

**Aus dem Forschungszentrum Borstel
Forschungsgruppe Experimentelle Pneumologie
Programmbereich Asthma und Allergie
Direktor: Prof. Dr. Heinz Fehrenbach**

**Charakterisierung von Interleukin-15/Interleukin-15R α
abhängigen Effekten während der Induktion der
Experimentellen Autoimmunen Enzephalomyelitis**

**Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck**

**Aus der Sektion Naturwissenschaften
vorgelegt von
Mylène Divivier
aus Homburg/Saar**

Lübeck 2015

- 1. **Berichtersteller/Berichterstellerin: Prof. Dr. H. Fehrenbach**
- 2. **Berichtersteller/Berichterstellerin: Prof. Dr. T. Laskay**

Tag der mündlichen Prüfung: 03.11.2016

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 03.11.2016

Inhaltsverzeichnis

Inhalt

1. Einleitung	1
1.1. Das Immunsystem	1
1.1.1. Angeborenes Immunsystem.....	2
1.1.2. Adaptives Immunsystem.....	3
1.2. Dendritische Zellen als antigenpräsentierende Zellen und Schnittstelle zwischen der angeborenen und adaptiven Immunantwort	3
1.2.1. Stimulation und Aktivierung von CD8 ⁺ - und CD4 ⁺ T-Zellen	5
1.3. Die Rolle des Zytokins IL-15 in der Modulation von Immunantwort	7
1.3.1. Regulation der Produktion von IL-15	8
1.3.2. IL-15R α	8
1.3.3. Organisation des IL-15 Rezeptorkomplexes	9
1.3.4. Trans-Präsentation von IL-15	6
1.3.5. Effekte von IL-15/IL-15R α auf die Zielzellen	8
1.3.6. IL-15/IL-15R α als Strukturen für innovative Therapieansätze	9
1.4. Autoimmunität als Beispiel einer fehlregulierten Immunantwort	10
1.5. Multiple Sklerose als organspezifische Autoimmunerkrankung des zentralen Nervensystems	11
1.6. Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis als Mausmodell der Multiplen Sklerose ...	12
1.6.1. Die Geschichte der Experimentellen Autoimmunen Enzephalomyelitis.....	12
1.6.2. Induktion der Experimentellen Autoimmunen Enzephalomyelitis	12
1.6.3. CD8 ⁺ T-Zellen bei der Immunpathologie der Autoimmunreaktion des zentralen Nervensystems und deren Funktion	13
1.6.4. Immunregulatorische Funktion der NK-Zellen während der Autoimmunreaktion des zentralen Nervensystems	13
1.7. Therapieansätze in der Multiplen Sklerose	14
1.8. Verwendetes IL-15 transgenes Tiermodell	15
1.9. Ziel dieser Arbeit	16
2. Material	17
2.1. Tiere	17
2.1.1. C57BL/6 J, IL-15 und IL-15R α defiziente Mäuse	17
2.1.2. CD11c-spezifische Expression von IL-15-Vorstellung der IL-15 modifizierten Stämme...	17
2.1.3. CD11c-spezifische Expression von IL-15 ohne Transpräsentation	18
2.1.4. T-Zell-Rezeptor-transgene Tiere (OTI).....	18
2.2. Verwendete Chemikalien und Reagenzien	19

2.3. Verwendete Detektionsreagenzien und monoklonale Antikörper für die Durchflusszytometrie.....	20
2.4. Angesetzte Puffer und Lösungen.....	21
2.4.1. Puffer für die Zellkultur	21
2.4.2. Puffer für die Zellisolation.....	22
2.4.3. Puffer für die Durchflusszytometrie.....	22
2.4.4. Puffer für die Genotypisierung	23
2.4.5. Puffer für ELISA.....	23
2.5. Verbrauchsmaterial.....	24
2.6. Geräte und Software	24
3. Methoden	26
3.1. Genotypisierung der IL-15 transgenen Mäuse	26
3.2. Elektrophorese.....	26
3.3. Bestimmung der IL-15 Expression in den genetisch modifizierten Stämmen.....	27
3.3.1. RNA Extraktion	27
3.3.2. Synthese der cDNA	27
3.3.3. Analyse der CD11c/ IL-15 Expression	27
3.3.4. Quantitative Real Time-Polymerase Kettenreaktion	28
3.4. Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis	28
3.4.1. Induktion der Experimentellen Autoimmunen Enzephalomyelitis	28
3.4.2. Beurteilung des Schweregrades der Krankheit.....	29
3.5. Techniken der Zellkultur.....	30
3.5.1. Ermittlung der Zellzahl.....	30
3.5.2. Lyse der Erythrozyten	30
3.5.3. Isolation der Zellen aus dem Blut	31
3.5.4. Generierung und Kultivierung von <i>Bone Marrow Dendritic Cells</i>	31
3.5.4.1. Isolation des Knochenmarks.....	31
3.5.4.2. Einfrieren von Knochenmark	31
3.5.4.3. Generierung von <i>Bone Marrow Dendritic Cells</i>	31
3.5.4.4. Ablösen der <i>Bone Marrow Dendritic Cells</i>	31
3.5.5. Isolation der Zellen aus der Milz.....	32
3.5.6. Isolation der Zellen aus der Milz zur Analyse der Dendritischen Zellen	32
3.5.7. Aufreinigung von CD8 ⁺ T-Zellen durch negative Selektion unter Verwendung des <i>Magnetic Activated Cell Sorting</i>	32
3.5.8. Isolation von Lymphozyten und Mikroglia aus dem Gehirn	33
3.6. Zellstimulation <i>in vitro</i>	34
3.6.1. Stimulation der <i>Bone Marrow Dendritic Cells</i>	34

3.6.2. Induktion der Proliferation von CD8 ⁺ Zellen.....	34
3.6.3. Stimulation von Lymphozyten.....	34
3.7. Färbung und Fixierung der Zellen für durchflusszytometrische Analysen.....	34
3.7.1. Prinzip der Durchflusszytometrie	34
3.7.2. Markierung der Zellen mit Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester	35
3.7.3. Kontrollen für die FACS-Färbung	35
3.7.4. CD16/32 (Fc-block)	36
3.7.5. Oberflächenfärbung.....	36
3.7.6. Lebend- / Tod-Färbung	36
3.7.6.1. Propidiumiodid (PI).....	36
3.7.6.2. Live/dead Färbung	36
3.7.7. Fixierung der Zellen und anschließende intrazelluläre Färbung	36
3.8. Messung der Zytokine in Zellkulturüberständen.....	37
3.9. Statistik	38
4. Ergebnisse	39
4.1. Vergleich der relativen Expression von CD11c und IL-15 in den genetisch modifizierten Tieren	39
4.2. Charakterisierung von <i>in vitro</i> kultivierten <i>Bone Marrow Dendritic Cells</i>	40
4.2.1. Charakterisierung des Einflusses von IL-15 auf <i>in vitro</i> kultivierte <i>Bone Marrow Dendritic Cells</i>	40
4.2.2. Charakterisierung der IL-15R α abhängigen Aktivierung von <i>Bone Marrow Dendritic Cells</i>	43
4.3. Effekt von IL-15 auf die antigenabhängige Stimulation von CD8 ⁺ T-Zellen.....	45
4.3.1. Einfluss von IL-15 auf die antigenabhängigen Effekte von <i>Bone Marrow Dendritic Cells</i> auf CD8 ⁺ T-Zellen.....	47
4.3.2. Einfluss der Abwesenheit von IL-15R α auf die antigenabhängigen Effekte von <i>Bone Marrow Dendritic Cells</i> auf CD8 ⁺ T-Zellen	48
4.3.3. Effekt von IL-15 auf die Viabilität von <i>in vitro</i> kultivierten CD8 ⁺ T-Zellen.....	50
4.3.4. Effekt von IL-15R α auf die Viabilität von <i>in vitro</i> kultivierten CD8 ⁺ T-Zellen	51
4.3.5. Effekt von IL-15 auf die Zytokinproduktion bei der antigenabhängigen Stimulation von CD8 ⁺ T-Zellen	52
4.3.6. Einfluss von IL-15R α auf die Produktion von Zytokinen während der antigenspezifischen Stimulation von CD8 ⁺ T-Zellen	53
4.4. Untersuchung der IL-15 abhängigen Effekte auf den Phänotyp der Dendritischen Zellen der Milz.....	54
4.4.1. Modulationen des Phänotyps der Dendritischen Zellen der Milz durch IL-15	56
4.4.2. IL-15R α -abhängige Effekte in der Modulation des Phänotyps der Dendritischen Zellen aus der Milz	58
4.5. Effekt von IL-15 und IL-15R α auf die Makrophagen in der Milz	60

4.6. Charakterisierung der IL-15-abhängigen Effekte auf die lymphoiden Zellen im Blut.....	61
4.6.1. IL-15 bedingte Änderungen der lymphoiden Zellen im Blut	62
4.6.2. IL-15R α abhängige Änderungen der lymphoiden Zellen im Blut.....	63
4.7. Effekte von IL-15/ IL-15R α auf die Zellen in der Milz.....	64
4.7.1. Einfluss von IL-15 auf die lymphoiden Zellen der Milz	65
4.7.2. Auswirkungen der Abwesenheit von IL-15R α auf die lymphoiden Zellen der Milz	67
4.8. Einfluss von IL-15/IL-15R α auf die residenten Lymphozyten im Gehirn.....	70
4.8.1. Auswirkungen der Rekonstitution von IL-15 auf die residenten Lymphozyten im Gehirn	71
4.8.2. Einfluss von IL-15R α auf die residenten Lymphozyten im Gehirn	73
4.8.3. Einfluss der Rekonstitution von IL-15/IL-15R α auf die Mikroglia.....	75
4.9. Untersuchung der IL-15/IL-15R α abhängigen Effekte in der Experimentellen Autoimmunen Enzephalomyelitis.....	77
4.9.1. Einfluss der Rekonstitution von IL-15 auf den Krankheitsverlauf der Experimentellen Autoimmunen Enzephalomyelitis	77
4.9.2. Änderung des Krankheitsverlaufes bedingt durch die Absenz von IL-15R α	78
4.9.3. IL-15 abhängige Überlebensrate der Tiere	79
4.9.4. Überleben der immunisierten Tiere in Abhängigkeit zu IL-15R α	80
4.9.5. Beeinflussung wichtiger klinischer Parameter durch IL-15/IL-15R α	81
4.10. Charakterisierung von Lymphozyten im Blut der Mäuse nach der Induktion der Experimentellen Autoimmunen Enzephalomyelitis.....	82
4.10.1. IL-15-bedingte Änderungen der lymphoiden Zellen im Blut immunisierter Tiere	82
4.10.2. Effekt von IL-15R α auf die Lymphozyten im Blut immunisierter Tiere	83
4.10.2. Krankheitsbedingte quantitative Änderungen der Lymphozyten im Blut	84
4.10.3. Durch die autoimmune Erkrankung hervorgerufene quantitative Änderungen der Blutlymphozyten in Abhängigkeit von IL-15	84
4.10.4. Durch die Immunisierung hervorgerufene Änderungen im Blut in Abhängigkeit von IL-15R α	85
4.10.5. Charakterisierung der Zusammensetzung der Lymphozytenpopulationen in der Milz immunisierter Mäuse.....	86
4.10.6. IL-15-bedingte Änderungen der lymphoiden Zellen in der Milz immunisierter Mäuse	86
4.10.7. Beeinflussung des IL-15 Effektes in der Milz durch die Immunisierung.....	89
4.10.8. IL-15R α bedingter Einfluss auf die Lymphozyten in der Milz immunisierter Mäuse	90
4.10.9. Durch die Immunisierung bedingte Änderungen des Einflusses von IL-15R α in der Milz	92
4.11. Einfluss von IL-15/IL-15R α auf die IFN- γ -Produktion der Lymphozyten in der Milz	93
4.11.1. IFN- γ Produktion in naiven Mäusen in Abhängigkeit von IL-15	94
4.11.2. Einfluss von IL-15R α auf die IFN- γ Produktion stimulierter Lymphozyten der Milz naiver Tiere.....	97

