904 p. eng.
61. Rolla S, Bardina V, Mercanti S de, Quaglino P, Palma R de, Gned D, Brusa D, Durelli L, Novelli F, Clerico M. Th22 cells are expanded in multiple sclerosis and are resistant to IFN-beta. J Leukoc Biol. 2014;96(6):1155–64. doi:10.1189/jlb.5A0813-463RR
62. Jacobsen M, Cepok S, Quak E, Happel M, Gaber R, Ziegler A, Schock S, Oertel WH, Sommer N, Hemmer B. Oligoclonal expansion of memory CD8+ T cells in cerebrospinal fluid from multiple sclerosis patients. Brain. 2002;125(3):538–50. doi:10.1093/brain/awf059
63. Malmeström C, Lycke J, Haghighi S, Andersen O, Carlsson L, Wadenvik H, Olsson B. Relapses in multiple sclerosis are associated with increased CD8+ T-cell mediated cytotoxicity in CSF. J Neuroimmunol. 2008;196(1-2):159–65. doi:10.1016/j.jneuroim.2008.03.001
64. Babbe H, Roers A, Waisman A, Lassmann H, Goebels N, Hohlfeld R, Friese M, Schröder R, Deckert M, Schmidt S, Ravid R, Rajewsky K. Clonal Expansions of Cd8 + T Cells Dominate the T Cell Infiltrate in Active Multiple Sclerosis Lesions as Shown by Micromanipulation and Single Cell Polymerase Chain Reaction. J Exp Med. 2000;192(3):393–404. doi:10.1084/jem.192.3.393
65. Sauer BM, Schmalstieg WF, Howe CL. Axons are injured by antigen-specific CD8(+) T cells through a MHC class I- and granzyme B-dependent mechanism. Neurobiol Dis. 2013;59194–205. doi:10.1016/j.nbd.2013.07.010
66. Sinha S, Itani FR, Karandikar NJ. Immune regulation of multiple sclerosis by CD8+ T cells. Immunol Res. 2014;59(1-3):254–65. doi:10.1007/s12026-014-8529-9
67. Cunnusamy K, Baughman EJ, Franco J, Ortega SB, Sinha S, Chaudhary P, Greenberg BM, Frohman EM, Karandikar NJ. Disease exacerbation of multiple sclerosis is characterized by loss of terminally differentiated autoregulatory CD8+ T cells. Clin Immunol. 2014;152(1-2):115–26. doi:10.1016/j.clim.2014.03.005
68. Kleinewietfeld M, Hafler DA. Regulatory T cells in autoimmune neuroinflammation. Immunol Rev. 2014;259(1):231–44. doi:10.1111/imr.12169
69. Danikowski KM, Jayaraman S, Prabhakar BS. Regulatory T cells in multiple sclerosis and myasthenia gravis. J Neuroinflammation. 2017;14(1):117. doi:10.1186/s12974-017-0892-8
70. Rodi M, Dimisianos N, Lastic A-L de, Sakellaraki P, Deraos G, Matsoukas J, Papathanasopoulos P, Mouzaki A. Regulatory Cell Populations in Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis (RRMS) Patients: Effect of Disease Activity and Treatment Regimens. Int J Mol Sci. 2016;17(9). doi:10.3390/ijms17091398

71. Kohm AP, Carpentier PA, Anger HA, Miller SD. Cutting edge: CD4+CD25+ regulatory T cells suppress antigen-specific autoreactive immune responses and central nervous system inflammation during active experimental autoimmune encephalomyelitis. J Immunol. 2002;169(9):4712–6.
72. Correale J, Villa A. Role of CD8+ CD25+ Foxp3+ regulatory T cells in multiple sclerosis. Ann Neurol. 2010;67(5):625–38. doi:10.1002/ana.21944
73. Kumar V, Stellrecht K, Sercarz E. Inactivation of T cell receptor peptide-specific CD4 regulatory T cells induces chronic experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). J Exp Med. 1996;184(5):1609–17.
74. El Behi M, Sanson C, Bachelin C, Guillot-Noël L, Fransson J, Stankoff B, Maillart E, Sarrazin N, Guillemot V, Abdi H, Cournu-Rebeix I, Fontaine B, Zujovic V. Adaptive human immunity drives remyelination in a mouse model of demyelination. Brain. 2017;140(4):967–80. doi:10.1093/brain/awx008
75. Bankoti J, Apeltsin L, Hauser SL, Allen S, Albertolle ME, Witkowska HE, Büdingen H-C v. In multiple sclerosis, oligoclonal bands connect to peripheral B-cell responses. Ann Neurol. 2014;75(2):266–76. doi:10.1002/ana.24088
76. Dobson R, Ramagopalan S, Davis A, Giovannoni G. Cerebrospinal fluid oligoclonal bands in multiple sclerosis and clinically isolated syndromes: a meta-analysis of prevalence, prognosis and effect of latitude. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 2013;84(8):909–14. doi:10.1136/jnnp-2012-304695
77. Jelcic I, Al Nimer F, Wang J, Lentsch V, Planas R, Jelcic I, Madjovski A, Ruhrmann S, Faigle W, Frauenknecht K, Pinilla C, Santos R, Hammer C, Ortiz Y, Opitz L, Grönlund H, Rogler G, Boyman O, Reynolds R, Lutterotti A, Khademi M, Olsson T, Piehl F, Sospedra M, Martin R. Memory B Cells Activate Brain-Homing, Autoreactive CD4+ T Cells in Multiple Sclerosis. Cell. 2018;175(1):85-100.e23. doi:10.1016/j.cell.2018.08.011
78. Wunsch M, Hohmann C, Milles B, Rostermund C, Lehmann PV, Schroeter M, Bayas A, Ulzheimer J, Mäurer M, Ergün S, Kuerten S. The Correlation between the Virus- and Brain Antigen-Specific B Cell Response in the Blood of Patients with Multiple Sclerosis. Viruses. 2016;8(4):105. doi:10.3390/v8040105
79. Baker D, Marta M, Pryce G, Giovannoni G, Schmierer K. Memory B Cells are Major Targets for Effective Immunotherapy in Relapsing Multiple Sclerosis. EBioMedicine. 2017;1641–50. doi:10.1016/j.ebiom.2017.01.042
80. Luessi F, Zipp F, Witsch E. Dendritic cells as therapeutic targets in neuroinflammation. Cell Mol Life Sci. 2016;73(13):2425–50. doi:10.1007/s00018-016-2170-9
81. Quintana FJ, Yeste A, Mascanfroni ID. Role and therapeutic value of dendritic cells in central nervous system autoimmunity. Cell Death Differ. 2015;22(2):215–24. doi:10.1038/cdd.2014.125
82. Fan X, Zhang H, Cheng Y, Jiang X, Zhu J, Jin T. Double Roles of Macrophages in Human Neuroimmune Diseases and Their Animal Models. Mediators Inflamm. 2016;20168489251. doi:10.1155/2016/8489251
83. Podbielska M, Das A, Smith AW, Chauhan A, Ray SK, Inoue J, Azuma M, Nozaki K, Hogan EL, Banik NL. Neuron-microglia interaction induced bi-

directional cytotoxicity associated with calpain activation. J Neurochem. 2016;139(3):440–55. doi:10.1111/jnc.13774

84. Kaur G, Trowsdale J, Fugger L. Natural killer cells and their receptors in multiple sclerosis. Brain. 2013;136(Pt 9):2657–76. doi:10.1093/brain/aws159
85. Rodríguez-Martín E, Picón C, Costa-Frossard L, Alenda R, La Sainz de Maza S, Roldán E, Espiño M, Villar LM, Álvarez-Cermeño JC. Natural killer cell subsets in cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis. Clin Exp Immunol. 2015;180(2):243–9. doi:10.1111/cei.12580
86. Gross CC, Schulte-Mecklenbeck A, Runzi A, Kuhlmann T, Posevitz-Fejfar A, Schwab N, Schneider-Hohendorf T, Herich S, Held K, Konjevic M, Hartwig M, Dornmair K, Hohlfeld R, Ziemssen T, Klotz L, Meuth SG, Wiendl H. Impaired NK-mediated regulation of T-cell activity in multiple sclerosis is reconstituted by IL-2 receptor modulation. Proc Natl Acad Sci U S A. 2016;113(21):E2973-82. doi:10.1073/pnas.1524924113
87. Laroni A, Armentani E, Kerlero de Rosbo N, Ivaldi F, Marcenaro E, Sivori S, Gandhi R, Weiner HL, Moretta A, Mancardi GL, Uccelli A. Dysregulation of regulatory CD56(bright) NK cells/T cells interactions in multiple sclerosis. J Autoimmun. 2016;728–18. doi:10.1016/j.jaut.2016.04.003
88. Rudolph MG, Stanfield RL, Wilson IA. How TCRs bind MHCs, peptides, and coreceptors. Annu Rev Immunol. 2006;24419–66. doi:10.1146/annurev.immunol.23.021704.115658
89. Smith KJ, Pyrdol J, Gauthier L, Wiley DC, Wucherpfennig KW. Crystal structure of HLA-DR2 (DRA*0101, DRB1*1501) complexed with a peptide from human myelin basic protein. J Exp Med. 1998;188(8):1511–20.
90. Neefjes J, Jongsma MLM, Paul P, Bakke O. Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. Nat Rev Immunol. 2011;11(12):823–36. doi:10.1038/nri3084
91. Trombetta ES, Mellman I. Cell biology of antigen processing in vitro and in vivo. Annu Rev Immunol. 2005;23975–1028. doi:10.1146/annurev.immunol.22.012703.104538
92. Germain RN. MHC-dependent antigen processing and peptide presentation: Providing ligands for T lymphocyte activation. Cell. 1994;76(2):287–99. doi:10.1016/0092-8674(94)90336-0
93. Michelet X, Garg S, Wolf BJ, Tuli A, Ricciardi-Castagnoli P, Brenner MB. MHC class II presentation is controlled by the lysosomal small GTPase, Arl8b. J Immunol. 2015;194(5):2079–88. doi:10.4049/jimmunol.1401072
94. Wijdeven RH, Bakker JM, Paul P, Neefjes J. Exploring genome-wide datasets of MHC class II antigen presentation. Mol Immunol. 2013;55(2):172–4. doi:10.1016/j.molimm.2012.10.014
95. Riberdy JM, Newcomb JR, Surman MJ, Barbosat JA, Cresswell P. HLA-DR molecules from an antigen-processing mutant cell line are associated with invariant chain peptides. Nature. 1992;360(6403):474. doi:10.1038/360474a0