4.12. Einfluss von IL-15/IL-15R α auf die IFN- γ Produktion der Lymphozyten der Milz nach der EAE Induktion	98
4.12.1. Einfluss von IL-15 auf die IFN- γ Produktion von Milzlymphozyten nach der EAE Induktion.....	99
4.12.2. Auswirkungen der Absenz von IL-15R α auf die IFN- γ Produktion.....	101
4.13. Analyse der Lymphozyten und der Mikroglia im Gehirn von immunisierten Mäusen	104
4.13.1. Einfluss von IL-15 auf die residenten Lymphozyten im Gehirn nach der Immunisierung	105
4.13.2. Effekt von IL-15R α auf die residenten Lymphozyten im Gehirn nach der Immunisierung	107
4.13.3. Analyse der Mikroglia im Gehirn immunisierter Mäuse in Abhängigkeit von IL-15/IL-15R α	109
5. Diskussion	111
5.1. Unterschiedliche Produktion von IL-15 in den IL-15 transgenen Stämmen.....	111
5.2. Charakterisierung <i>in vitro</i> kultivierter Bone Marrow Dendritic Cells in Abhängigkeit zu IL-15/IL-15R α	112
5.3. Antigenabhängige Stimulation von CD8 $^+$ -Zellen unter Einfluss von IL-15/IL-15R α	113
5.4. Zytokinproduktion während der antigenabhängigen Stimulation von CD8 $^+$ T-Zellen und Effekt von IL-15/IL-15R α	114
5.5. IL-15/IL-15 R α beeinflussen den Phänotyp von Dendritischen Zellen und Makrophagen in der Milz nicht	114
5.6. Die Modulierbarkeit des Krankheitsverlaufs der Experimentellen Autoimmunen Enzephalomyelitis durch IL-15/IL-15R α	115
5.6.1. Die Rekonstitution von IL-15 ermöglicht keine Milderung des Krankheitsverlaufs.....	115
5.6.2. IL-15R α beeinflusst den Krankheitsverlauf der Experimentellen Autoimmunen Enzephalomyelitis.....	115
5.6.3 IL-15/IL-15R α abhängige Präsenz der CD8 $^+$ T-Lymphozyten und NK-Zellen im Blut naiver und immunisierter Tiere.....	116
5.6.4. Modulation der CD4 $^+$ T-Zellen, CD8 $^+$ T-Zellen sowie der NK-Zellen in der Milz durch IL-15/IL-15R α in naiven und immunisierten Tieren	117
5.7. IL-15/-IL-15R α abhängige Zytokinproduktion der CD8 $^+$ T-Lymphozyten und der NK Zellen in der Milz.....	118
5.8. T-Lymphozyten und NK-Zellen im Gehirn werden von IL-15/IL-15R α beeinflusst	119
5.9. Mikroglia entwickelt sich unabhängig von dem Zytokin IL-15 und seinem Rezeptor α	119
6. Literaturverzeichnis:	121
Abkürzungsverzeichnis	136
Abbildungsverzeichnis	138
Tabellenverzeichnis	140
Zusammenfassung.....	141

Eidesstattliche Erklärung	143
Veröffentlichungen	144
Danksagung	145

1. Einleitung

1.1. Das Immunsystem

Die Funktion des Immunsystems ist es den Organismus vor Infektionen, Pathogenen und schädlichen Substanzen zu schützen [1,2]. Um den Schutz des Organismus zu gewährleisten, muss das Immunsystem in der Lage sein, schnell zu reagieren und spezifisch gegen die Pathogene vorzugehen [1,2]. Zur Aktivierung des Immunsystems ist die immunologische Erkennung der Pathogene durch die Zellen und löslichen Faktoren des angeborenen Immunsystems notwendig [1,3,4]. Nach der Erkennung des Pathogens wird die Sekretion antimikrobieller Enzyme und Peptide aktiviert, was zur Minimierung oder sogar zur Beseitigung der Infektion führen kann. Zeitlich versetzt werden die Abwehrmechanismen des adaptiven Immunsystems eingeschaltet. Die Generierung der pathogenspezifischen Antikörper - der löslichen Faktoren der adaptiven Immunantwort - und pathogenspezifischen T-Zellen hat mit einer Vielzahl der zellulären Interaktionen zu tun und dauert länger. Überschüssige Immunreaktionen auf harmlose Stoffe und Substanzen werden als Allergien bezeichnet, eine Immunantwort auf körpereigene Antigene ist die Grundlage von Autoimmunerkrankungen [4-6]. Das Immunsystem ist in der Lage die Pathogene einer bereits vorhergegangenen Infektion zu erkennen, was eine schnellere und stärkere spezifische Immunantwort nach einer wiederholten Infektion ermöglicht [1]. Es erfolgt eine Unterteilung in das angeborene und das adaptive Immunsystem. Die wichtigsten Faktoren und verschiedenen Zellen des Immunsystems sind in der Abbildung 1 zusammengefasst.

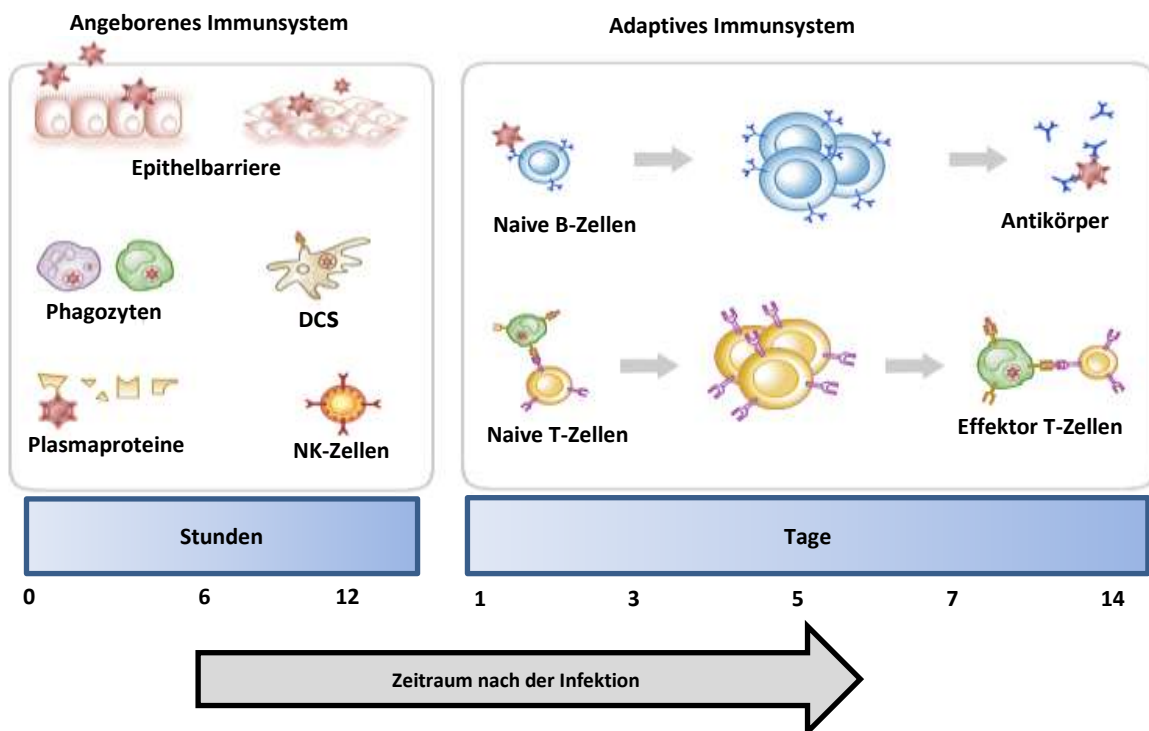


Abb. 1 Schematische Darstellung der Komponenten des angeborenen und adaptiven Immunsystems. [31]
 DCs: Dendritische Zellen, NK-Zellen: Natürliche Killer-Zellen

Die Zellen und die Mediatoren des angeborenen und adaptiven Immunsystems agieren gemeinsam und kooperieren miteinander, um die Integrität des Gesamtorganismus zu schützen. Fehlregulierte und inadäquate Reaktionen bilden die immunpathologische Grundlage unterschiedlicher Erkrankungen.

1.1.1. Angeborenes Immunsystem

Die angeborene Immunantwort ist von einer begrenzten Spezifität, schnell und ist neben höheren Organismen wie Wirbeltieren bereits bei Invertebraten und Pflanzen vorhanden [7]. Durch die Sekretion antimikrobieller Peptide und Enzyme werden die Membranen eingedrungener Mikroorganismen beschädigt oder zerstört. Gelangen Mikroorganismen in den Organismus, werden diese von *Pattern Recognition Receptors* (PRR) erkannt, welche auf und in *Antigen Presenting Cells* (APCs) (wie z.B. DCs und Makrophagen) und Epithelzellen lokalisiert sind. Diese PRRs sind in der Lage häufig vorkommende bakterielle Strukturen (*Pathogen Associated Molecular Patterns* = PAMPs) wie Lipopolysaccharide (LPS)[8,9], mannose- und fructosereiche Glykoproteine und -Lipide [10] sowie unter anderem Lipoteichonsäuren [10] zu erkennen [1]. Die Bindung des Liganden an die PRRs führt zur Phagozytose der Mikroorganismen durch die Makrophagen und neutrophilen Granulozyten. Dies kann mit Hilfe verschiedener Enzyme wie z.B. Myeloperoxidase, Elastase, Lysozym, bakterieller Peptide (Defensine) und verschiedener reaktive Sauerstoff-Spezies (unter anderem Wasserstoffperoxid, Stickoxid) erfolgen[11,12]. Des Weiteren hat die Bindung des Liganden die Sekretion von Zytokinen wie dem Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) und verschiedener Interleukine (IL-1, IL-6, IL-8, IL-12 und IL-15) durch die Makrophagen zur Folge. Die Sekretion von TNF- α bewirkt eine lokale Erweiterung der Gefäße, was zu einem erhöhten Blutfluss führt. Des Weiteren wirkt sich TNF- α positiv auf die Permeabilität der Endothelzellen aus, was wiederum zu einer lokalen Flüssigkeitsansammlung führt [13]. Der durch den erhöhten Blutfluss entstandene Plasmaeinstrom in den Infektionsort bewirkt die Ansammlung von Komplementproteinen [14] sowie diverser Akutphaseproteine (C-Reaktives Protein, Mannose bindendes Lektin u.a. [15-16]), welche an die Oberflächenstrukturen der Bakterien binden (Opsonisierung). Diese Opsonisierung ermöglicht Makrophagen und Granulozyten diese Zellen als körperfremd zu erkennen und diese zu beseitigen. Durch die Aktivierung der Komplementkaskade kommt es zudem zur Freisetzung niedermolekularer Moleküle (Anaphylatoxine), die gemeinsam mit TNF- α und IL-1 die lokalen Gefäßendothelzellen zur Expression von Adhäsionsmolekülen stimulieren [17,18], was den beschleunigten Austritt der Monozyten und neutrophilen Granulozyten von der Blutbahn in das Gewebe ermöglicht [19]. Neben den neutrophilen Granulozyten und den Makrophagen haben die Natürlichen Killer (NK)-Zellen eine entscheidende Rolle bei der Antwort des angeborenen Immunsystems [20]. Die Aktivierung der NK-Zellen kann neben Makrophagen auch über Zytokine wie z.B. IL-12 erfolgen und hat die Sekretion hoher Mengen von IFN- γ , welches als wichtiger Stimulator für Makrophagen agiert, zur Folge [20]. Die zügige Anreicherung der Phagozyten am Infektionsort sowie die zusätzliche positive Rückkopplung durch NK-Zellen ermöglichen bei den meisten Infektionen bereits die vollständige Beseitigung des Erregers. Allerdings kann das angeborene Immunsystem keinen übergreifenden, dauerhaften Schutz vor Infektionen bieten, da es keine Möglichkeit für antigenspezifische Interaktionen oder das Wiedererkennen vorhergehender Pathogene hat [22].

1.1.2. Adaptives Immunsystem

Das adaptive Immunsystem ist phylogenetisch jünger als das angeborene und ist nur bei Wirbeltieren zu finden. Die Entwicklung des adaptiven Immunsystems ermöglicht die spezifische, effiziente Beseitigung von Pathogenen und ermöglicht zudem das Wiedererkennen von Pathogenen bei einer wiederholten Infektion.

Die Durchführung der adaptiven Immunantwort erfolgt durch Lymphozyten, welche sich aus den lymphoiden Vorläuferzellen des Knochenmarks entwickeln. Lymphozyten lassen sich in die B-Lymphozyten, welche in dem Knochenmark gereift sind, und in die T-Lymphozyten, die in dem Thymus gereift sind, unterteilen [1]. Beide Subpopulationen verfügen über ein hochdiverses Repertoire an individuellen, klonalen Antigenrezeptoren. B-Zellen haben die Funktion, Antigene durch membrangebundene Antikörper - die B-Zell-Rezeptoren - zu erkennen, anschließend in Effektor-Plasmazellen zu differenzieren und antigenspezifische Antikörper zu sekretieren. Die Vermittlung der Effektor Funktionen der Antikörper erfolgt über deren Fc-Regionen. Wesentliche Effektor Funktionen dieser Antikörper sind die Aktivierung des Komplementsystems sowie die Aktivierung von Effektor Zellen (Granulozyten oder Makrophagen), welche spezifische Rezeptoren für die Fc-Regionen der Antikörper exprimieren. Langlebige Plasmazellen fungieren als Träger des Antikörpergedächtnisses. Die von den APCs exprimierte *Major Histocompatibility Molecules* (MHC) sind für die Präsentation von Antigenen zuständig. Diese präsentierten Antigene werden von T-Lymphozyten erkannt und haben deren Aktivierung zur Folge [24]. CD4⁺ T-Lymphozyten oder T-Helfer Zellen erkennen Peptide, die durch MHC-Klasse II-Moleküle präsentiert werden. CD8⁺ oder zytotoxischen T-Lymphozyten erkennen Peptide im Komplex mit MHC-Klasse I Molekülen [23]. Zur Aktivierung der T-Zellen werden neben der Erkennung der Antigene zusätzliche von dem APCs exprimierte kostimulatorische Signale und lösliche Faktoren - sogenannte Zytokine - benötigt [21].

1.2. Dendritische Zellen als antigenpräsentierende Zellen und Schnittstelle zwischen der angeborenen und adaptiven Immunantwort

Dendritische Zellen (DCs) wurden erstmals in der Mitte der 1970er Jahre von Ralph Steinmann als eine Subpopulation der Zellen in der Milz beschrieben. Die Besonderheit dieser Zellen war deren auffällig verzweigte Form mit vielen Ausläufern [25]. DCs sind eine seltene, migratorische Population von im Knochenmark gereiften Zellen, die für die Aufnahme, den Transport, die Prozessierung und die Präsentation von Antigenen gegenüber T-Zellen verantwortlich sind [26-28]. Aufgrund ihrer kurzen Lebensdauer müssen ständig neue Vorläuferzellen aus den hämatopoetischen Stammzellen des Knochenmarks gebildet werden [29]. Da aus isolierten lymphoiden und myeloiden Vorläuferzellen *in vitro* die unterschiedlichsten Populationen von reifen DCs im lymphatischen Gewebe gebildet werden können, geht man davon aus, dass die Art der Vorläuferzelle nicht für den Phänotyp der reifen DCs verantwortlich ist [30]. Aus den Vorläuferzellen gehen unreife DCs hervor, die neben einer hohen phagozytotischen Aktivität nur eine geringe Expression von MHC Klasse II Molekülen sowie der, für die Aktivierung der T-Zellen essentiellen, kostimulatorischen Moleküle CD40, CD80 und CD86 aufweisen. Stattdessen exprimieren diese unreifen DCs unter anderem *Scavenger*-Rezeptoren sowie *Toll like* Rezeptoren (TLRs), welche entscheidend für die Erkennung mikrobiologischer Strukturen sind. Hierbei unterscheiden sich die einzelnen Populationen der unreifen DCs in der Expression der TLRs (bis zu 10 unterschiedliche) wodurch, je nach Antigen, unterschiedliche Immunreaktionen aktiviert werden können [31,32].

Reife DCs exprimieren neben dem Integrin CD11c die kostimulatorischen Moleküle CD80, CD86, CD40 sowie MHC Klasse II Moleküle [32]. Die Differenzierung der reifen DCs erfolgt anhand ihrer Expression von CD4, CD8, CD11b sowie CD205 [33]. Die Einteilung der hieraus entstandenen 5 Populationen der reifen DCs ist in Tabelle 1 dargestellt.

Anteil der Gesamt DCs in (%)	„Lymphoide“ DCs CD4 ⁻ CD8 ^{hi} CD205 ^{hi} CD11b ⁻	„Myeloide“ DCs CD4 ⁺ CD8 ⁻ CD205 ⁻ CD11b ⁺	„Myeloide“ DCs CD4 ⁻ CD8 ⁻ CD205 ⁻ CD11b ⁺	„Myeloide“ DCs CD4 ⁻ CD8 ⁻ CD205 ⁺ CD11b ⁺	„Langerhans“ DCs CD4 ⁻ CD8 ^{lo} CD205 ^{hi} CD11b ⁺
Milz	23	56	19	< 4	< 1
Thymus	70	-	-	-	-
Mesenteriale Lymphknoten	19	4	37	26	< 4
Hautassoziierte Lymphknoten	17	4	17	20	33

Tab. 1: Populationen der DCs im lymphatischen Gewebe [33]

Die Populationen der CD4⁻CD8^{hi}CD205^{hi}CD11b⁻ DCs, der CD4⁺CD8⁻CD205⁻CD11b⁺ DCs sowie der CD4⁻CD8⁻CD205⁻CD11b⁺ DCs sind in der Lage direkt über den Blutkreislauf in die Milz zu wandern [34-36]. Die CD4⁻CD8⁻CD205⁺CD11b⁺ DCs und die CD4⁻CD8^{lo}CD205^{hi}CD11b⁺ DCs können ausschließlich über afferente Lymphgefäße in die sekundären Lymphknoten migrieren. CD4⁻CD8^{lo}CD205^{hi}CD11b⁺ DCs exprimieren die für Langerhans-Zellen charakteristischen Antigene Langerin und E-Cadherin, weshalb man diese Population zu den Langerhans Zellen (LCs) zuordnet [37]. LCs zeigen eine starke Ähnlichkeit zu den aktivierten DCs [33] und kommen ausschließlich in der Haut vor [33].

Lange Zeit wurde davon ausgegangen, dass die Expression des Integrin CD11c spezifisch für DCs ist, wodurch sie von Makrophagen und anderen Zellen unterschieden werden konnten [38]. Tatsächlich wird CD11c unter anderem auch von intraepithelialen Lymphozyten im Darm [39], aktivierten CD8⁺ T-Zellen [39], inflammatorischen Monozyten [40], NK-Zellen, einigen Makrophagenpopulationen [41] und Alveolarmakrophagen [42] gebildet. CD11c selbst hat keinen direkten Effekt auf die Aktivierung der T-Zellen [43]. Trotzdem konnte unter Verwendung verschiedener Mausmodelle, welche die Präsenz von CD11c⁺ Zellen beeinflussen, das Wissen über die Biologie der DCs enorm erweitert werden [44]. Ein Beispiel für solch ein Modell ist das CD11c.DTR-Mausmodell. Die transgenen Tiere exprimieren einen *diphtheria toxin receptor* (DTR) unter der Kontrolle eines CD11c-Promotors, welcher sowohl in pDCs als auch in den cDCs aktiv ist. Wird den transgenen Tieren Diphtherie Toxin injiziert, führt dies zur Depletion von pDCs und cDCs [44].

Da DCs hauptsächlich in den peripheren Geweben und den lymphoiden Organen lokalisiert sind, ist es schwierig eine ausreichende Menge für zellbiologische Stimulationsexperimente zu erhalten. Die Ausbeute der DCs kann durch die *in vitro* Kultivierung von DC-Vorläuferzellen unter Zusatz definierter Zytokine quantitativ erhöht werden. Aus dem Knochenmark isolierte Zellen lassen sich unter Zugabe von GM-CSF zu einer homogenen Population von DCs generieren, welche durch die Zugabe von LPS aktiviert werden können [126].

1.2.1. Stimulation und Aktivierung von CD8⁺ - und CD4⁺ T-Zellen

DCs spielen eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Toleranz, Gedächtnis sowie der Differenzierung von Th1 und Th2-Zellen [45]. DCs sind in der Lage die prozessierten Antigene gebunden an MHC Klasse I (endogene Antigene) oder MHC Klasse II (exogene Antigene) Moleküle den T-Zellen zu präsentieren und diese somit zu aktivieren. Diese Interaktion ist in Abbildung 2 schematisch für die Aktivierung der T-Zellen dargestellt.

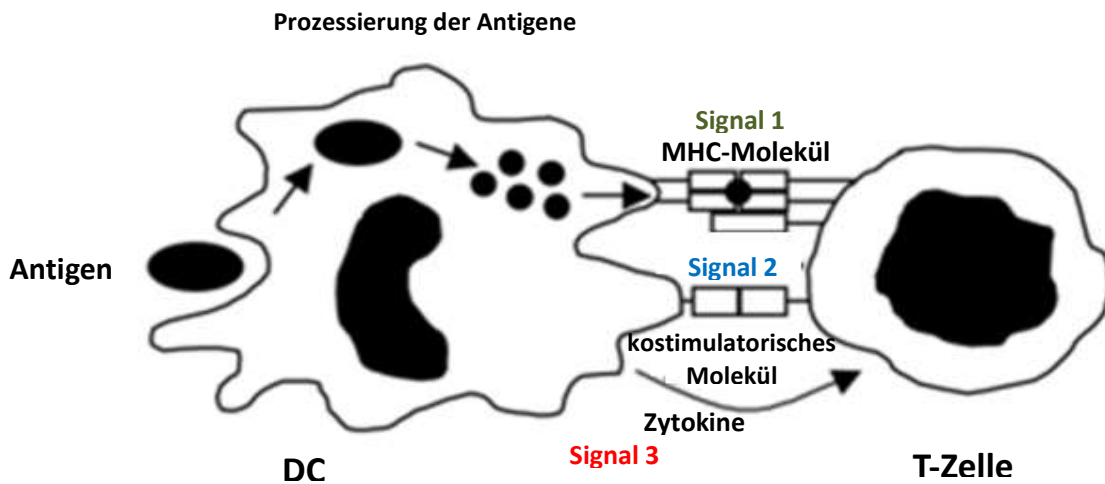


Abb. 2: Aktivierung der CD8⁺ T-Zellen durch DCs (modifiziert nach *knowledge for life.com*)

Die T-Zellen erkennen das von den MHC Molekülen präsentierte Peptid des Antigens durch die Bindung an den TCR (Signal 1). Um die Differenzierung der T-Zellen in Effektor-Zellen zu ermöglichen, ist neben dem MHC Molekül eine zusätzliche Stimulation durch kostimulatorische Moleküle, welche von den DCs exprimiert werden, notwendig (Signal 2). Sind diese kostimulatorischen Moleküle nicht vorhanden, sterben die T-Zellen durch Apoptose. Die zusätzliche Sekretion von Zytokinen (unter anderem IL-15) durch die DCs ist entscheidend für die Aktivierung und Differenzierung von CD8⁺ T-Zellen (Signal 3) [46]. In Tabelle 2 sind Beispiele für von DCs exprimierte, kostimulatorische Moleküle und ihren Bindungspartnern auf den CD8⁺ T-Zellen aufgeführt.

kostimulatorisches Molekül der DCs	Bindungspartner der CD8 ⁺ T-Zellen	Funktion	Referenz
CD40L	CD40	-induziert die Antwort der Gedächtnis T-Zellen - aktiviert hauptsächlich CD8 ⁺ T-Zellen	Huster et al (2003) [236] Ahlers et al. (2002) [237] Lui et al. (2008) [238] Ahonen et al. (2004) [239] Sanchez et al (2007) [240]
CD70	CD27	-generiert eine Th1 Antwort -ist für die Bildung von Effektor-Gedächtnis Zellen verantwortlich	Xiao et al (2008) [241] Keller et al (2007) [242]
CD30L	CD30	-entscheidet über die Entwicklung einer Th1 oder Th2 Antwort	Barclay et al. (1997) [243]
4-1BBL	4-1BB	-wichtig für die Kostimulation von B-Zellen	Schwarz et al. (1994) [244]
OX-40L (CD252)	OX-40	-wichtiges Signal für die >Proliferation und das Überleben der Zellen	Klinger et al. (2009) [245]
CD80, CD86	CD28 Familie (CD28, CTLA-4, ICOS, PD-1)	-veranlassen die Produktion von Zytokinen - wichtig für die Aktivierung und das Überleben der T-Zellen -wichtige koinhibitorische Rezeptoren der Aktivierung der TCRs und der Rezeptorfunktion -die Blockierung von BTLA-4 verbessert die Entwicklung der CD8 ⁺ t Gedächtnis Zellen	Jones et al. (2008) [246] Krieg et al. (2007) [247]

Tab. 2.: Beispiele für von DCs exprimierte kostimulatorische Moleküle. Vertreter der von den DCs exprimierten kostimulatorischen Moleküle sowie ihre Bindungspartner seitens der CD8⁺ T-Zellen und deren Effekt auf die CD8⁺ T-Zellen.