96. Lavi E, Suzumura A, Murasko DM, Murray EM, Silberberg DH, Weiss SR. Tumor necrosis factor induces expression of MHC class I antigens on mouse astrocytes. J Neuroimmunol. 1988;18(3):245–53.
97. Biswas A, Meissner TB, Kawai T, Kobayashi KS. Cutting edge: Impaired MHC class I expression in mice deficient for Nlrc5/class I transactivator. J Immunol. 2012;189(2):516–20. doi:10.4049/jimmunol.1200064
98. Chang C-H, Guerder S, Hong S-C, van Ewijk W, Flavell RA. Mice Lacking the MHC Class II Transactivator (CIITA) Show Tissue-Specific Impairment of MHC Class II Expression. Immunity. 1996;4(2):167–78. doi:10.1016/S1074-7613(00)80681-0
99. Gobin SJ, Montagne L, van Zutphen M, van der Valk P, van den Elsen PJ, Groot CJ de. Upregulation of transcription factors controlling MHC expression in multiple sclerosis lesions. Glia. 2001;36(1):68–77.
100. Al-Lazikani B, Lesk AM, Chothia C. Canonical structures for the hypervariable regions of T cell alphabeta receptors. J Mol Biol. 2000;295(4):979–95. doi:10.1006/jmbi.1999.3358
101. Deng L, Langley RJ, Wang Q, Topalian SL, Mariuzza RA. Structural insights into the editing of germ-line-encoded interactions between T-cell receptor and MHC class II by Vα CDR3. Proc Natl Acad Sci U S A. 2012;109(37):14960–5. doi:10.1073/pnas.1207186109
102. Birnbaum ME, Mendoza JL, Sethi DK, Dong S, Glanville J, Dobbins J, Ozkan E, Davis MM, Wucherpfennig KW, Garcia KC. Deconstructing the peptide-MHC specificity of T cell recognition. Cell. 2014;157(5):1073–87. doi:10.1016/j.cell.2014.03.047
103. Davis MM, Bjorkman PJ. T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition. Nature. 1988;334(6181):395–402. doi:10.1038/334395a0
104. Garcia KC, Degano M, Pease LR, Huang M, Peterson PA, Teyton L, Wilson IA. Structural basis of plasticity in T cell receptor recognition of a self peptide-MHC antigen. Science. 1998;279(5354):1166–72.
105. Garcia KC, Degano M, Stanfield RL, Brunmark A, Jackson MR, Peterson PA, Teyton L, Wilson IA. An alphabeta T cell receptor structure at 2.5 A and its orientation in the TCR-MHC complex. Science. 1996;274(5285):209–19.
106. Machius M, Cianga P, Deisenhofer J, Ward ES. Crystal structure of a T cell receptor Valpha11 (AV11S5) domain: new canonical forms for the first and second complementarity determining regions. J Mol Biol. 2001;310(4):689–98. doi:10.1006/jmbi.2001.4794
107. Reiser JB, Grégoire C, Darnault C, Mosser T, Guimezanes A, Schmitt-Verhulst AM, Fontecilla-Camps JC, Mazza G, Malissen B, Housset D. A T cell receptor CDR3beta loop undergoes conformational changes of unprecedented magnitude upon binding to a peptide/MHC class I complex. Immunity. 2002;16(3):345–54.
108. Mason D. A very high level of crossreactivity is an essential feature of the T-cell receptor. Immunol Today. 1998;19(9):395–404.

109. Reiser J-B, Darnault C, Grégoire C, Mosser T, Mazza G, Kearney A, van der Merwe PA, Fontecilla-Camps JC, Housset D, Malissen B. CDR3 loop flexibility contributes to the degeneracy of TCR recognition. Nat Immunol. 2003;4(3):241–7. doi:10.1038/ni891
110. Yin Y, Li Y, Mariuzza RA. Structural basis for self-recognition by autoimmune T-cell receptors. Immunol Rev. 2012;250(1):32–48. doi:10.1111/imr.12002
111. Hahn M, Nicholson MJ, Pyrdol J, Wucherpfennig KW. Unconventional topology of self peptide-major histocompatibility complex binding by a human autoimmune T cell receptor. Nat Immunol. 2005;6(5):490–6. doi:10.1038/ni1187
112. Sethi DK, Gordo S, Schubert DA, Wucherpfennig KW. Crossreactivity of a human autoimmune TCR is dominated by a single TCR loop. Nat Commun. 2013;42623. doi:10.1038/ncomms3623
113. Segura E, Villadangos JA. A modular and combinatorial view of the antigen cross-presentation pathway in dendritic cells. Traffic. 2011;12(12):1677–85. doi:10.1111/j.1600-0854.2011.01254.x
114. Ji Q, Castelli L, Goverman JM. MHC class I–restricted myelin epitopes are cross-presented by Tip-DCs that promote determinant spreading to $CD8^+$ T cells. Nat Immunol. 2013;14(3):254. doi:10.1038/ni.2513
115. Klein L, Kyewski B, Allen PM, Hogquist KA. Positive and negative selection of the T cell repertoire: what thymocytes see (and don't see). Nat Rev Immunol. 2014;14(6):377–91. doi:10.1038/nri3667
116. Lo W-L, Felix NJ, Walters JJ, Rohrs H, Gross ML, Allen PM. An endogenous peptide positively selects and augments the activation and survival of peripheral CD4+ T cells. Nat Immunol. 2009;10(11):1155–61. doi:10.1038/ni.1796
117. Goodnow CC, Sprent J, Fazekas de St Groth B, Vinuesa CG. Cellular and genetic mechanisms of self tolerance and autoimmunity. Nature. 2005;435(7042):590–7. doi:10.1038/nature03724
118. Schubert DA, Gordo S, Sabatino JJ, Vardhana S, Gagnon E, Sethi DK, Seth NP, Choudhuri K, Reijonen H, Nepom GT, Evavold BD, Dustin ML, Wucherpfennig KW. Self-reactive human CD4 T cell clones form unusual immunological synapses. J Exp Med. 2012;209(2):335–52. doi:10.1084/jem.20111485
119. Appleman LJ, Boussiotis VA. T cell anergy and costimulation. Immunol Rev. 2003;192(1):161–80. doi:10.1034/j.1600-065X.2003.00009.x
120. Kalekar LA, Schmiel SE, Nandiwada SL, Lam WY, Barsness LO, Zhang N, Stritesky GL, Malhotra D, Pauken KE, Linehan JL, O'Sullivan MG, Fife BT, Hogquist KA, Jenkins MK, Mueller DL. $CD4^+$ T cell anergy prevents autoimmunity and generates regulatory T cell precursors. Nat Immunol. 2016;17(3):304. doi:10.1038/ni.3331
121. Stritesky GL, Jameson SC, Hogquist KA. Selection of self-reactive T cells in the thymus. Annu Rev Immunol. 2012;3095–114. doi:10.1146/annurev-immunol-020711-075035
122. Schulze L. Untersuchung der peptidspezifischen Immunantwort sowie möglicher Zusammenhänge zwischen den Serumparametern Vitamin D,

Cholesterin, TSH und fT4 auf die ex-vivo Reaktivität von T-Lymphozyten bei der MS [Dissertation]. Regensburg: Universität Regensburg; 2019.