Um endogene Peptidantigene zytotoxischen CD8⁺ T-Zellen über den MHC Klasse I Weg zu präsentieren, wird das Antigen über Phagozytose und rezeptorvermittelte Endozytose von den APCs aufgenommen. Die zytoplasmatischen Proteine werden in den Proteosomen mit Hilfe von unter anderem Calnexin, Calreticulin und zytosolischen Hitzeschockproteinen, die als Chaperone agieren, in Fragmente mit einer Länge von 4-25 Aminosäuren abgebaut und in das Endoplasmatische Retikulum (ER) transportiert [47]. In dem ER befinden sich neu synthetisierte MHC Klasse I α -Ketten, welche mit β 2-Mikroglobulin komplexieren und die durch den Abbau entstandenen Peptidantigene binden. Der entstandene MHC Klasse I Peptid-Komplex wird über exozytische Vesikel an die Plasmamembran der DCs transportiert und an der Zelloberfläche von den DCs sekretiert [48,49]. MHC Klasse I Moleküle präsentieren nicht nur Peptide von endogen synthetisierten Proteinen, sondern auch von Antigenen, die die über Makropinozytose in das Innere der Zelle gelangt sind. Dieser Mechanismus wird als „Cross-Präsentation“ bezeichnet [50]. Cross präsentiert werden können lösliche und nicht lösliche Proteine, inaktivierte Viren, virenähnliche Partikel, Bakterien und verschiedene Antigene aus apoptotischen oder nekrotischen Zellen [226,227]. Die Cross-Präsentation ist bei verschiedenen endozytotisch aktiven Zelltypen möglich. Zu diesen gehören unter anderem: Makrophagen, B-Zellen sowie nicht professionelle APCs [226], wobei DCs *in vivo* die effizientesten Partner für die Cross-Präsentation von zytotoxischen CD8⁺ Lymphozyten sind [51]. Es existieren zwei unterschiedliche Mechanismen der Cross-Präsentation, welche entweder den cytoplasmatische proteolytischen Weg, bei dem das Peptid an die neu synthetisierten MHC Klasse I Moleküle bindet, oder das endosomale System, bei dem das Peptid an die recycelten MHC Klasse I Moleküle bindet, beeinflusst [50].

Um exogene Antigene den CD4⁺ T-Zellen über MHC Klasse II Moleküle präsentieren zu können gelangen die exogenen Antigene in die endosomalen Kompartimente der DCs, wo sie von Proteasen abgebaut werden. Die entstandenen Peptidfragmente wandern weiter in endosomale Kompartimente, welche große Mengen an MHC Klasse II Molekülen beinhalten und binden an diese [52]. Die Synthese der MHC Klasse II- α und - β -Peptidketten findet im ER statt und wird über den Golgi Apparat in die MHC Klasse II reichen endosomalen Kompartimente transportiert [52]. Die mit dem Antigenpeptid gebundenen MHC Klasse II Moleküle werden in exozytischen Vakuolen an die Zelloberfläche der DCs transportiert, wo sie das Antigenpeptid für CD4⁺ T-Zellen präsentieren. Wird das Antigen von einer CD4⁺ T-Zelle gebunden gelangen die MHC Klasse II Moleküle über Endozytose wieder zurück in die MHC Klasse II reichen endosomalen Kompartimente, wo sie neue Antigenpeptide binden können [53].

Wie bereits erwähnt, haben neben der Präsentation von Peptidantigenen kostimulatorische Moleküle ebenfalls eine entscheidende Funktion, um eine produktive Immunantwort durch T-Zellen zu erhalten. Die als erstes charakterisierten und wichtigsten Vertreter der kostimulatorischen Moleküle sind CD28 bei den naiven T-Zellen und die entsprechenden Liganden CD80 und CD86, welche auf reifen APCs verstärkt exprimiert werden [54,55]. CD80 und CD86 Moleküle sind Mitglieder der B7 Familie, die Teil der Immunglobulin- Superfamilie der Proteine ist. CTLA-4 ist homolog zu CD28 und wird in aktivierten T-Zellen verstärkt exprimiert. Zudem zeigt CTLA-4 eine größere Affinität zu CD80 und CD86 als CD28 [56]. Ein drittes Mitglied der B7-Familie ist B7RP-1, welches hauptsächlich auf B-Zellen exprimiert wird, jedoch auch auf Makrophagen, DCs oder nicht lymphoidem Gewebe vorkommen kann [57-58]. B7RP-1 ist der Ligand für das *inducible immune costimulator* (ICOS) Protein [59], welches strukturell mit CD28 verwandt ist und ebenso wie CTLA-4 auf aktivierten T-Zellen überexprimiert wird [60]. ICOS-KO Mäuse weisen enorme Defizite in der Bildung von T-Zell abhängigen Th-Zellantworten auf [61]. Ein weiteres Mitglied der B7 Familie ist PD-L1, welches auf DCs exprimiert wird und an den *programmed cell death 1* (PDC-1)-Rezeptor von T-Zellen bindet [62]. Diese Bindung hemmt die Proliferation sowie die Bildung von Zytokinen durch T-Zellen [62].

1.3. Die Rolle des Zytokins IL-15 in der Modulation von Immunantwort

IL-15 ist ein pleiotropes Zytokin, welches die Zellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems beeinflussen kann [1,63-65]. Es wurde 1994 anhand seiner Fähigkeit zur Stimulation der Proliferation von T-Zellen entdeckt [2,3,65,66]. Die ursprünglich beschriebene humane IL-15 cDNA besteht aus einer 5'-UTR mit 316 bp, einem 486 bp langen *open reading frame* und einer 3'-UTR, welche aus 400 bp besteht und für eine Vorläufer-Form von IL-15, welche aus einem 48 Aminosäuren (AA) langem *Leader Peptide* und einem 114 AA langem reifen Protein besteht, kodiert [67]. Das 14-15 Kilodalton (kd) Protein wird von den Exons 5-8 auf dem IL-15-Gen, welches auf Chromosom 8 lokalisiert ist, codiert [68,69]. IL-15 beinhaltet 2 Disulfidbindungen (Position C42-C88 und C35-C85), welche evolutionär gesehen ursprünglich homolog zu denen von IL-2 sind. Das IL-15 Protein besitzt zudem an seinem C-Terminus 2 N-Glycosylierungsstellen (N79 und N 112) [70].

1.3.1. Regulation der Produktion von IL-15

Die Regulation der Transkription, Translation und Sekretion von IL-15 erfolgt durch unterschiedliche komplexe Mechanismen auf unterschiedlichen Ebenen. So beinhaltet der IL-15 Promotor Konsensus-Bindestellen für die Transkriptionsfaktoren NF- κ B, myb (myeloblastose Onkogen) und GCF (GC-Faktor), Interferone und IL-6 [4,71]. Die 5'-UTR Region des IL-15 besitzt 12 Translationsinitiationsstellen (AUG) [5,72]. Im Gegensatz zu IL-2 existieren für das IL-15-Transkript 2 unterschiedliche Isoformen. [5,6,73,74]. Eine Isoform codiert für das 48-Aminosäuren *long signal peptide* (IL-15-LSP). Dieses kann nicht effizient sekretiert werden [66,75,76], Die andere codiert für das 21 Aminosäuren *short signal peptide* (IL-15-SSP), das nicht direkt sekretiert wird. Nur der SSP-Isotyp kann in den Zellkern gelangen [76,77]. Zusätzliche negative Regulation der Translation findet durch einen C-terminalen Bereich statt [5,72]. Diese Kontrollmechanismen limitieren sowohl die Translation als auch die Sekretion von IL-15 und können die Produktion von IL-15 auf ein 250 zigstel reduziert [1,65]. Obwohl die mRNA von IL-15 von vielen unterschiedlichen Zellen in unterschiedlichen Geweben exprimiert wird, kann das Protein lediglich in Monozyten, DCs, Epithelzellen und Fibroblasten detektiert werden [1,65]. Eine sehr wichtige Rolle bei der Regulation der IL-15 Sekretion spielt IL-15R α . Da sowohl IL-15 als auch IL-15R α im ER komplexieren und gemeinsam sekretiert werden, kann es sein, dass die Expression von IL-15 durch die Expression von IL-15R α beeinflusst wird [7,78]. Der Mechanismus, dass das Zytokin und der Rezeptor gemeinsam sekretiert werden, ist einzigartig für das Zytokin IL-15. Dadurch kann IL-15 anderen Zellen, welche den Rezeptor IL2R β / γ c exprimieren, transpräsentiert (Erläuterung in 1.3.4.) werden [8,9,79,80]. Ob IL-15 ohne IL-15R α als membranständiges Zytokin vorkommt wird weiterhin diskutiert [81]. Durch die unterschiedlichen Formen und die Assoziation von IL-15 mit IL-15R α kann das Zytokin sehr unterschiedliche Wirkungsmechanismen zeigen. So kann die Signalübermittlung von IL-15 über den juxtakrinen [13], den autokrinen [10-12] und den parakrinen [7] Weg stattfinden. Bei der juxtakrinen Signalübertragung ist IL-15 an der Zellmembran an IL-15R α gebunden und aktiviert die Effektor Zelle durch die Bindung an IL2R β / γ c [85]. Bei der autokrinen Signalübertragung beeinflusst das von den Zellen sekretierte IL-15 die Zellen selbst und hat somit einen intrinsischen Effekt [82-84]. Die Aktivierung durch die Bindung von freiem IL-15 an den IL2R β / γ c der Effektor Zelle wird als parakrine Signalweiterleitung bezeichnet [78]. Da IL-15 und IL-15R α weit verbreitet sind hat das Ungleichgewicht der Expression dieser Proteine eine entzündliche Immunantwort zur Folge [14 ,86].

1.3.2. IL-15R α

IL-15R α ist ein ubiquitär exprimiertes Protein [87,88], das in unterschiedlichen Isoformen vorliegen kann. Durch alternatives *splicen* verschiedener Exone des gesamten Proteins entstehen unterschiedliche Isoformen, deren genaue Expression bis heute nicht vollständig verstanden ist [89]. Isotypen, denen die so genannte Sushi-Domäne von IL-15R α fehlt, können das Zytokin IL-15 nicht mehr binden und sind deshalb wahrscheinlich nicht in der Lage, Zellen, die für IL-15 empfänglich sind, zu stimulieren [90-92]. Neben den gebundenen Isoformen existieren auch lösliche Isoformen von IL-15R α , welche ausschließlich aus dem *Leader Peptid* und der Sushi-Domäne bestehen und sowohl als Agonisten als auch als Antagonisten fungieren können [93]. In wie fern die Expression von IL-15R α und seiner Isoformen mit den durch IL-15 vermittelten Antworten zusammenhängt, ist noch nicht bekannt [89].

1.3.3. Organisation des IL-15 Rezeptorkomplexes

IL-2 und IL-15 bilden zusammen mit IL-4, IL-7, IL-9 und IL-21 [94,95] und weiteren Wachstumsfaktoren die 4 α -helix Familie der Typ I Zytokine. Hierbei binden IL-2, IL-4, IL-7, IL-9 IL-15 und IL-21 an den gemeinsamen IL-2R γ c. IL-2 und IL-15 teilen sich zusätzlich die IL-2R β Untereinheit, unterscheiden sich jedoch in ihren spezifischen Rezeptoren IL-2R α und IL-15R α [96]. Die Rezeptorkomponenten von IL-15 und IL-2 sind in Abbildung 3 schematisch dargestellt.

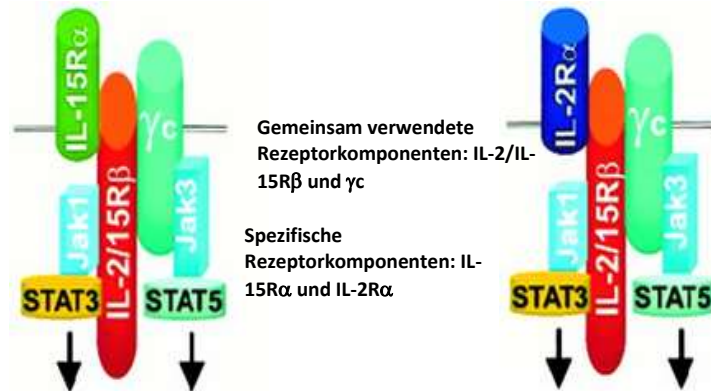


Abb. 3: Schematische Darstellung des Aufbaus der Rezeptorkomponenten von IL-15 und IL-2 (modifiziert nach [97])

Das Muster der Expression sowie die starke Affinität von IL-15 und IL-15R α sind dafür verantwortlich, dass die Aktivität von IL-15 im Organismus weiter verbreitet ist als die von IL-2. Da IL-2 und IL-15 Signalrezeptorkomponenten teilen (IL-2/IL-15R β γ c) ist davon auszugehen, dass die Interaktion von IL-15 mit seinem Rezeptorkomplex in verschiedenen Zelltypen Signale auslöst, die ähnlich, wenn nicht sogar identisch zu denen sind, die von dem IL-2 Komplex ausgelöst werden [98]. Dies beinhaltet unter anderem die Aktivierung des Janus Kinase (JAK)/ *signal transducer an activator of transcription* (STAT)-Weges [99], welcher eine wichtige Rolle bei der Aktivierung, Differenzierung und homöostatischen Kontrolle der T- und NK-Zellen spielt [100-103]. Die durch Phosphorylierung aktivierten STAT Proteine wandern durch das Zytosol zum Kern, wo sie unter anderem die Transkription von antiapoptotischen- sowie Proto- Onkogenen der Effektorzelle fördern. [104,119]. Hierbei ist IL-2/15R β mit JAK1 und die γ δ -Kette mit JAK3 verbunden, was dazu führt, dass STAT3 und STAT5, sofern diese an IL-15 gebunden sind, phosphoryliert werden [105,106].