123. EPS15 - Epidermal growth factor receptor substrate 15 - Homo sapiens (Human) - EPS15 gene & protein [Internet] [cited 2018 Sep 3]. Available from: https://www.uniprot.org/uniprot/P42566
124. Wong WT, Kraus MH, Carlomagno F, Zelano A, Druck T, Croce CM, Huebner K, Di Fiore PP. The human eps15 gene, encoding a tyrosine kinase substrate, is conserved in evolution and maps to 1p31-p32. Oncogene. 1994;9(6):1591–7.
125. Roxrud I, Raiborg C, Pedersen NM, Stang E, Stenmark H. An endosomally localized isoform of Eps15 interacts with Hrs to mediate degradation of epidermal growth factor receptor. J Cell Biol. 2008;180(6):1205–18. doi:10.1083/jcb.200708115
126. Morgan JR, Prasad K, Jin S, Augustine GJ, Lafer EM. Eps15 Homology Domain-NPF Motif Interactions Regulate Clathrin Coat Assembly during Synaptic Vesicle Recycling. J. Biol. Chem. 2003;278(35):33583–92. doi:10.1074/jbc.M304346200
127. GPM6B - Neuronal membrane glycoprotein M6-b - Homo sapiens (Human) - GPM6B gene & protein [Internet] [cited 2018 Sep 3]. Available from: https://www.uniprot.org/uniprot/Q13491
128. Fjorback AW, Müller HK, Wiborg O. Membrane glycoprotein M6B interacts with the human serotonin transporter. J Mol Neurosci. 2009;37(3):191–200. doi:10.1007/s12031-008-9092-4
129. Olinsky S, Loop BT, DeKosky A, Ripepi B, Weng W, Cummins J, Wenger SL, Yan Y, Lagenaur C, Narayanan V. Chromosomal mapping of the human M6 genes. Genomics. 1996;33(3):532–6. doi:10.1006/geno.1996.0231
130. PLP1 - Myelin proteolipid protein - Homo sapiens (Human) - PLP1 gene & protein [Internet] [cited 2018 Sep 3]. Available from: https://www.uniprot.org/uniprot/P60201
131. Simons R, Alon N, Riordan JR. Human myelin DM-20 proteolipid protein deletion defined by cDNA sequence. Biochem Biophys Res Commun. 1987;146(2):666–71. doi:10.1016/0006-291X(87)90580-8
132. Bruno R, Sabater L, Sospedra M, Ferrer-Francesch X, Escudero D, Martínez-Cáceres E, Pujol-Borrell R. Multiple sclerosis candidate autoantigens except myelin oligodendrocyte glycoprotein are transcribed in human thymus. Eur J Immunol. 2002;32(10):2737–47. doi:10.1002/1521-4141(2002010)32:10<2737:AID-IMMU2737>3.0.CO;2-0
133. Klein L, Klugmann M, Nave K-A, Tuohy VK, Kyewski B. Shaping of the autoreactive T-cell repertoire by a splice variant of self protein expressed in thymic epithelial cells. Nature Medicine. 2000;6(1):56. doi:10.1038/71540
134. Diehl HJ, Schaich M, Budzinski RM, Stoffel W. Individual exons encode the integral membrane domains of human myelin proteolipid protein. Proc Natl Acad Sci U S A. 1986;83(24):9807–11.

135. Hudson LD, Friedrich VL, Behar T, Dubois-Dalcq M, Lazzarini RA. The initial events in myelin synthesis: Orientation of proteolipid protein in the plasma membrane of cultured oligodendrocytes. J Cell Biol. 1989;109(2):717–27.
136. Laššuthová P, Žaliová M, Inoue K, Haberlová J, Sixtová K, Sakmaryová I, Paděrová K, Mazanec R, Zámečník J, Šišková D, Garbern J, Seeman P. Three new PLP1 splicing mutations demonstrate pathogenic and phenotypic diversity of Pelizaeus-Merzbacher disease. J Child Neurol. 2014;29(7):924–31. doi:10.1177/0883073813492387
137. Warshawsky I, Rudick RA, Staugaitis SM, Natowicz MR. Primary progressive multiple sclerosis as a phenotype of a PLP1 gene mutation. Ann Neurol. 2005;58(3):470–3. doi:10.1002/ana.20601
138. McMahon RM, Friis L, Siebold C, Friese MA, Fugger L, Jones EY. Structure of HLA-A*0301 in complex with a peptide of proteolipid protein: Insights into the role of HLA-A alleles in susceptibility to multiple sclerosis. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr. 2011;67(Pt 5):447–54. doi:10.1107/S0907444911007888
139. Goodin DS. Glucocorticoid treatment of multiple sclerosis. Handb Clin Neurol. 2014;122455–64. doi:10.1016/B978-0-444-52001-2.00020-0
140. Dargahi N, Katsara M, Tselios T, Androutsou M-E, Courten M de, Matsoukas J, Apostolopoulos V. Multiple Sclerosis: Immunopathology and Treatment Update. Brain Sci. 2017;7(7). doi:10.3390/brainsci7070078
141. Bittner S, Wiendl H. Neuroimmunotherapies Targeting T Cells: From Pathophysiology to Therapeutic Applications. Neurotherapeutics. 2016;13(1):4–19. doi:10.1007/s13311-015-0405-3
142. Dorr J, Baum K. Alemtuzumab in the treatment of multiple sclerosis: patient selection and special considerations. Drug Des Devel Ther. 2016;103379–86. doi:10.2147/DDDT.S97956
143. Antoniol C, Stankoff B. Immunological Markers for PML Prediction in MS Patients Treated with Natalizumab. Front Immunol. 2014;5668. doi:10.3389/fimmu.2014.00668
144. Bittner S, Ruck T, Wiendl H, Grauer OM, Meuth SG. Targeting B cells in relapsing-remitting multiple sclerosis: from pathophysiology to optimal clinical management. Ther Adv Neurol Disord. 2017;10(1):51–66. doi:10.1177/1756285616666741
145. Dendrou CA, Fugger L. Immunomodulation in multiple sclerosis: Promises and pitfalls. Curr Opin Immunol. 2017;4937–43. doi:10.1016/j.coi.2017.08.013
146. Lamb YN. Ozanimod: First Approval. Drugs. 2020;80(8):841–8. doi:10.1007/s40265-020-01319-7
147. Wraith DC, McDevitt HO, Steinman L, Acha-Orbea H. T cell recognition as the target for immune intervention in autoimmune disease. Cell. 1989;57(5):709–15. doi:10.1016/0092-8674(89)90786-1
148. Zamvil SS, Steinman L. The T lymphocyte in experimental allergic encephalomyelitis. Annu Rev Immunol. 1990;8579–621. doi:10.1146/annurev.iy.08.040190.003051

149. Riedhammer C, Halbritter D, Weissert R. Increased immune reactivity to central nervous system-derived naturally presented peptides in patients with active multiple sclerosis. J Allergy Clin Immunol. 2017;139(2):694-696.e7. doi:10.1016/j.jaci.2016.08.015
150. Polman CH, Reingold SC, Banwell B, Clanet M, Cohen JA, Filippi M, Fujihara K, Havrdova E, Hutchinson M, Kappos L, Lublin FD, Montalban X, O'Connor P, Sandberg-Wollheim M, Thompson AJ, Waubant E, Weinshenker B, Wolinsky JS. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria. Ann Neurol. 2011;69(2):292–302. doi:10.1002/ana.22366
151. Lublin FD, Reingold SC, Cohen JA, Cutter GR, Sørensen PS, Thompson AJ, Wolinsky JS, Balcer LJ, Banwell B, Barkhof F, Bebo B, Calabresi PA, Clanet M, Comi G, Fox RJ, Freedman MS, Goodman AD, Inglese M, Kappos L, Kieseier BC, Lincoln JA, Lubetzki C, Miller AE, Montalban X, O'Connor PW, Petkau J, Pozzilli C, Rudick RA, Sormani MP, Stüve O, Waubant E, Polman CH. Defining the clinical course of multiple sclerosis: The 2013 revisions. Neurology. 2014;83(3):278–86. doi:10.1212/WNL.0000000000000560
152. Riedhammer C, Halbritter D, Weissert R. Peripheral Blood Mononuclear Cells: Isolation, Freezing, Thawing, and Culture. Methods Mol Biol. 2016;130453–61. doi:10.1007/7651_2014_99
153. Fissolo N, Haag S, Graaf KL de, Drews O, Stevanovic S, Rammensee HG, Weissert R. Naturally presented peptides on major histocompatibility complex I and II molecules eluted from central nervous system of multiple sclerosis patients. Mol Cell Proteomics. 2009;8(9):2090–101. doi:10.1074/mcp.M900001-MCP200
154. UniProt Consortium T. UniProt: The universal protein knowledgebase. Nucleic Acids Res. 2018;46(5):2699. doi:10.1093/nar/gky092
155. Johnson M, Zaretskaya I, Raytselis Y, Merezhuk Y, McGinnis S, Madden TL. NCBI BLAST: A better web interface. Nucleic Acids Res. 2008;36(Web Server issue):W5-9. doi:10.1093/nar/gkn201
156. Goris A, Walton A, Ban M, Dubois B, Compston A, Sawcer S. A Taqman assay for high-throughput genotyping of the multiple sclerosis-associated HLA-DRB1*1501 allele. Tissue Antigens. 2008;72(4):401–3. doi:10.1111/j.1399-0039.2008.01101.x
157. H. J. Motulsky. GraphPad Statistics Guide [Internet]. 2018 [updated 2018 Apr 9; cited 2018 Jul 27]. Available from: https://www.graphpad.com/guides/prism/7/statistics/index.htm?the_results_of_a_kruskal-wallis_test.htm
158. H. J. Motulsky. GraphPad Statistics Guide [Internet]. 2018 [updated 2018 Apr 9; cited 2018 Jul 26]. Available from: https://www.graphpad.com/guides/prism/7/statistics/index.htm?stat_when_to_not_correct_for_2.htm
159. Rothman KJ. No adjustments are needed for multiple comparisons. Epidemiology. 1990;1(1):43–6.

160. Dang M, Rockell J, Wagner R, Wenzlau JM, Yu L, Hutton JC, Gottlieb PA, Davidson HW. Human Type 1 Diabetes Is Associated with T Cell Autoimmunity to Zinc Transporter 8. J Immunol. 2011;186(10):6056–63. doi:10.4049/jimmunol.1003815
161. Riedhammer C. Immunreaktivitäten gegen im zentralen Nervensystem natürlich präsentierte Peptide bei Patienten mit Multipler Sklerose [Dissertation]. Regensburg: Universität Regensburg; 2017.
162. Herich S, Schneider-Hohendorf T, Rohlmann A, Khaleghi Ghadiri M, Schulte-Mecklenbeck A, Zondler L, Janoschka C, Ostkamp P, Richter J, Breuer J, Dimitrov S, Rammensee H-G, Grauer OM, Klotz L, Gross CC, Stummer W, Missler M, Zarbock A, Vestweber D, Wiendl H, Schwab N. Human CCR5high effector memory cells perform CNS parenchymal immune surveillance via GZMK-mediated transendothelial diapedesis. Brain. 2019;142(11):3411–27. doi:10.1093/brain/awz301
163. Minohara M, Ochi H, Matsushita S, Irie A, Nishimura Y, Kira J. Differences between T-cell reactivities to major myelin protein-derived peptides in opticospinal and conventional forms of multiple sclerosis and healthy controls. Tissue Antigens. 2001;57(5):447–56. doi:10.1034/j.1399-0039.2001.057005447.x
164. Pelfrey CM, Trotter JL, Tranquill LR, McFarland HF. Identification of a novel T cell epitope of human proteolipid protein (residues 40–60) recognized by proliferative and cytolytic CD4+ T cells from multiple sclerosis patients. J Neuroimmunol. 1993;46(1-2):33–42. doi:10.1016/0165-5728(93)90231-M
165. Trotter JL, Pelfrey CM, Trotter AL, Selvidge JA, Gushleff KC, Mohanakumar T, McFarland HF. T cell recognition of myelin proteolipid protein and myelin proteolipid protein peptides in the peripheral blood of multiple sclerosis and control subjects. J Neuroimmunol. 1998;84(2):172–8.
166. Doherty TM, Demissie A, Menzies D, Andersen P, Rook G, Zumla A. Effect of sample handling on analysis of cytokine responses to Mycobacterium tuberculosis in clinical samples using ELISA, ELISPOT and quantitative PCR. J Immunol Methods. 2005;298(1-2):129–41. doi:10.1016/j.jim.2005.01.013
167. Lünemann JD, Jelcić I, Roberts S, Lutterotti A, Tackenberg B, Martin R, Münz C. EBNA1-specific T cells from patients with multiple sclerosis cross react with myelin antigens and co-produce IFN-gamma and IL-2. J Exp Med. 2008;205(8):1763–73. doi:10.1084/jem.20072397
168. Abana CO, Pilkinton MA, Gaudieri S, Chopra A, McDonnell WJ, Wanjalla C, Barnett L, Gangula R, Hager C, Jung DK, Engelhardt BG, Jagasia MH, Klenerman P, Phillips EJ, Koelle DM, Kalams SA, Mallal SA. Cytomegalovirus (CMV) Epitope-Specific CD4+ T Cells Are Inflated in HIV+ CMV+ Subjects. J Immunol. 2017;199(9):3187–201. doi:10.4049/jimmunol.1700851
169. Bandala-Sanchez E, Zhang Y, Reinwald S, Dromey JA, Lee B-H, Qian J, Böhmer RM, Harrison LC. T cell regulation mediated by interaction of soluble CD52 with the inhibitory receptor Siglec-10. Nat Immunol. 2013;14(7):741. doi:10.1038/ni.2610

170. Ooi JD, Petersen J, Tan YH, Huynh M, Willett ZJ, Ramarathinam SH, Eggenhuizen PJ, Loh KL, Watson KA, Gan PY, Alikhan MA, Dudek NL, Handel A, Hudson BG, Fugger L, Power DA, Holt SG, Coates PT, Gregersen JW, Purcell AW, Holdsworth SR, La Gruta NL, Reid HH, Rossjohn J, Kitching AR. Dominant protection from HLA-linked autoimmunity by antigen-specific regulatory T cells. Nature. 2017;545(7653):243. doi:10.1038/nature22329
171. Graaf KL de, Wallström E, Muhallab S, Wiesmüller K-H, Olsson T, Weissert R. MHC and non-MHC gene regulation of disease susceptibility and disease course in experimental inflammatory peripheral neuropathy. J Neuroimmunol. 2004;155(1):73–84. doi:10.1016/j.jneuroim.2004.06.001
172. Berthelot L, Laplaud D-A, Pettré S, Ballet C, Michel L, Hillion S, Braudeau C, Connan F, Lefrère F, Wiertlewski S, Guillet J-G, Brouard S, Choppin J, Soulillou J-P. Blood CD8+ T cell responses against myelin determinants in multiple sclerosis and healthy individuals. Eur J Immunol. 2008;38(7):1889–99. doi:10.1002/eji.200838023
173. Tischer S, Dieks D, Sukdolak C, Bunse C, Figueiredo C, Immenschuh S, Borchers S, Stripecke R, Maecker-Kolhoff B, Blasczyk R, Eiz-Vesper B. Evaluation of suitable target antigens and immunoassays for high-accuracy immune monitoring of cytomegalovirus and Epstein-Barr virus-specific T cells as targets of interest in immunotherapeutic approaches. J Immunol Methods. 2014;408101–13. doi:10.1016/j.jim.2014.05.011
174. Huang J, Ehrnfelt C, Paulie S, Zuber B, Ahlborg N. ELISpot and ELISA analyses of human IL-21-secreting cells: Impact of blocking IL-21 interaction with cellular receptors. J Immunol Methods. 2015;41760–6. doi:10.1016/j.jim.2014.12.007
175. Greer JM, Sobel RA, Sette A, Southwood S, Lees MB, Kuchroo VK. Immunogenic and encephalitogenic epitope clusters of myelin proteolipid protein. J Immunol [Internet]. 1996;156(1):371–9. Available from: http://www.jimmunol.org/content/156/1/371.full.pdf
176. Markovic-Plese S, Fukaura H, Zhang J, al-Sabbagh A, Southwood S, Sette A, Kuchroo VK, Hafler DA. T cell recognition of immunodominant and cryptic proteolipid protein epitopes in humans. J Immunol [Internet]. 1995;155(2):982–92. Available from: http://www.jimmunol.org/content/155/2/982.full.pdf
177. Greer JM, Csurhes PA, Muller DM, Pender MP. Correlation of blood T cell and antibody reactivity to myelin proteins with HLA type and lesion localization in multiple sclerosis. J Immunol. 2008;180(9):6402–10. doi:10.4049/jimmunol.180.9.6402
178. Pelfrey CM, Tranquill LR, Vogt AB, McFarland HF. T cell response to two immunodominant proteolipid protein (PLP) peptides in multiple sclerosis patients and healthy controls. Mult Scler. 1996;1(5):270–8. doi:10.1177/135245859600100503
179. Trotter JL, Pelfrey CM, Trotter AL, Selvidge JA, Gushleff KC, Mohanakumar T, McFarland HF. T cell recognition of myelin proteolipid protein and myelin proteolipid protein peptides in the peripheral blood of multiple sclerosis and

control subjects. J Neuroimmunol. 1998;84(2):172–8. doi:10.1016/S0165-5728(97)00260-9