1.3.4. Trans-Präsentation von IL-15

Die Aktivierung von Effektorzellen ist bei IL-15 sowohl über die Cis- als auch über die Trans-Präsentation möglich (Abb.4).

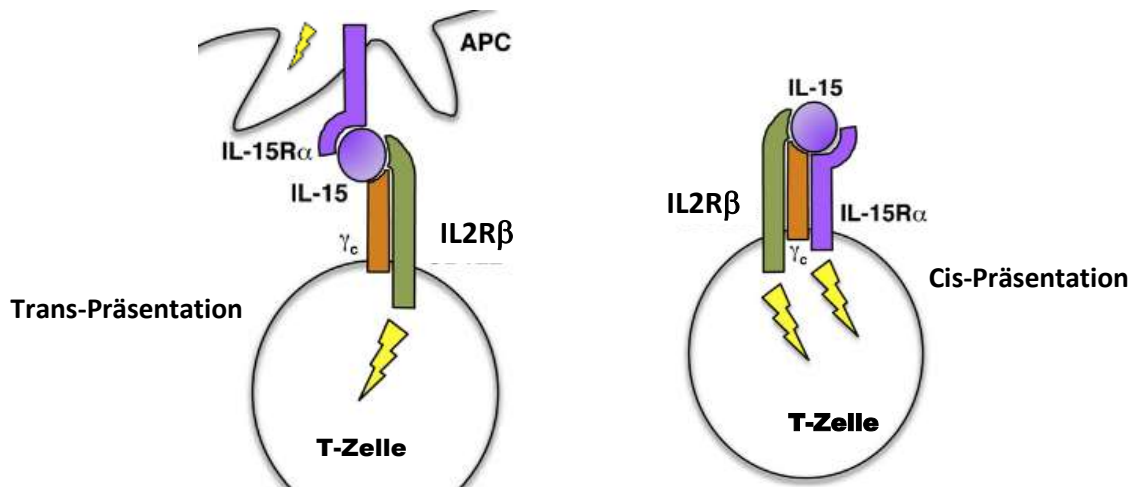


Abb. 4: Schematische Darstellung der Trans- und Cis-Präsentation von IL-15. Die Trans-Präsentation von an IL-15R α gebundenem IL-15 führt zu der Aktivierung von Effektor Zellen. Bei der Cis-Präsentation wird freies IL-15 an einen auf der T-Zellen exprimierten IL-15R α IL-15R β γ_c Komplex gebunden und aktiviert so die Zellen.

Bei der Cis-Präsentation bindet, wahrscheinlich durch Monozyten produziertes, freies IL-15 mit einem auf der Zelloberfläche vorhandenen IL-15R α , welcher an einen IL-15R β γ_c Rezeptor der eigenen Zelle bindet und diese somit aktiviert. Des Weiteren besteht die Möglichkeit, dass freies IL-15 und IL-15R α erst außerhalb der Zelle komplexieren und anschließend durch die Bindung an den IL-15R β γ_c -Rezeptor einer Zelle für deren Aktivierung verantwortlich sind [107]. Im Gegensatz zu der Aktivierung durch den Liganden IL-2, bei dem die Aktivierung der Effektor Zellen hauptsächlich durch Cis-Präsentation erfolgt, findet die Aktivierung der Effektor Zellen mit den Liganden IL-15 hauptsächlich über Trans-Präsentation statt [108]. Hierbei bindet der IL-15/IL-15R α -Komplex an die Zielzelle, welche den IL-2/IL-15R β γ_c exprimiert [108]. Die Signalweiterleitung durch Cis-Präsentation oder durch freies IL-15/IL-15R α findet nur in geringem Maße statt [109-111]. Die Trans-Präsentation von IL-15/IL-15R α stellt einen einzigartigen Mechanismus dar, bei dem das Zytokin ausschließlich an seiner stark affinen IL-15R α gebunden an die Zelloberfläche exprimiert werden kann [112-115]. Die Bildung sowie die Trans-Präsentation von IL-15/IL-15R α sind in Abbildung 5 schematisch dargestellt.

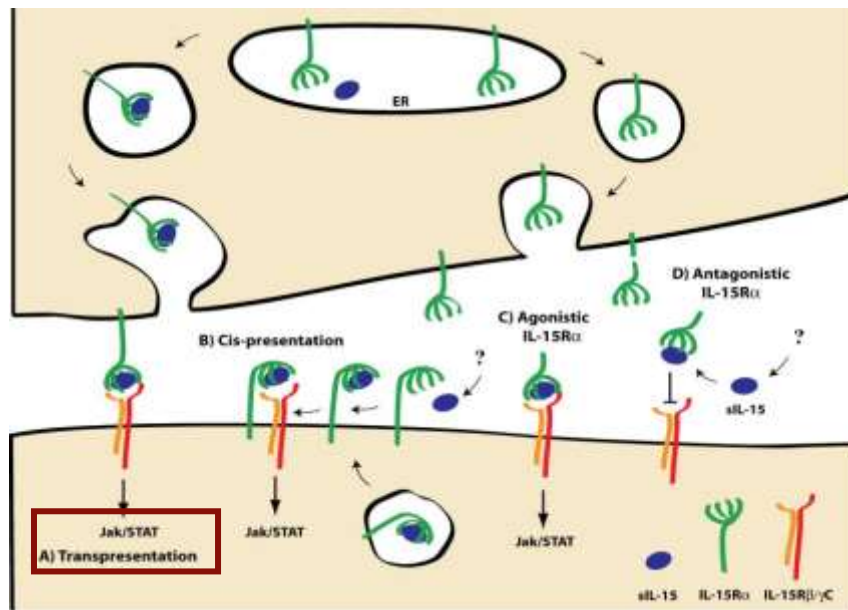


Abb. 5: Wirkungsmechanismen von IL-15/ IL-15R α . [nach 116]

IL-15 und IL-15R α werden unabhängig voneinander von dem Zytosol in das ER der Zelle transportiert. Bereits hier bindet IL-15 an seinen hoch affinen IL-15R α und wird über den Golgi Apparat zur Zellmembran transportiert wo der Komplex an der Zelloberfläche präsentiert wird. Es besteht auch die Möglichkeit, dass IL-15R α , ohne dass er IL-15 gebunden hat, das Endoplasmatische Retikulum verlässt und ebenfalls über den Golgi Apparat an die Zelloberfläche transportiert und hier sekretiert wird. Hier ist IL-15R α in der Lage mit freiem IL-15 zu komplexieren. Da das freie IL-15 stark limitiert ist und die Bindeaffinität zwischen IL-15 und IL-15R α sehr stark ist, geht man davon aus, dass die Komplexierung von IL-15R α und IL-15 in den meisten Fällen schon im ER stattfindet und dieser Weg der Aktivierung nur eine untergeordnete Rolle spielt. Im Gegensatz zu IL-15R α ist freies IL-15 nicht in der Lage das ER in einem aktiven Zustand zu verlassen, sondern wird von der Zelle abgebaut. Die genauen Mechanismen hierfür sind noch nicht bekannt. Es ist davon auszugehen, dass die Bindung von IL-15 an seinen Rezeptor die Stabilisierung und die Mobilisierung von IL-15 beeinflusst, wodurch ebenfalls die Sekretion des Liganden reguliert wird [117,118]. Der auf der Zellmembran gebundene IL-15/IL-15R α -Komplex ist in der Lage an die auf der Zelloberfläche von Effektorzellen befindlichen IL-15R $\beta\gamma\epsilon$ zu binden, was entscheidend für die Generierung, Aktivierung und Entwicklung der Effektorzellen, welche sich unter anderem aus den unterschiedlichen Zelltypen des angeborenen und adaptiven Immunsystems zusammensetzen, ist. Die Interaktion des IL-15/IL-15R α -Komplexes mit den IL-15R $\beta\gamma\epsilon$ der Effektorzellen führt wie bereits beschrieben zur Phosphorylierung sowie zur Aktivierung der JAK 1 und 3, welche wiederum die Phosphorylierung und Aktivierung der STAT 5 und 3 einleiten [119]. Die Aktivierung einer Effektorzelle durch die Transpräsentation des IL-15/IL-15R α Komplexes an den IL-15R $\beta\gamma\epsilon$ dieser Zelle ist der für die IL-15 Präsentation am häufigsten verwendete Mechanismus.

Des Weiteren bewirkt IL-15 durch die verstärkte Produktion von NKG2D sowie durch die Phosphorylierung von STAT 1 und ERK 1/2 eine Verstärkung der Zytotoxizität der NK-Zellen [134]. Wie auch schon bei den CD8⁺ T-Lymphozyten werden die NK-Zellen ebenfalls über die von IL-15 induzierte Aktivierung des JAK 1/3-STAT 3/5 Mechanismus beeinflusst [135]. Die Bildung und das Überleben von Granulozyten, $\gamma\delta$ T-Zellen, TCR $\gamma\delta$ + *intraepithelial lymphocytes* (IELs) und CD8 $\alpha\alpha$ IELs werden ebenfalls von der Expression von IL-15 positiv beeinflusst [119], was daran zu erkennen ist, dass diese Populationen in IL-15KO-Mäusen ebenfalls reduziert sind [133].

1.3.6. IL-15/IL-15R α als Strukturen für innovative Therapieansätze

Das breite Wirkungsspektrum von IL-15 und IL-15R α auf die Zellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems lässt vermuten, dass IL-15/IL-15R α eine wichtige Rolle bei einer Fehlregulation des Immunsystems haben könnte. In der Tat konnte bei unterschiedlichen Autoimmunerkrankungen eine veränderte Expression von IL-15 und IL-15R α festgestellt werden. Erkrankungen, die meist mit einem erhöhten Serumspiegel an IL-15 einhergehen sind beispielsweise chronisch entzündliche Darmerkrankungen, Psoriasis, Diabetes Mellitus, Asthma bronchiale [96] sowie Multiple Sklerose [136].

Durch die Anwesenheit von IL-15/IL-15R α wird die Bildung antigenspezifischer CD8⁺ T- und NK- Zellen begünstigt. Da diese Zellen wichtige Vertreter des angeborenen und adaptiven Immunsystems sind, beeinflusst IL-15/IL-15R α so die angeborene und adaptive Immunantwort [137]. Darüber hinaus ist bekannt, dass IL-15 in der Lage ist, die Blut-Hirn-Schranke zu überqueren um in dem Gehirn mit IL-15R α binden zu können [136]. Es wurden bereits Studien durchgeführt, in denen HIV-infizierte Patienten mit IL-15 behandelt wurden. Die Behandlung mit IL-15 bewirkt einen Anstieg der CD4⁺, CD8⁺ und NK1.1⁺-Zellen auf einen mit gesunden Probanden vergleichbaren Wert an [138]. In *in vitro* Experimenten begünstigt IL-15 hingegen die Bildung neuer HIViren sowie deren Infektion von T-Lymphozyten, weshalb vermutet wird, dass IL-15 bei der Erkrankung an HIV eine duale Rolle spielt [139]. Im Falle des Humanen T-lymphotrophen Virus I (HTLV 1) ist bekannt, dass *Peripheral Blood Mononuclear Cells* (PBMCs) infizierter Patienten in *in vitro* Kulturen unter Ausschluss zusätzlicher exogener Zytokine und der Anwesenheit von IL-15 spontan proliferieren [140]. Zudem ist IL-15 für die Stimulation von Gedächtnis CD8 T-Zellen verantwortlich, was wiederum zur Bekämpfung des Virus beiträgt [140]. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Modulation von IL-15 und seinem Rezeptor durchaus von therapeutischem Nutzen für die Behandlung von an HTLV 1 erkrankten Patienten haben könnte [119]. Werden mit Herpesviren infizierte Patienten mit IL-15 behandelt, hat dies eine abgeschwächte Primärinfektion zur Folge, was auf die erhöhte Menge an NK- Zellen, welche die Replikation der Herpesviren hemmt, zurückzuführen ist [141]. In mit dem Hepatitis C Virus infizierten Patienten konnte beobachtet werden, dass die Unterdrückung von IL-15 im Serum den Abfall der dazugehörigen Aminotransferase zur Folge hat, was auf eine enge Verbindung von der Menge an IL-15 im Serum und dem Fortschreiten der chronischen Lebererkrankung (Hepatitis C) schließen lässt [142]. Aufgrund dieser Studien wird IL-15 für Hepatitis C eine pathogene Funktion zugeschrieben [142]. Die Administration von IL-15 in mit *Mycobacterium tuberculosis* infizierten Patienten führt zur Induktion humaner NK-Zellen, was zur Folge hat, dass das intrazelluläre Wachstum des Bakteriums unterbunden wird [143]. Des Weiteren wird IL-15 bereits erfolgreich bei chronischen Erkrankungen des Darms wie beispielsweise *Colitis Ulcerosa* verwendet [119]. Bei verschiedenen Tumorerkrankungen gibt es bereits vielversprechende Studien, in denen IL-15 als Anti Tumor

Therapeutikum bei Patienten appliziert wird. Hierbei wurde unter anderem festgestellt, dass bei der Applikation des IL-15 Rezeptorkomplexes, verglichen zu der Applikation von freiem IL-15, die Halbwertszeit um ein Vielfaches erhöht ist, da der Komplex eine stabilere Einheit als das ungebundene IL-15 darstellt [144]. Bei der Transplantation von Organen wird die Immunantwort ebenfalls durch die Blockade von IL-15 gehemmt, um das Risiko der Abstoßung des transplantierten Organs zu minimieren [145].