180. John L. Trotter, Cheryl A. Damico, Anne H. Cross, Clara M. Pelfrey, Robert W. Karr, Xin-Ting Fu, Henry F. McFarland. HPRT mutant T-cell lines from multiple sclerosis patients recognize myelin proteolipid protein peptides. J Neuroimmunol. 1997;75(1-2):95–103. doi:10.1016/S0165-5728(97)00007-6
181. Pelfrey CM, Trotter JL, Tranquill LR, McFarland HF. Identification of a second T cell epitore of human proteolipid protein (residues 89–106) recognized by proliferative and cytolytic CD4+ T cells from multiple sclerosis patients. J Neuroimmunol. 1994;53(2):153–61. doi:10.1016/0165-5728(94)90025-6
182. Greer JM, Csurhes PA, Muller DM, Pender MP. Correlation of Blood T Cell and Antibody Reactivity to Myelin Proteins with HLA Type and Lesion Localization in Multiple Sclerosis. J Immunol. 2008;180(9):6402–10. doi:10.4049/jimmunol.180.9.6402
183. Greer JM, Csurhes PA, Cameron KD, McCombe PA, Good MF, Pender MP. Increased immunoreactivity to two overlapping peptides of myelin proteolipid protein in multiple sclerosis. Brain. 1997;120(8):1447–60. doi:10.1093/brain/120.8.1447
184. Pender MP, Csurhes PA, Greer JM, Mowat PD, Henderson RD, Cameron KD, Purdie DM, McCombe PA, Good MF. Surges of Increased T Cell Reactivity to an Encephalitogenic Region of Myelin Proteolipid Protein Occur More Often in Patients with Multiple Sclerosis Than in Healthy Subjects. J Immunol. 2000;165(9):5322–31. doi:10.4049/jimmunol.165.9.5322
185. Honma K, Parker KC, Becker KG, McFarland HF, Coligan JE, Biddison WE. Identification of an epitope derived from human proteolipid protein that can induce autoreactive CD8+ cytotoxic T lymphocytes restricted by HLA-A3: Evidence for cross-reactivity with an environmental microorganism. J Neuroimmunol. 1997;73(1-2):7–14. doi:10.1016/S0165-5728(96)00161-0
186. Biddison WE, Taub DD, Cruikshank WW, Center DM, Connor EW, Honma K. Chemokine and matrix metalloproteinase secretion by myelin proteolipid protein-specific CD8+ T cells: Potential roles in inflammation. J Immunol [Internet]. 1997;158(7):3046–53. Available from: http://www.jimmunol.org/content/158/7/3046.full.pdf
187. Zamanzadeh Z, Ataei M, Nabavi SM, Ahangari G, Sadeghi M, Sanati MH. In Silico Perspectives on the Prediction of the PLP's Epitopes involved in Multiple Sclerosis. Iran J Biotechnol. 2017;15(1):10–21. doi:10.15171/ijb.1356
188. Tsuchida T, Parker KC, Turner RV, McFarland HF, Coligan JE, Biddison WE. Autoreactive CD8+ T-cell responses to human myelin protein-derived peptides. Proc Natl Acad of Sci USA. 1994;91(23):10859–63. doi:10.1073/pnas.91.23.10859
189. Ohashi T, Yamamura T, Inobe J-i, Kondo T, Kunishita T, Tabira T. Analysis of proteolipid protein (PLP)-specific T cells in multiple sclerosis: Identification of PLP 95–116 as an HLA-DR2,w15-associated determinant. Int Immunol. 1995;7(11):1771–8. doi:10.1093/intimm/7.11.1771

190. Trotter JL, Hickey WF, van der Veen RC, Sulze L. Peripheral blood mononuclear cells from multiple sclerosis patients recognize myelin proteolipid protein and selected peptides. J Neuroimmunol. 1991;33(1):55–62. doi:10.1016/0165-5728(91)90034-5
191. Correale J, McMillan M, McCarthy K, Le T, Weiner LP. Isolation and characterization of autoreactive moteolioid protein-peptide specific T-cell clones from multiple sclerosis patients. Neurology. 1995;45(7):1370–5. doi:10.1212/WNL.45.7.1370
192. Chou YK, Bourdette DN, Offner H, Whitham R, Wang R-Y, Hashim GA, Vandenbark AA. Frequency of T cells specific for myelin basic protein and myelin proteolipid protein in blood and cerebrospinal fluid in multiple sclerosis. J Neuroimmunol. 1992;38(1-2):105–13. doi:10.1016/0165-5728(92)90095-3
193. Markovic-Plese S, Fukaura H, Zhang J, al-Sabbagh A, Southwood S, Sette A, Kuchroo VK, Hafler DA. T cell recognition of immunodominant and cryptic proteolipid protein epitopes in humans. J Immunol [Internet]. 1995;155(2):982–92. Available from: http://www.jimmunol.org/content/155/2/982.full.pdf
194. Greer JM, Broadley S, Pender MP. Reactivity to Novel Autoantigens in Patients with Coexisting Central Nervous System Demyelinating Disease and Autoimmune Thyroid Disease. Front. Immunol. 2017;8514. doi:10.3389/fimmu.2017.00514
195. Kaushansky N, Altmann DM, David CS, Lassmann H, Ben-Nun A. DQB1*0602 rather than DRB1*1501 confers susceptibility to multiple sclerosis-like disease induced by proteolipid protein (PLP). J Neuroinflammation. 2012;9(1):29. doi:10.1186/1742-2094-9-29
196. Abreu Costa L de, Henrique Fernandes Ottoni M, Dos Santos MG, Meireles AB, Gomes de Almeida V, Fátima Pereira W de, Alves de Avelar-Freitas B, Eustáquio Alvim Brito-Melo G. Dimethyl Sulfoxide (DMSO) Decreases Cell Proliferation and TNF-α, IFN-γ, and IL-2 Cytokines Production in Cultures of Peripheral Blood Lymphocytes. Molecules. 2017;22(11). doi:10.3390/molecules22111789
197. Yuan C, Gao J, Guo J, Bai L, Marshall C, Cai Z, Wang L, Xiao M. Dimethyl sulfoxide damages mitochondrial integrity and membrane potential in cultured astrocytes. PLoS One. 2014;9(9):e107447. doi:10.1371/journal.pone.0107447
198. Hebling J, Bianchi L, Basso FG, Scheffel DL, Soares DG, Carrilho MRO, Pashley DH, Tjäderhane L, Souza Costa CA de. Cytotoxicity of dimethyl sulfoxide (DMSO) in direct contact with odontoblast-like cells. Dent Mater. 2015;31(4):399–405. doi:10.1016/j.dental.2015.01.007
199. Waldmann H. Human monoclonal antibodies: The residual challenge of antibody immunogenicity. Methods Mol Biol. 2014;10601–8. doi:10.1007/978-1-62703-586-6_1
200. Bogen B, Ruffini P. Review: To what extent are T cells tolerant to immunoglobulin variable regions? Scand J Immunol. 2009;70(6):526–30. doi:10.1111/j.1365-3083.2009.02340.x

201. Bogen B, Malissen B, Haas W. Idiotope-specific T cell clones that recognize syngeneic immunoglobulin fragments in the context of class II molecules. Eur J Immunol. 1986;16(11):1373–8. doi:10.1002/eji.1830161110
202. Harding FA, Stickler MM, Razo J, DuBridge RB. The immunogenicity of humanized and fully human antibodies: Residual immunogenicity resides in the CDR regions. MAbs. 2010;2(3):256–65.
203. Jawa V, Cousens LP, Awwad M, Wakshull E, Kropshofer H, Groot AS de. T-cell dependent immunogenicity of protein therapeutics: Preclinical assessment and mitigation. Clin Immunol. 2013;149(3):534–55. doi:10.1016/j.clim.2013.09.006
204. Linker RA, Rott E, Hofstetter HH, Hanke T, Toyka KV, Gold R. EAE in beta-2 microglobulin-deficient mice: Axonal damage is not dependent on MHC-I restricted immune responses. Neurobiol Dis. 2005;19(1-2):218–28. doi:10.1016/j.nbd.2004.12.017
205. Zhang L, Li L, Ban L, An W, Liu S, Li X, Xue B, Xu Y. Effect of sodium azide on mitochondrial membrane potential in SH-SY5Y human neuroblastoma cells. Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao. 2000;22(5):436–9. chi.
206. Reichstetter S, Kwok WW, Kochik S, Koelle DM, Beaty JS, Nepom GT. MHC-peptide ligand interactions establish a functional threshold for antigen-specific T cell recognition. Hum Immunol. 1999;60(7):608–18.
207. Matis LA, Glimcher LH, Paul WE, Schwartz RH. Magnitude of response of histocompatibility-restricted T-cell clones is a function of the product of the concentrations of antigen and Ia molecules. Proc Natl Acad Sci U S A. 1983;80(19):6019–23.
208. Carballido JM, Carballido-Perrig N, Terres G, Heusser CH, Blaser K. Bee venom phospholipase A2-specific T cell clones from human allergic and non-allergic individuals: Cytokine patterns change in response to the antigen concentration. Eur J Immunol. 1992;22(6):1357–63. doi:10.1002/eji.1830220605
209. Lever M, Maini PK, van der Merwe PA, Dushek O. Phenotypic models of T cell activation. Nat Rev Immunol. 2014;14(9):619–29. doi:10.1038/nri3728
210. Moore GR, McCarron RM, Traugott U, McFarlin DE, Raine CS. Critical threshold for dose of myelin basic protein in murine autoimmune encephalomyelitis. J Neurol Sci. 1987;77(2-3):173–84.
211. Moore GR, Traugott U, Stone SH, Raine CS. Dose-dependency of MBP-induced demyelination in the guinea pig. J Neurol Sci. 1985;70(2):197–205.
212. Taams LS, van Eden W, Wauben MH. Dose-dependent induction of distinct anergic phenotypes: Multiple levels of T cell anergy. J Immunol. 1999;162(4):1974–81.
213. Lever M, Lim H-S, Kruger P, Nguyen J, Trendel N, Abu-Shah E, Maini PK, van der Merwe PA, Dushek O. Architecture of a minimal signaling pathway explains the T-cell response to a 1 million-fold variation in antigen affinity and dose. Proc Natl Acad Sci U S A. 2016;113(43):E6630-E6638. doi:10.1073/pnas.1608820113

214. Sawcer S, Hellenthal G, Pirinen M, Spencer CCA, Patsopoulos NA, Moutsianas L, Dilthey A, Su Z, Freeman C, Hunt SE, Edkins S, Gray E, Booth DR, Potter SC, Goris A, Band G, Oturai AB, Strange A, Saarela J, Bellenguez C, Fontaine B, Gillman M, Hemmer B, Gwilliam R, Zipp F, Jayakumar A, Martin R, Leslie S, Hawkins S, Giannoulatou E, D'alfonso S, Blackburn H, Martinelli Boneschi F, Liddle J, Harbo HF, Perez ML, Spurkland A, Waller MJ, Mycko MP, Ricketts M, Comabella M, Hammond N, Kockum I, McCann OT, Ban M, Whittaker P, Kemppinen A, Weston P, Hawkins C, Widaa S, Zajicek J, Dronov S, Robertson N, Bumpstead SJ, Barcellos LF, Ravindrarajah R, Abraham R, Alfredsson L, Ardlie K, Aubin C, Baker A, Baker K, Baranzini SE, Bergamaschi L, Bergamaschi R, Bernstein A, Berthele A, Boggild M, Bradfield JP, Brassat D, Broadley SA, Buck D, Butzkueven H, Capra R, Carroll WM, Cavalla P, Celius EG, Cepok S, Chiavacci R, Clerget-Darpoux F, Clysters K, Comi G, Cossburn M, Cournu-Rebeix I, Cox MB, Cozen W, Cree BAC, Cross AH, Cusi D, Daly MJ, Davis E, Bakker PIW de, Debouverie M, D'hooghe MB, Dixon K, Dobosi R, Dubois B, Ellinghaus D, Elovaara I, Esposito F, Fontenille C, Foote S, Franke A, Galimberti D, Ghezzi A, Glessner J, Gomez R, Gout O, Graham C, Grant SFA, Guerini FR, Hakonarson H, Hall P, Hamsten A, Hartung H-P, Heard RN, Heath S, Hobart J, Hoshi M, Infante-Duarte C, Ingram G, Ingram W, Islam T, Jagodic M, Kabesch M, Kermode AG, Kilpatrick TJ, Kim C, Klopp N, Koivisto K, Larsson M, Lathrop M, Lechner-Scott JS, Leone MA, Leppä V, Liljedahl U, Bomfim IL, Lincoln RR, Link J, Liu J, Lorentzen AR, Lupoli S, Macciardi F, Mack T, Marriott M, Martinelli V, Mason D, McCauley JL, Mentch F, Mero I-L, Mihalova T, Montalban X, Mottershead J, Myhr K-M, Naldi P, Ollier W, Page A, Palotie A, Pelletier J, Piccio L, Pickersgill T, Piehl F, Pobywajlo S, Quach HL, Ramsay PP, Reunanen M, Reynolds R, Rioux JD, Rodegher M, Roesner S, Rubio JP, Rückert I-M, Salvetti M, Salvi E, Santaniello A, Schaefer CA, Schreiber S, Schulze C, Scott RJ, Sellebjerg F, Selmaj KW, Sexton D, Shen L, Simms-Acuna B, Skidmore S, Sleiman PMA, Smestad C, Sørensen PS, Søndergaard HB, Stankovich J, Strange RC, Sulonen A-M, Sundqvist E, Syvänen A-C, Taddeo F, Taylor B, Blackwell JM, Tienari P, Bramon E, Tourbah A, Brown MA, Tronczynska E, Casas JP, Tubridy N, Corvin A, Vickery J, Jankowski J, Villoslada P, Markus HS, Wang K, Mathew CG, Wason J, Palmer CNA, Wichmann H-E, Plomin R, Willoughby E, Rautanen A, Winkelmann J, Wittig M, Trembath RC, Yaouanq J, Viswanathan AC, Zhang H, Wood NW, Zuvich R, Deloukas P, Langford C, Duncanson A, Oksenberg JR, Pericak-Vance MA, Haines JL, Olsson T, Hillert J, Ivinson AJ, Jager PL de, Peltonen L, Stewart GJ, Hafler DA, Hauser SL, McVean G, Donnelly P, Compston A. Genetic risk and a primary role for cell-mediated immune mechanisms in multiple sclerosis. Nature. 2011;476(7359):214–9. doi:10.1038/nature10251

215. van Bleek GM, Nathenson SG. The structure of the antigen-binding groove of major histocompatibility complex class I molecules determines specific selection of self-peptides. Proc Natl Acad Sci U S A. 1991;88(24):11032–6.

216. Falk K, Rotzschke O, Stevanovic S, Jung G, Rammensee HG. Allele-specific motifs revealed by sequencing of self-peptides eluted from MHC molecules. Nature. 1991;351(6324):290–6. doi:10.1038/351290a0

217. Kaur A, Webster MR, Marchbank K, Behera R, Ndoye A, Kugel CH, Dang VM, Appleton J, O'Connell MP, Cheng P, Valiga AA, Morissette R, McDonnell NB, Ferrucci L, Kossenkov AV, Meeth K, Tang H-Y, Yin X, Wood WH, Lehrmann E, Becker KG, Flaherty KT, Frederick DT, Wargo JA, Cooper ZA, Tetzlaff MT, Hudgens C, Aird KM, Zhang R, Xu X, Liu Q, Bartlett E, Karakousis G, Eroglu Z, Lo RS, Chan M, Menzies AM, Long GV, Johnson DB, Sosman J, Schilling B, Schadendorf D, Speicher DW, Bosenberg M, Ribas A, Weeraratna AT. sFRP2 in the aged microenvironment drives melanoma metastasis and therapy resistance. Nature. 2016;532(7598):250–4. doi:10.1038/nature17392
218. Montes de Oca M, Kumar R, Rivera FdL, Amante FH, Sheel M, Faleiro RJ, Bunn PT, Best SE, Beattie L, Ng SS, Edwards CL, Boyle GM, Price RN, Anstey NM, Loughland JR, Burel J, Doolan DL, Haque A, McCarthy JS, Engwerda CR. Type I Interferons Regulate Immune Responses in Humans with Blood-Stage Plasmodium falciparum Infection. Cell Rep. 2016;17(2):399–412. doi:10.1016/j.celrep.2016.09.015
219. Prendergast JM, Galvao da Silva AP, Eavarone DA, Ghaderi D, Zhang M, Brady D, Wicks J, DeSander J, Behrens J, Rueda BR. Novel anti-Sialyl-Tn monoclonal antibodies and antibody-drug conjugates demonstrate tumor specificity and anti-tumor activity. MAbs. 2017;9(4):615–27. doi:10.1080/19420862.2017.1290752
220. De Felice M, Turco MC, Costanzo F, Corbo L, Ferrone S, Venuta S. Inhibition by anti-HLA class I mAb of IL-2 and IL-2 receptor synthesis in lymphocytes stimulated with PHA-P. Cell Immunol. 1990;126(2):420–7. doi:10.1016/0008-8749(90)90333-M
221. Fayen J, Huang J, Ferrone S, Tykocinski M. Negative signaling by anti-HLA class I antibodies is dependent upon two triggering events. Int Immunol. 1998;10(9):1347–58. doi:10.1093/intimm/10.9.1347
222. Wooden SL, Kalb SR, Cotter RJ, Soloski MJ. Cutting Edge: HLA-E Binds a Peptide Derived from the ATP-Binding Cassette Transporter Multidrug Resistance-Associated Protein 7 aSnd Inhibits NK Cell-Mediated Lysis. J Immunol. 2005;175(3):1383–7. doi:10.4049/jimmunol.175.3.1383
223. Kalka-Moll WM, Tzianabos AO, Bryant PW, Niemeyer M, Ploegh HL, Kasper DL. Zwitterionic Polysaccharides Stimulate T Cells by MHC Class II-Dependent Interactions. J Immunol. 2002;169(11):6149–53. doi:10.4049/jimmunol.169.11.6149
224. Wang R-F, Wang X, Atwood AC, Topalian SL, Rosenberg SA. Cloning Genes Encoding MHC Class II-Restricted Antigens: Mutated CDC27 as a Tumor Antigen. Science. 1999;284(5418):1351–4. doi:10.1126/science.284.5418.1351
225. Liu E, McDaniel K, Case S, Yu L, Gerhartz B, Ostermann N, Fankhauser G, Hungerford V, Zou C, Luyten M, Seidl KJ, Michels AW. Exploring T cell reactivity to gliadin in young children with newly diagnosed celiac disease. Autoimmune Dis. 2014;2014927190. doi:10.1155/2014/927190
226. Pathiraja V, Kuehlich JP, Campbell PD, Krishnamurthy B, Loudovaris T, Coates PTH, Brodnicki TC, O'Connell PJ, Kedzierska K, Rodda C, Bergman P, Hill E, Purcell AW, Dudek NL, Thomas HE, Kay TWH, Mannering SI. Proinsulin-

specific, HLA-DQ8, and HLA-DQ8-transdimer-restricted CD4+ T cells infiltrate islets in type 1 diabetes. Diabetes. 2015;64(1):172–82. doi:10.2337/db14-0858