1.4. Autoimmunität als Beispiel einer fehlregulierten Immunantwort

Autoimmunerkrankungen entstehen, wenn das Immunsystem nicht in der Lage ist, die körpereigenen Proteine zu erkennen. In diesem Fall hat das Immunsystem seine Selbsttoleranz verloren und beginnt die Zellen und die Organe des eigenen Organismus zu zerstören, was schwerwiegende Erkrankungen zur Folge haben kann. Eine Ursache für Autoimmunität in einem Organismus könnte aus der Aktivierung von CD8⁺ T- und NK-Zellen durch MHC Klasse I Moleküle resultieren [146,147]. Im Thymus kommt es zu einer positiven und negativen Selektion der unreifen T-Zellen. Die Ursache für Autoimmunität konnte jedoch bis heute nicht geklärt werden. Darüber hinaus liegt in Autoimmunerkrankungen wie rheumatischer Arthritis [148,149], Psoriasis [150,151], Typ I Diabetes [152] und inflammatorischen Darmentzündungen eine verstärkte Expression von IL-15 vor, was die Bildung neuer CD8⁺ T-Lymphozyten sowie der NK-Zellen begünstigt [153,154]. Zur Behandlung autoimmuner Erkrankungen wie Arthritis oder Psoriasis wird bereits die Bildung des IL-15 Rezeptorkomplexes unterdrückt, was zur signifikanten Verbesserung des Krankheitsbildes der Patienten beiträgt [155]. Auch bei Patienten, die an Multipler Sklerose (MS) erkrankt sind, wird das proinflammatorische Zytokin IL-15 unter anderem im ZNS, verglichen zu gesunden Probanden, vermehrt produziert [156]. Die Existenz der Autoimmunität bildet eine pathogenetische Basis für die unterschiedlichsten organ-spezifischen sowie systemischen Erkrankungen.

1.5. Multiple Sklerose als organspezifische Autoimmunerkrankung des zentralen Nervensystems

MS stellt die am weitesten verbreitete Autoimmunerkrankung des ZNS im Menschen dar und wird durch multizentrische Inflammationen sowie Demyelinisierungen charakterisiert. In Deutschland sind aktuell ungefähr 200.000 Menschen an MS erkrankt, wobei die Prävalenz bei 0,1-0,15% liegt [157]. In Abbildung 7 ist die geographische Verbreitung von MS sowie das Risiko daran zu erkranken, dargestellt.



Abb. 7: Globale geographische Verbreitung der Prävalenz an Multipler Sklerose zu erkranken (nach *ms-life.de*)

Von dieser Erkrankung sind hauptsächlich junge Erwachsene betroffen, wobei das Durchschnittsalter bei dem Beginn der Erkrankung 24 Jahre ist und die durchschnittliche Lebenserwartung 58 Jahre beträgt [229]. Weltweit sind über eine Millionen Menschen an MS erkrankt. Die grundlegenden Pathomechanismen der MS sind zwar bis heute unbekannt, jedoch weiß man, dass sowohl genetische als auch Faktoren aus der Umwelt Einfluss auf die Inzidenz dieser Erkrankung haben. Menschen, die in industriell weiter entwickelten Ländern wie Nordamerika oder Europa wohnen, haben ein höheres Risiko an MS zu erkranken (Abbildung 7). Zudem ist das Risiko an MS zu erkranken für Frauen dreimal so hoch wie für Männer [158]. Die bei der MS auftretenden klinischen Symptome zeigen typische Charakteristika für die pathologische Störung der ZNS-Funktionen und beinhalten unter anderem die Beeinträchtigung des optischen Apparats, was bis zur Erblindung führen kann. Zudem leiden die Patienten an motorischen- und Koordinationsstörungen, Inkontinenz sowie Spastizität und sensorische Störungen [159,160]. Die zwei am weitesten verbreiteten Formen der MS sind die schubförmige MS (RRMS), bei der sie sich in der frühen Krankheitsphase die Patienten zwischen den Schüben komplett regenerieren können und die progressive MS, bei der sich der Zustand des Patienten vom Krankheitsausbruch an stetig verschlechtert. Für die Erkrankung an MS existieren vier pathologische Hauptmerkmale, welche in jedem Patienten vorkommen. Diese sind unter anderem die entzündliche Infiltration des Nervengewebes, welche als Auslöser der MS vermutet wird. Des Weiteren wird hierzu die Demyelinisierung, welche das Kennzeichen für MS darstellt und bei der die Myelinschichten der Nervenfasern durch Entzündungsreaktionen zerstört werden gezählt. Ein weiteres Hauptmerkmal ist die hierdurch resultierende Schädigung oder der Verlust der Axone und

zuletzt die Gliose, welche die erhöhte Anzahl von Gliazellen in einem geschädigten Bereich des ZNS beschreibt [158].

1.6. Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis als Mausmodell der Multiplen Sklerose

1.6.1. Die Geschichte der Experimentellen Autoimmunen Enzephalomyelitis

Die Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis (EAE) stellt das erste und am besten untersuchte Tiermodell autoimmuner Erkrankungen beim Menschen dar und ist das am häufigsten verwendete Tiermodell der MS [161]. Die erste durch den Menschen verursachte Enzephalomyelitis konnte im Zuge der Entwicklung der Tollwutimpfung durch Louis Pasteur (1885) beobachtet werden [158]. Aufgrund der hohen Nachfrage der Impfung gegen Tollwut wurde das für die Impfung verwendete Rückenmark von Hasen kürzer als vorhergesehen getrocknet [162]. Im Zuge dessen traten nach der Impfung bei den Geimpften in höherem Maße Lähmungserscheinungen auf [163], welche in den meisten Fällen nach kurzer Zeit wieder verschwanden. Auf der zytologischen Ebene konnte neben der Entstehung lymphoider Infiltrate die Demyelinisierung des ZNS nahe der Blutgefäße beobachtet werden [224]. Bei der Immunisierung von Rhesus Affen mit einer Lösung aus Hasengehirnen konnte Thomas Rivers (1930) ebenfalls die Demyelinisierung der Axone sowie Lähmungserscheinungen feststellen [164,165]. Da bei den immunisierten Rhesus Affen Antikörper, die spezifisch für das ZNS sind, entdeckt wurden, ging man davon aus, dass eine ZNS spezifische Immunantwort für die Demyelinisierung verantwortlich war [166]. Durch die Herstellung einer Emulsion aus gesunden Hasengehirnen, *Mycobacterium tuberculosis* und Komplettem Freund's Adjuvans [167] erreichte Rivers eine Methode, bei der anstatt bis zu 80 Injektionen nur noch wenige Injektionen (3-5) für die Induktion von EAE nötig waren [168-170].

1.6.2. Induktion der Experimentellen Autoimmunen Enzephalomyelitis

Die durch Rivers ermöglichte zuverlässige Immunisierung in Folge weniger Injektionen führte dazu, dass EAE heutzutage in den verschiedensten Tierarten, wie Hunden [171], Schweinen [172], Schafen [173], Ziegen [174], Hühnern [175] und verschiedenen Nagetier Spezies [176-178] induziert werden kann. Heutzutage wird den Tieren jedoch keine Emulsion aus Gehirnen mehr injiziert, sondern das aus dem Gehirn durch Zentrifugation isolierte *Myelin Oligodendrozyten Glykoprotein*₃₅₋₅₅ (MOG₃₅₋₅₅) [230]. Von den in der Myelinscheide vertretenen Myelinproteinen stellt MOG, welches unter anderem von myelinisierten Oligodendrozyten gebildet wird, mit 0,1 % nur einen geringen Anteil dar [179]. Eine ausschlaggebende Rolle hat MOG bei MS Patienten, wo es als ein für das ZNS spezifische Autoantigen, welches für die primäre Demyelinisierung verantwortlich gemacht wird, fungiert. Auch in der EAE geht man davon aus, dass das Peptid für die Ausreifung demyelinisierender Läsionen verantwortlich ist [180]. Speziell das Peptid MOG₃₅₋₅₅ wird verwendet, wenn eine besonders starke inflammatorische Immunantwort hervorgerufen werden soll [180]. Da die Immunisierung von C57BL/6J Mäusen in den meisten Laboren mit dieser Peptidsequenz durchgeführt wird, ist dieses EAE Modell bereits sehr gut untersucht, weshalb die Entscheidung auf die Verwendung dieses etablierten Modells gefallen ist. MOG₃₅₋₅₅ wird in einer Emulsion, welche auch heute noch aus inaktiven *Mycobacterium tuberculosis* und Komplettem Freund's Adjuvans besteht, *subcutan* injiziert. Die Verwendung von *Mycobacterium tuberculosis* hat hierbei die Aktivierung des angeborenen Immunsystems sowie die Generierung einer Th1 Immunantwort zur Folge, welche als Voraussetzung für die Induktion von EAE in Mäusen darstellt.

Das Freund's Adjuvans dient ebenfalls zur Aktivierung des angeborenen Immunsystems und kann zudem lokale Entzündungsreaktionen hervorrufen [181]. Zusätzlich erfolgt eine zweimalige intravenöse Injektion von Pertussis Toxin, welches für seine pleiotropen Effekte auf das Immunsystem bekannt ist. Neben der Einleitung der Mitogenese der T-Lymphozyten wirkt sich Pertussis Toxin auch stimulierend auf die Zytokin- und Antikörperproduktion aus. Durch die Aktivierung von APCs in den lymphoiden Organen und im ZNS wirkt sich die Anwesenheit des Toxins zudem positiv auf die klonale Expansion sowohl von Th1 als auch von Th2 Zellen aus. Das ebenfalls durch Pertussis Toxin verursachte Öffnen der Blut-Hirn Schranke erleichtert zudem den T-Lymphozyten und NK-Zellen die Einwanderung in das ZNS [182].

1.6.3. CD8⁺ T-Zellen bei der Immunpathologie der Autoimmunreaktion des zentralen Nervensystems und deren Funktion

EAE setzt eine periphere Entwicklung von Th1 Zellen sowie die Aktivierung von Myelin-spezifischen T-Zellen voraus [183,184]. Sobald die autoreaktiven T-Zellen in der Peripherie aktiviert werden, überwinden diese die Blut-Hirn Schranke und agieren im ZNS gegen hier auftretende organ-spezifische Antigene [184-186,225]. Dies hat zur Folge, dass sich die hierdurch entstandene Immunantwort gegen die Bestandteile des eigenen Myelins richtet, was zur Demyelinisierung der Axone und somit zu Störungen bei der Signalweiterleitung führt. Die tragende Rolle von CD8⁺ T-Zellen in der Pathogenese der MS kann beispielsweise durch die positive Assoziation mit dem MHC Klasse I Allel HLA-A*0301 bestätigt werden. Des Weiteren sind alle neuroektodermalen Zellen in der Lage MHC Klasse I Moleküle zu exprimieren, was es ihnen ermöglicht für zytotoxische CD8⁺ T-Zellen als Zielzellen zu fungieren [187]. Während der MS erfolgt die klonale Expansion von aktivierten CD8⁺ T-Zellen [187]. Die Rolle der Initiierung und Aufrechterhaltung von MS und EAE wird den CD8⁺ T-Zellen zugeschrieben. Zudem wird ihnen eine wesentliche Verantwortlichkeit bei der Zerstörung des Gewebes im ZNS zugesagt [188-190]. Andererseits ist die EAE auch ein entscheidendes Modell in dem die regulatorische, suppressive und somit die eher protektive Funktion der CD8⁺ T-Zellen bereits zu einem frühen Zeitpunkt beobachtet werden konnte [191,192,231]. Der konkrete Wirkmechanismus der CD8⁺ T-Zellen ist sowohl in der MS als auch in der EAE bis heute nicht komplett bekannt, was die phänotypische Charakterisierung dieser Zellen zu einem Bestandteil intensiver Untersuchungen macht [193-196]. Zudem geht man davon aus, dass Fehlregulationen von Effektor- und regulatorischen CD8⁺ T-Zellen im Verlauf der MS oder EAE eine tragende Rolle für das Verständnis der Pathogenese als auch der Entwicklung neuartiger Therapieanwendungen spielen [197].

1.6.4. Immunregulatorische Funktion der NK-Zellen während der Autoimmunreaktion des zentralen Nervensystems

NK-Zellen wird bei der Immunantwort eine tragende Rolle zugesprochen, da sie in der Lage sind, sowohl mit DCs und Makrophagen, als auch mit T-Lymphozyten zu kommunizieren. Über die Sekretion von Typ I Interferonen (z.B. Interleukine) können NK-Zellen von Makrophagen und DCs aktiviert werden. Aktivierte NK-Zellen wiederum beeinflussen die Reifung und Aktivierung von Makrophagen und DCs. Des Weiteren sind NK-Zellen für die Eliminierung von CD4⁺ T-Lymphozyten, unreifen DCs sowie übermäßig aktivierten Makrophagen verantwortlich [198,199]. Aufgrund ihrer breit gefächerten Kommunikationsfähigkeiten geht man davon aus, dass NK-Zellen auch bei den verschiedenen Autoimmunen Erkrankungen zentrale Funktionen einnehmen. Für die Art dieser zentralen Funktion existieren aktuell zwei gegensätzliche Theorien. Einerseits geht man davon aus, dass NK-Zellen durch

den stimulierenden Einfluss auf Makrophagen und DCs starke Entzündungen im Organismus hervorrufen, was zur Aktivierung des adaptiven Immunsystems führt. Es könnte aber auch so verlaufen, dass die NK-Zellen bereits vor dem Auftreten der Autoimmunreaktion die verantwortlichen autoreaktiven Immunzellen eliminieren, wodurch eine autoimmune Erkrankung verhindert werden würde [200]. NK-Zellen könnten also sowohl bei der Initiierung als auch bei der Aufrechterhaltung oder der Progression einer autoimmunen Erkrankung eine tragende Rolle haben [201]. Obwohl das Modell der EAE eine hauptsächlich durch autoreaktive T-Zellen verursachte Erkrankung des ZNS darstellt, üben zusätzliche Effektor Zellen, wie beispielsweise B-Zellen, Makrophagen und NK- sowie NK-T Zellen ebenfalls entscheidenden Einfluss auf die Krankheit aus [202-205]. So konnte bereits gezeigt werden, dass die Depletion der NK-Zellen bei immunisierten Tieren einen verschärften Verlauf der Krankheit zur Folge hat [204,206]. Während der Induktions- und Effektor-Phase wird die Rolle der NK-Zellen als positiv beschrieben. Im Kontrast hierzu konnte ein positiver Einfluss auf die Induktion und die Verstärkung autoimmuner Prozesse durch NK-Zellen beobachtet werden [207]. Hamann et al. [208] beschreibt eine signifikante Rolle bei der schubförmig remittierenden Verlaufsform der MS. Die aktivierte Form der NK-Zellen wird meist in unmittelbarer Nähe von akut inflammatorischer Regionen gefunden. Darüber hinaus ist bestätigt, dass aktivierte NK-Zellen verantwortlich für die Zytolyse autogener Oligodendrozyten sind [209-211]. Das periphere Blut von MS Patienten weist zudem eine Reduktion der zytotoxischen Aktivitäten der NK-Zellen auf [209-211].

1.7. Therapieansätze in der Multiplen Sklerose

Der erste dokumentierte Versuch eine Therapie für MS-Patienten zu entwickeln stammt aus den 1860ern von Dr. Charcot, welcher erfolglos versuchte seine Patienten mit Hilfe von Gold und Silber zu heilen [212]. Über 150 Jahre später wurden mehrere Medikamente entwickelt, die zur Milderung der Krankheit und zur Verminderung der Schübe führt, jedoch konnte bis heute noch keine Therapie für die Heilung von MS entwickelt werden [213]. Ein Großteil der entwickelten Medikamente haben allerdings starke Nebenwirkungen und sind nur in der Lage die schubförmige, remittierende Form der MS zu bekämpfen. Für die progressive Form sind sie meist unwirksam [211]. Die Untersuchungen an dem Tiermodell EAE haben bis heute zu der Entwicklung von drei wirksamen Medikamenten gegen MS geführt [214].

Das starke, unspezifische Immunsuppressivum **Mitoxandron** findet bereits seit den 70er Jahren als antineoplastisches Mittel Anwendung bei Patienten mit Leukämie oder anderen Krebserkrankungen. Seit 2003 ist es in Deutschland auch als Therapeutikum bei MS-Erkrankungen zugelassen. Der enthaltene DNA-Topoisomerase III-Inhibitor lagert sich unspezifisch in die DNA, was die Hemmung der DNA/RNA-Synthese und des Zellzyklus zur Folge hat. Der genaue Wirkmechanismus ist bis heute noch nicht bekannt [215-217]. Mitoxandron wird bei Patienten, die an der schubförmigen Form von MS erkrankt sind über Infusionen verabreicht, wo es das Auftreten neuer Schübe um bis zu 60% reduzieren kann. Die Verabreichung von Mitoxandron ist allerdings durch eine maximale Gesamtdosis auf die Lebenszeit beschränkt [232].

Glatirameracetat ist ein seit 2001 in Deutschland genehmigtes Therapeutikum, das die Schübe von an MS erkrankten um bis zu 30% reduzieren kann und stellt somit eine Alternative zu der Behandlung mit IFN β dar. Der Name deutet auf den die Bestandteile des Medikaments hin. Es besteht aus einem Gemisch von verschiedenen Aminosäuren (**G**lutaminsäure, **L**ysin, **A**lanin, **T**yrosin), die dem Aufbau der Markscheide ähnelt [232]. Glatirameracetat ist in der Lage die unterschiedlichen Level der

Immunantworten zu beeinflussen, indem es an die MHC Klasse I Moleküle der APCs bindet und so fähig ist, mit den Myelinantigenen zu konkurrieren [218-220]. Die hieraus resultierenden Glatirameracetat-spezifischen T-Zellen sind vergleichbar mit den anderen T-Zellen und können ebenfalls die Blut-Hirn-Schranke passieren [221]. Zudem führt die Behandlung mit Glatirameracetat zur Änderung der Eigenschaften von Makrophagen und DCs, was zu einem Shift von einem Th1 zu einem Th2-basierten Zytokinprofil führen kann. Solch ein Shift ist bei der EAE in der Milz und in den Lymphknoten und bei der MS im Blut zu erkennen [222,233]. Die Verabreichung dieses Medikaments hat neben seiner beschriebenen antiinflammatorischen auch sehr starke neuroprotektive Eigenschaften [223].

Natalizumab dient neben der Behandlung von Morbus Crohn ebenfalls zur Behandlung von an schubförmiger MS erkrankten Patienten. Diese Arznei ist seit 2006 in Deutschland zugelassen, darf allerdings nur angewandt werden, wenn eine Therapie mit Glatirameracetat keine Erfolge gezeigt hat. Das Therapeutikum besteht aus humanen, rekombinanten monoklonalen IgG-Antikörpern, welche die Hemmung des Adhäsionsmoleküls α 4-Integrin verursachen und somit die Einwanderung von CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten in die akuten Entzündungsregionen unterbinden. Bei akut auftretenden Schüben zeigt Natalizumab keine Wirkung. Dieser Wirkstoff wird dem Patienten über Infusionen verabreicht [234,235].

Die drei vorgestellten Therapeutika erreichen durch die Hemmung des Immunsystems eine geschwächte Autoimmunantwort, was einen verbesserten Krankheitsverlauf der MS/EAE zur Folge hat.

1.8. Verwendetes IL-15 transgenes Tiermodell

Das proinflammatorische Zytokin IL-15 sowie sein hoch affiner IL-15R α beeinflussen sowohl die Zellen des angeborenen als auch des adaptiven Immunsystems. Die Produktion von IL-15 erfolgt einerseits durch Zellen des Immunsystems, andererseits durch epitheliale und Stroma-Zellen in den Geweben. Die erhöhte Produktion von IL-15 ist charakteristisch für verschiedene Autoimmunerkrankungen wie beispielsweise Psoriasis und Diabetes Mellitus [248]. IL-15 bindet an IL-15R α , was essentiell für die IL-15 Effekte auf den CD8⁺ T-Zellen ist. Die Bindung von freiem IL-15 nur an die β - und γ -Ketten des IL-15 Rezeptorkomplexes ist ausreichend, um NK-Zellen zu rekonstituieren [255]. Im Gewebekontext kann IL-15 an verschiedenen Rezeptorkomplexen gebunden und auf den Zielzellen auf unterschiedliche Art einwirken. Dies hat zu Folge, dass die Aktivierung von Zellen durch das Zytokin IL-15 einen sehr vielfältigen und komplexen Prozess darstellt. Der Effekt von IL-15/IL-15R α auf die Zielzellen wurde bis jetzt nur an Mäusen analysiert, die kein IL-15 oder keinen IL-15R α besitzen [124,125], oder an Mäusen, die neben dem endogenen Maus IL-15 zusätzlich humanes IL-15 produzieren [249]. Es ist unklar, ob die Entwicklung der CD8 und NK-Zellen durch die unterschiedlichen Mengen des Zytokins *in vivo* beeinflusst werden kann. Auch existieren keine publizierten Daten über einen dosisabhängigen Effekt von IL-15. Es ist jedoch bekannt, dass die Überexpression des humanen Zytokins in der Maus zur Lymphomentwicklung führen kann [249]. Die für diese Arbeit verwendeten IL-15 transgenen Mausstämme (KIN 64, KIN 69, KIN 65 und KIN 71), die sich in ihrer Produktion von IL-15 unterscheiden, sowie drei zusätzliche IL-15R α defiziente Mausstämme (IL-15R α KO, KIN 71R α und dKO), stellen ein einmaliges immunologisches Instrumentarium dar, um IL-15-abhängige Zellpopulationen in einem Tiermodell untersuchen zu können. Einerseits wird die IL-15 Produktion weitgehend auf einen Zelltyp reduziert - nur CD11c⁺ Zellen sind in der Lage das Zytokin zu produzieren.

Andererseits erlaubt die unterschiedliche Menge des produzierten Zytokins eine graduelle Rekonstitution der IL-15 abhängigen Zellpopulationen. Bisher wurde noch kein Mausmodell beschrieben, in dem der Effekt von unterschiedlichen Mengen von IL-15 auf die Zielzellen untersucht werden kann. Zudem ermöglichen die Stämme KIN 71 und KIN 71R α die Differenzierung zwischen den Effekten von freiem und an IL-15R α gebundenem IL-15.

1.9. Ziel dieser Arbeit

IL-15 ist ein immunmodulatorisches Zytokin mit einem breiten Wirkungsspektrum, komplexen Wirkungsmechanismen und unterschiedlichen Zielzellen. Seine Effekte auf CD8⁺ T-Zellen und NK-Zellen werden im Kontext der antiviralen und der Anti Tumor Immunantwort untersucht. Wie weit diese von IL-15-abhängigen Zellpopulationen in organspezifischen Autoimmunreaktionen involviert sind, und in wie weit diese Populationen über IL-15 während der Erkrankung moduliert werden kann, ist unklar. Beides, protektive sowie pathophysiologische Effekte, sind für diese Zellen während autoimmuner Reaktionen beim Menschen und in experimentellen Tiermodellen beschrieben worden.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es zu untersuchen, in wie weit die IL-15 Rekonstitution *in vivo* in einem Modell der organspezifischen Autoimmunerkrankung - der Experimentellen Autoimmunen Enzephalomyelitis - eine modulierende Wirkung hat. Dabei werden vier Mausstämmen benutzt, bei den die Expression von IL-15 ausschließlich durch CD11c⁺ Zellen möglich ist. In zwei weiteren Stämmen findet aufgrund des fehlenden IL-15R α keine Trans-Präsentation von IL-15 statt. Einem zusätzlichen Stamm fehlt sowohl das Zytokin IL-15 als auch der hochaffine IL-15R α .

Folgende Fragen sollten dabei beantwortet werden:

- 1) Beeinflusst die Rekonstitution von IL-15 den Phänotyp und die Funktion von Dendritischen Zellen bezüglich deren Effekte auf die CD8⁺ T-Zellen?
- 2) Welchen Auswirkungen hat die CD11c spezifische IL-15 Rekonstitution auf die CD4, CD8 und NK Zellen in den Organen des Immunsystems und in dem zentralen Nervensystem?
- 3) In wie weit moduliert die rekonstituierte IL-15 Produktion den Verlauf und den Schweregrad der Erkrankung in dem-Tiermodell Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis?
- 4) Sind die IL-15 spezifischen Effekte von IL-15R α abhängig?