227. Parra M, Herrera D, Calvo-Calle JM, Stern LJ, Parra-López CA, Butcher E, Franco M, Angel J. Circulating human rotavirus specific CD4 T cells identified with a class II tetramer express the intestinal homing receptors α4β7 and CCR9. Virology. 2014;452-453191–201. doi:10.1016/j.virol.2014.01.014
228. Ishikawa T, Zhu B-L, Maeda H. Effect of sodium azide on the metabolic activity of cultured fetal cells. Toxicol Ind Health. 2006;22(8):337–41. doi:10.1177/0748233706071737
229. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. Cell. 2006;124(4):783–801. doi:10.1016/j.cell.2006.02.015
230. Geppert TD, Wacholtz MC, Patel SS, Lightfoot E, Lipsky PE. Activation of human T cell clones and Jurkat cells by cross-linking class I MHC molecules. J Immunol [Internet]. 1989;142(11):3763–72. Available from: http://www.jimmunol.org/content/142/11/3763.full.pdf
231. Turco MC, Felice Md, Corbo L, Giarrusso PC, Yang SY, Ferrone S, Venuta S. Enhancing effect of anti-HLA class I monoclonal antibodies on T cell proliferation induced via CD2 molecule. J Immunol [Internet]. 1988;141(7):2275–81. Available from: http://www.jimmunol.org/content/141/7/2275.full.pdf
232. Pandya JM, Venalis P, Al-Khalili L, Shahadat Hossain M, Stache V, Lundberg IE, Malmström V, Fasth AER. CD4+ and CD8+ CD28(null) T Cells Are Cytotoxic to Autologous Muscle Cells in Patients With Polymyositis. Arthritis Rheumatol. 2016;68(8):2016–26. doi:10.1002/art.39650
233. Stern LJ, Wiley DC. Antigenic peptide binding by class I and class II histocompatibility proteins. Structure. 1994;2(4):245–51. doi:10.1016/S0969-2126(00)00026-5
234. Gautam AM, Lock CB, Smilek DE, Pearson CI, Steinman L, McDevitt HO. Minimum structural requirements for peptide presentation by major histocompatibility complex class II molecules: Implications in induction of autoimmunity. Proc Natl Acad Sci U S A. 1994;91(2):767–71.
235. Fairchild PJ, Wildgoose R, Atherton E, Webb S, Wraith DC. An autoantigenic T cell epitope forms unstable complexes with class II MHC: A novel route for escape from tolerance induction. Int Immunol. 1993;5(9):1151–8.
236. Bielekova B, Sung M-H, Kadom N, Simon R, McFarland H, Martin R. Expansion and Functional Relevance of High-Avidity Myelin-Specific CD4+ T Cells in Multiple Sclerosis. J Immunol. 2004;172(6):3893–904. doi:10.4049/jimmunol.172.6.3893
237. Liu GY, Fairchild PJ, Smith RM, Prowle JR, Kioussis D, Wraith DC. Low avidity recognition of self-antigen by T cells permits escape from central tolerance. Immunity. 1995;3(4):407–15.
238. Fugger L, Liang J, Gautam A, Rothbard JB, McDevitt HO. Quantitative analysis of peptides from myelin basic protein binding to the MHC class II protein, I-Au,

which confers susceptibility to experimental allergic encephalomyelitis. Mol Med. 1996;2(2):181–8.

239. Smilek DE, Wraith DC, Hodgkinson S, Dwivedy S, Steinman L, McDevitt HO. A single amino acid change in a myelin basic protein peptide confers the capacity to prevent rather than induce experimental autoimmune encephalomyelitis. Proc Natl Acad Sci U S A. 1991;88(21):9633–7.
240. Weissert R, Graaf KL de, Storch MK, Barth S, Linington C, Lassmann H, Olsson T. MHC Class II-Regulated Central Nervous System Autoaggression and T Cell Responses in Peripheral Lymphoid Tissues Are Dissociated in Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein-Induced Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. J Immunol. 2001;166(12):7588–99. doi:10.4049/jimmunol.166.12.7588
241. Zhang A, Yu H, He Y, Shen Y, Zhang Y, Liu J, Fu B, Lv D, Miao F, Zhang J. Developmental expression and localization of MHC class I molecules in the human central nervous system. Exp Brain Res. 2015;233(9):2733–43. doi:10.1007/s00221-015-4345-2
242. Huh GS, Boulanger LM, Du H, Riquelme PA, Brotz TM, Shatz CJ. Functional Requirement for Class I MHC in CNS Development and Plasticity. Science. 2000;290(5499):2155–9. doi:10.1126/science.290.5499.2155
243. Satoh J, Kim SU, Kastrukoff LF, Takei F. Expression and induction of intercellular adhesion molecules (ICAMs) and major histocompatibility complex (MHC) antigens on cultured murine oligodendrocytes and astrocytes. J Neurosci Res. 1991;29(1):1–12. doi:10.1002/jnr.490290102
244. Lindsley MD, Patick AK, Prayoonwiwat N, Rodriguez M. Coexpression of class I major histocompatibility antigen and viral RNA in central nervous system of mice infected with Theiler's virus: A model for multiple sclerosis. Mayo Clin Proc. 1992;67(9):829–38.
245. Sasaki A, Nakazato Y. The identity of cells expressing MHC class II antigens in normal and pathological human brain. Neuropathol Appl Neurobiol. 1992;18(1):13–26.
246. Yong VW, Yong FP, Ruijs TC, Antel JP, Kim SU. Expression and modulation of HLA-DR on cultured human adult astrocytes. J Neuropathol Exp Neurol. 1991;50(1):16–28.
247. Spencer JI, Bell JS, Deluca GC. Vascular pathology in multiple sclerosis: Reframing pathogenesis around the blood-brain barrier. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 2018;89(1):42–52. doi:10.1136/jnnp-2017-316011
248. Alvarez JI, Cayrol R, Prat A. Disruption of central nervous system barriers in multiple sclerosis. Biochim Biophys Acta. 2011;1812(2):252–64. doi:10.1016/j.bbadis.2010.06.017
249. Leech S, Kirk J, Plumb J, McQuaid S. Persistent endothelial abnormalities and blood–brain barrier leak in primary and secondary progressive multiple sclerosis. Neuropathol Appl Neurobiol. 2007;33(1):86–98. doi:10.1111/j.1365-2990.2006.00781.x

250. van Horssen J, Bö L, Dijkstra CD, Vries HE de. Extensive extracellular matrix depositions in active multiple sclerosis lesions. Neurobiol Dis. 2006;24(3):484–91. doi:10.1016/j.nbd.2006.08.005
251. Flügel A, Berkowicz T, Ritter T, Labeur M, Jenne DE, Li Z, Ellwart JW, Willem M, Lassmann H, Wekerle H. Migratory Activity and Functional Changes of Green Fluorescent Effector Cells before and during Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. Immunity. 2001;14(5):547–60. doi:10.1016/S1074-7613(01)00143-1
252. Louveau A, Smirnov I, Keyes TJ, Eccles JD, Rouhani SJ, Peske JD, Derecki NC, Castle D, Mandell JW, Lee KS, Harris TH, Kipnis J. Structural and functional features of central nervous system lymphatic vessels. Nature. 2015;523(7560):337–41. doi:10.1038/nature14432
253. Aspelund A, Antila S, Proulx ST, Karlsen TV, Karaman S, Detmar M, Wiig H, Alitalo K. A dural lymphatic vascular system that drains brain interstitial fluid and macromolecules. J Exp Med. 2015;212(7):991–9. doi:10.1084/jem.20142290
254. Sonderstrup G, Cope AP, Patel S, Congia M, Hain N, Hall FC, Parry SL, Fugger LH, Michie S, McDevitt HO. HLA class II transgenic mice: Models of the human CD4+ T-cell immune response. Immunol Rev. 1999;172(1):335–43. doi:10.1111/j.1600-065X.1999.tb01377.x
255. Pajot A, Pancré V, Fazilleau N, Michel M-L, Angyalosi G, Ojcius DM, Auriault C, Lemonnier FA, Lone Y-C. Comparison of HLA-DR1-restricted T cell response induced in HLA-DR1 transgenic mice deficient for murine MHC class II and HLA-DR1 transgenic mice expressing endogenous murine MHC class II molecules. Int Immunol. 2004;16(9):1275–82. doi:10.1093/intimm/dxh129
256. Geluk A, Taneja V, van Meijgaarden KE, Zanelli E, Abou-Zeid C, Thole JE, Vries RR de, David CS, Ottenhoff TH. Identification of HLA class II-restricted determinants of Mycobacterium tuberculosis-derived proteins by using HLA-transgenic, class II-deficient mice. Proc Natl Acad Sci U S A. 1998;95(18):10797–802.
257. Gonzalez S, Castanotto D, Li H, Olivares S, Jensen MC, Forman SJ, Rossi JJ, Cooper LJN. Amplification of RNAi--targeting HLA mRNAs. Mol Ther. 2005;11(5):811–8. doi:10.1016/j.ymthe.2004.12.023
258. Brück J, Pascolo S, Fuchs K, Kellerer C, Glocova I, Geisel J, Dengler K, Yazdi AS, Röcken M, Ghoreschi K. Cholesterol Modification of p40-Specific Small Interfering RNA Enables Therapeutic Targeting of Dendritic Cells. J Immunol. 2015;195(5):2216–23. doi:10.4049/jimmunol.1402989
259. Kalantari T, Karimi MH, Ciric B, Yan Y, Rostami A, Kamali-Sarvestani E. Tolerogenic dendritic cells produced by lentiviral-mediated CD40- and interleukin-23p19-specific shRNA can ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis by suppressing T helper type 17 cells. Clin Exp Immunol. 2014;176(2):180–9. doi:10.1111/cei.12266
260. Buduru S, Zimta A-A, Ciocan C, Braicu C, Dudea D, Irimie AI, Berindan-Neagoe I. RNA interference: New mechanistic and biochemical insights with application in oral cancer therapy. Int J Nanomedicine. 2018;133397–409. doi:10.2147/IJN.S167383

261. Unniyampurath U, Pilankatta R, Krishnan MN. RNA Interference in the Age of CRISPR: Will CRISPR Interfere with RNAi? Int J Mol Sci. 2016;17(3):291. doi:10.3390/ijms17030291
262. Salsman J, Dellaire G. Precision genome editing in the CRISPR era. Biochem Cell Biol. 2017;95(2):187–201. doi:10.1139/bcb-2016-0137
263. Knott GJ, Doudna JA. CRISPR-Cas guides the future of genetic engineering. Science. 2018;361(6405):866–9. doi:10.1126/science.aat5011
264. Abrahimi P, Chang WG, Kluger MS, Qyang Y, Tellides G, Saltzman WM, Pober JS. Efficient gene disruption in cultured primary human endothelial cells by CRISPR/Cas9. Circ Res. 2015;117(2):121–8. doi:10.1161/CIRCRESAHA.117.306290
265. Mohme M, Hotz C, Stevanovic S, Binder T, Lee J-H, Okoniewski M, Eiermann T, Sospedra M, Rammensee H-G, Martin R. HLA-DR15-derived self-peptides are involved in increased autologous T cell proliferation in multiple sclerosis. Brain. 2013;136(Pt 6):1783–98. doi:10.1093/brain/awt108
266. Sauer EL, Cloake NC, Greer JM. Taming the TCR: Antigen-specific immunotherapeutic agents for autoimmune diseases. Int Rev Immunol. 2015;34(6):460–85. doi:10.3109/08830185.2015.1027822
267. Katsara M, Minigo G, Plebanski M, Apostolopoulos V. The good, the bad and the ugly: How altered peptide ligands modulate immunity. Expert Opin Biol Ther. 2008;8(12):1873–84. doi:10.1517/14712590802494501
268. Candia M, Kratzer B, Pickl WF. On Peptides and Altered Peptide Ligands: From Origin, Mode of Action and Design to Clinical Application (Immunotherapy). Int Arch Allergy Immunol. 2016;170(4):211–33. doi:10.1159/000448756
269. Evavold B, Allen P. Separation of IL-4 production from Th cell proliferation by an altered T cell receptor ligand. Science. 1991;252(5010):1308–10. doi:10.1126/science.1833816
270. Sloan-Lancaster J, Evavold BD, Allen PM. Induction of T-cell anergy by altered T-cell-receptor ligand on live antigen-presenting cells. Nature. 1993;363(6425):156. doi:10.1038/363156a0
271. McCue D, Ryan KR, Wraith DC, Anderton SM. Activation thresholds determine susceptibility to peptide-induced tolerance in a heterogeneous myelin-reactive T cell repertoire. J Neuroimmunol. 2004;156(1-2):96–106. doi:10.1016/j.jneuroim.2004.07.010
272. Ruiz PJ, DeVoss JJ, Nguyen L-VT, Fontoura PP, Hirschberg DL, Mitchell DJ, Garcia KC, Steinman L. Immunomodulation of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis with Ordered Peptides Based on MHC-TCR Binding Motifs. J Immunol. 2001;167(5):2688–93. doi:10.4049/jimmunol.167.5.2688
273. Bielekova B, Goodwin B, Richert N, Cortese I, Kondo T, Afshar G, Gran B, Eaton J, Antel J, Frank JA, McFarland HF, Martin R. Encephalitogenic potential of the myelin basic protein peptide (amino acids 83–99) in multiple sclerosis: Results of a phase II clinical trial with an altered peptide ligand. Nat. Med. 2000;6(10):1167. doi:10.1038/80516

274. Bolin DR, Swain AL, Sarabu R, Berthel SJ, Gillespie P, Huby NJS, Makofske R, Orzechowski L, Perrotta A, Toth K, Cooper JP, Jiang N, Falcioni F, Campbell R, Cox D, Gaizband D, Belunis CJ, Vidovic D, Ito K, Crowther R, Kammlott U, Zhang X, Palermo R, Weber D, Guenot J, Nagy Z, Olson GL. Peptide and Peptide Mimetic Inhibitors of Antigen Presentation by HLA-DR Class II MHC Molecules. Design, Structure–Activity Relationships, and X-ray Crystal Structures. J. Med. Chem. 2000;43(11):2135–48. doi:10.1021/jm000034h

275. Graaf KL de, Barth S, Herrmann MM, Storch MK, Otto C, Olsson T, Melms A, Jung G, Wiesmuller K-H, Weissert R. MHC Class II Isotype- and Allele-Specific Attenuation of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. J Immunol. 2004;173(4):2792–802. doi:10.4049/jimmunol.173.4.2792

276. Neumann F, Sturm C, Hülsmeyer M, Dauth N, Guillaume P, Luescher IF, Pfreundschuh M, Held G. Fab antibodies capable of blocking T cells by competitive binding have the identical specificity but a higher affinity to the MHC-peptide-complex than the T cell receptor. Immunol Lett. 2009;125(2):86–92. doi:10.1016/j.imlet.2009.06.002

Danksagung

Zunächst möchte ich mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. med. Dr. Robert Weißert für die Vergabe der Arbeit und seine engagierte Betreuung bedanken. Bei Problemen war er jederzeit bereit mich zu unterstützen, sei es im Labor oder bei theoretischen Fragen. Durch seinen unermüdlichen Einsatz ist diese Arbeit überhaupt erst möglich geworden.

Bei Frau Dr. Luise Zwerger möchte ich mich nicht nur für die umfassende und kompetente Einarbeitung an meinem Arbeitsplatz im Labor bedanken, sie unterstützte mich auch im weiteren Verlauf der Arbeit durch praktische Tipps und in kritischen Diskussionen über unsere beiden Arbeiten. Daher bin ich auch besonders glücklich, dass wir nun erneut Arbeitskolleginnen – wenn auch in einem anderen Fachgebiet – geworden sind.

Allen Patientinnen, Patienten und Kontrollpersonen, die Proben zur Verfügung gestellt haben, danke ich für ihr Vertrauen, ihre Geduld und ihr Mitwirken bei dieser Studie.

Herrn Dr. Köstler, Frau Allmeier und Frau Lang, danke ich, dass ich den ELISpot Reader für meine Auswertungen nutzen durfte.

Meinen Eltern Dorothea und Andreas Bartschmid, meiner Schwester Theresa und meinem Mann Koloman danke ich nicht nur für das Korrekturlesen meiner Dissertation, sondern auch für die Unterstützung und den Rückhalt über meine gesamte Studienzeit.

Meinem Onkel Dr. Christian Vogel danke ich ebenfalls für das kritische Lesen der Arbeit sowie für die fachlichen Anregungen.

Zuletzt möchte ich mich ganz besonders bei meiner Oma Bonn bedanken, der diese Arbeit gewidmet ist. Sie hat mich mit ihrer Begeisterung für das Fach Medizin angesteckt und so meine Studienwahl zu einem großen Teil mitbegründet. In unzähligen Telefonaten haben wir auch immer wieder über meine Dissertation gesprochen und sie hat viele wertvolle Ideen hierzu beigetragen.

Lebenslauf

Name	Wagner
Vorname	Anna Franziska
Geburtsname	Bartschmid
Adresse	Dechbettener Straße 46 93049 Regensburg Telefon 0941/78036977 E-Mail: franziska-bartschmid@t-online.de
Geburtsdatum/-ort	29. Mai 1995 in Traunstein
Arbeit seit August 2020	Assistenzärztin, Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe, Klinik St. Hedwig Regensburg
Studium	
2013 – 2020	Studium der Humanmedizin an der Universität Regensburg
Mai 2019 – April 2020	Praktisches Jahr
Juni 2020	Approbation
Dissertation seit Juli 2016	Dissertation zum Thema: „Untersuchung der MHC-Präsentation von drei neuen Autoantigenen bei Patienten mit Multipler Sklerose“, Klinik und Poliklinik für Neurologie des Universitätsklinikums Regensburg, Arbeitsgruppe Professor Weißert (Klinische Neurobiologie mit Schwerpunkt Neuroimmunologie und Neuroinflammation)
Schulausbildung	
2001-2013	Grundschule Haslach und Chiemgau Gymnasium Traunstein, Abitur: 2013

Regensburg, den 01.03.2021

Anna Franziska Wagner

Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Regensburg, den 01.03.2021 Anna Franziska Wagner