Die aus diesen Experimenten gewonnenen Erkenntnisse sollen dazu beitragen zu verstehen, wie die IL-15-abhängigen Zellpopulationen den Verlauf von organspezifischen Autoimmunerkrankungen beeinflussen können und helfen neue, therapeutisch relevante Zielstrukturen zu finden.

2. Material

2.1. Tiere

In der vorliegenden Arbeit wurden ausschließlich Tiere aus der hauseigenen Zucht des Forschungszentrums Borstel verwendet. Die Tiere wurden konventionell in Käfigen der Größe Typ II mit Gitterdeckeln und Holzeinstreu gehalten. Frisches Wasser und Futter in Form von autoklavierten Futterpellets wurde den Tieren *ad libitum* angeboten, wobei in einem Käfig maximal sechs Tiere lebten. Als *Enrichment*-Materialien wurden den Mäusen Häuser aus Hartplastik sowie Zellstoffpapiertücher angeboten. Die Unterbringung der Tiere erfolgte im S1 Bereich in einer spezifisch pathogenfreien Umgebung mit einem 12 Stunden Tag/Nacht Rhythmus. Die Temperatur in den Haltungsräumen betrug 21-23°C bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 50-65%. Die Haltung der Mäuse, die Organentnahmen sowie die Tierversuche wurden nach den aktuellen rechtlichen Grundlagen der Bundesrepublik Deutschland sowie nach den aktuellen Richtlinien der GV-SOLAS durchgeführt. Vor der Organentnahme wurden die Tiere mit CO₂ euthanasiert. Die *in vivo* Studien wurden von dem Land Schleswig-Holstein genehmigt und im Rahmen der Tierversuchsgenehmigung V244-7224.121.3 (21-2/15) „Untersuchung der IL-15/IL-15R α abhängigen zellulären Immunantwort während einer EAE-Induktion“ durchgeführt.

2.1.1. C57BL/6 J, IL-15 und IL-15R α defiziente Mäuse

C57BL/6 J Tiere dienten als Kontrolle und werden in dem Folgenden als WT bezeichnet. Zur weiteren Kontrolle der genetisch modifizierten Stämme, in denen das Zytokin IL-15 rekonstituiert wird, wurden Mäuse verwendet, die entweder für das Zytokin IL-15 (IL-15KO) [251] oder für den hoch affinen IL-15R α (IL-15R α KO) [252] defizient waren.

2.1.2. CD11c-spezifische Expression von IL-15-Vorstellung der IL-15 modifizierten Stämme

Zusätzlich zu den bereits vorgestellten Kontrollstämmen, wurden vier IL-15 transgene Stämme, bei denen die Produktion von IL-15 ausschließlich durch CD11c⁺ Zellen erfolgt, von Prof. S. Bulfone-Paus (University of Manchester, Manchester) zur Verfügung gestellt und für die Versuche verwendet. Für die Generierung dieser transgenen Tiere wurde ein Vektor mit dem *CD11c minimal Promotor* benutzt [3,4]. Die Vervielfältigung der für IL-15 kodierenden Sequenz wurde anhand der PCR unter der Verwendung von zwei Primern (Primer 1: 5' -CCCGAATCCACCATGAAAATTTGAAACC-3' , Primer 2: 5'-CCCGAATTCTCAGGACGTGTTGATGAACAT-3) durchgeführt. Das hieraus generierte 0,5kb-Fragment wurde an das 3' Ende des *CD11c minimal Promotors* kloniert (durch Dr. Erwin Duitman). Nach der Linearisierung und Aufreinigung erfolgte die Injektion des Konstruktes in die Blastozysten von WT Mäusen. Die beschriebene Generierung der genetisch modifizierten Tiere erfolgte in dem Labor von Prof. T. Sparwasser (TWINCORE, Hannover). Die Insertion des Transgens wurde mittels qRT-PCR getestet. Bei den Nachkommen der generierten Tiere wurde die Anwesenheit des Transgens mittels PCR unter Verwendung der Primer 3: 5'-GGTCTCTGGCCTCCTGAC-3' und Primer 4: 5'-CAGGACGTGTTGATGAACATTTGG-3' nachgewiesen. Die Verpaarung der generierten IL-15-transgenen Tiere erfolgte mit IL-15KO Tieren. Die auf diese Weise generierten transgenen Stämme wurden KIN 64, KIN 69, KIN 65 und KIN 71 benannt und unterscheiden sich sowohl in der Integrationsstelle als auch in der Anzahl der Kopien des inserierten Transgens. Von Dr. Julia Polanski wurde nachgewiesen, dass diese Stämme unterschiedliche Mengen an IL-15 produzieren [255]. Auch die anschließende Zucht der

genetisch modifizierten Stämme erfolgte heterozygot mit IL-15KO Mäusen. Eine Übersicht der Stämme ist in Abbildung 8 dargestellt.

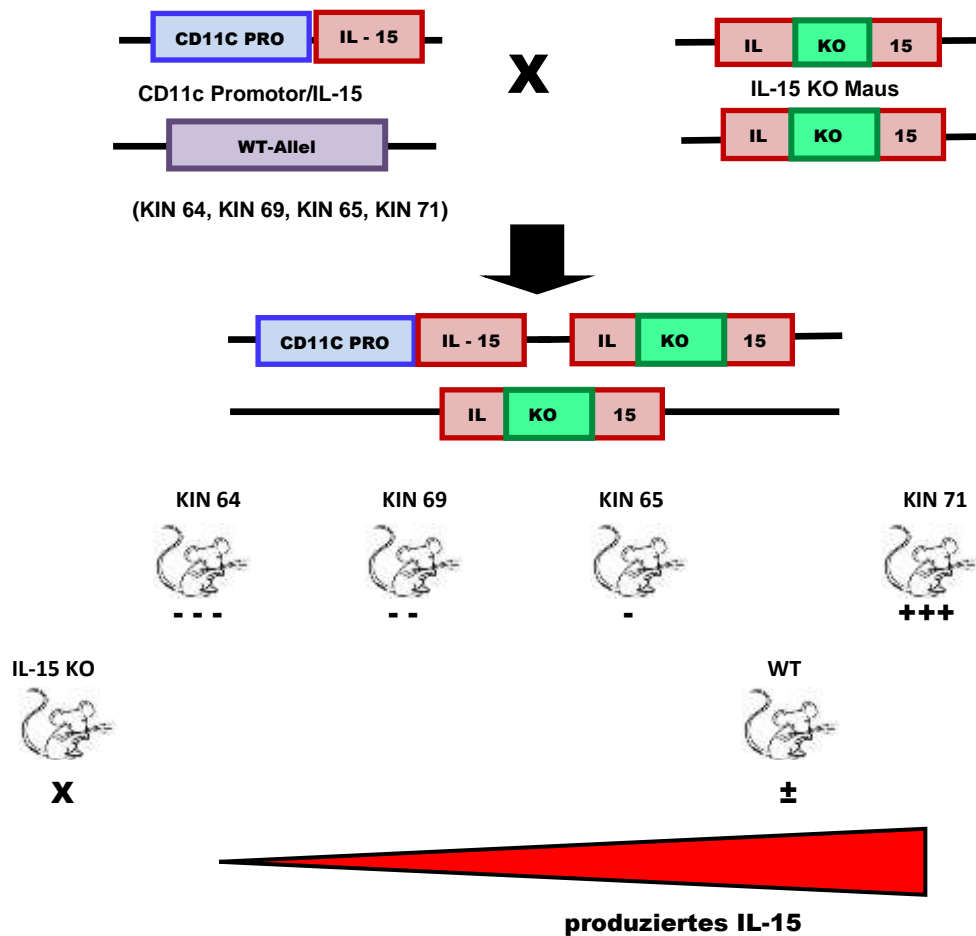


Abb. 8: Generierung der IL-15 transgenen Stämme. Übersicht der verwendeten Stämme sowie deren produzierte Menge an IL-15 in Relation zu den WT und IL-15KO Tieren

2.1.3. CD11c-spezifische Expression von IL-15 ohne Transpräsentation

Um die Rolle des transpräsentierten IL-15 zu untersuchen, wurde der Stamm mit der höchsten IL-15 Expression (KIN 71) mit IL-15R α KO Tieren gekreuzt. Dies führte zur Generierung von zwei weiteren Stämmen. Zum einen KIN 71R α , welcher eine hohe Produktion von IL-15, jedoch keinen IL-15R α aufweist, und dKO, die weder IL-15 noch IL-15R α produzieren können. In IL-15R α KO und KIN 71R α ist die Transpräsentation von IL-15 durch die Abwesenheit von IL-15R α nicht mehr möglich.

2.1.4. T-Zell-Rezeptor-transgene Tiere (OTI)

OTI Mäuse [256] besitzen transgene T-Zell-Rezeptoren (TCR), welche Ovalbumin²⁵⁷⁻²⁶⁴ im Kontext des MHC Klasse I Komplexes spezifisch erkennen. Diese Tiere wurden für die Analyse der Proliferation der CD8⁺ T-Zellen verwendet.

2.2. Verwendete Chemikalien und Reagenzien

Produkt	Hersteller
2-Mercaptoethanol	Gibco
10 x Dream Taq Puffer	Thermo Scientific
10 x Dulbecco's Balanced Salt Solution (DPBS)	PAN Biotechnologies
10 x Hanks Balanced Salt Solution (HBSS)	PAA laboratories GmbH
Akkutase	eBioscience
Agarose Universal peq gold	peqlab
Aqua destillate (Aqua dest.)	Braun
Brefeldin A	Sigma
Bovine serum albumine (BSA)	Sigma
CD 11c prom 3 (GGTCTCTGGCCTCCTGAC)	metabion
Collagenase <i>Clostridium histolyticum</i> (Typ IV)	Sigma
Concanvalin A (Con A)	Roth
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich
Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)	Roth
Dulbecco`s eagle modified medium (DMEM)	PAA laboratories GmbH
DuoSet ELISA (development System) mouse IFN γ	R&D Systems
DuoSet ELISA (development System) mouse IL2	R&D Systems
Desoxyribonukleosidtriphosphat (dNTP)	Roche
EAE Induktionskit (MOG ₃₅₋₅₅)	Hooke
EDTA	Merck
Fötales Kälber Serum (FCS)	Biochrom AG
Gene Ruler 1 kb plus	FERMENTAS
Gene Ruler 100 bp DNA ladder	FERMENTAS
Gentamicin	PAA laboratories GmbH
HEPES	PAA laboratories GmbH
Ionomycin	Sigma
mIL15- 2NE (CAGGACGTGTTGATGAACATTTGG')	metabion
Kaliumchlorid (KCl)	Merck
Kaliumhydrogencarbonat (KHCO_3)	Roth
Kaliumhydrogenphosphat (KH_2PO_4)	Sigma
Komplettes Freund's Adjuvans	Sigma
L-Glutamat	PAA laboratories GmbH
LPS <i>S. friedenau</i> H909	Prof. H. Brade (Borstel)
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Ra	Difco
<i>Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein</i> 35-55 (MOG ₃₅₋₅₅)	Polypeptide Group
Murine Granulocyte macrophage colony-stimulating factor(GMCSF)	Peppo Tech
Murine Granulocyte macrophage colony-stimulating factor(GMCSF)	biolegend
Verdichtetes Narkosegas (80% CO ₂ : 20% O ₂)	Westfalen AG
Natriumazid (NaN_3)	Merck
Natriumcarbonat (Na_2CO_3)	Merck
Natriumchlorid (NaCl)	Merck
Natriumpyruvat	Gibco
Neural tissue dissociation Kit (Papain)	Milteny Biotec
Ovalbumin 257 - 264 (OVA ²⁵⁷⁻²⁶⁴)	Invivogen
Phorbol 12-Myristate 13-Acetate (PMA)	Sigma

Penicillin/ Streptomycin (P/S)	PAA Laboratories GmbH
Percoll™	Ge HealthcareBioSciences
Pertussis Toxin, <i>Bordetella pertussis</i>	Calbiochem
RPMI 1640	Biochrom
Taq DNA Polymerase	FERMENTAS
Tetramethylbenzidin	Thermo scientific
Tris-aminomethan (Tris)	Merck
Trypanblau	Biochrom AG
Tween 20	Sigma
RED Extract N-AMP Tissue PCR	Sigma
Roti-safe Gel-stain	Carl Roth GmbH

Tab. 3: Verwendete Reagenzien

2.3. Verwendete Detektionsreagenzien und monoklonale Antikörper für die Durchflusszytometrie

Antikörper/Reagenz (Klon)	Hersteller
B220/CD45R APC (RA3 – 6B2)	Biologend
B220/CD45R APCCy7 (RA3 – 6B2)	Biologend
B220/CD45R Biotin (RA3 – 6B2)	Biologend
CD3ε FITC (145–2C11)	Biologend
CD4 APCCy7 (RM4–5)	Biologend
CD4 Brilliant Violet 711(RM4–5)	Biologend
CD4 PerCpCy5.5 (RM4–5)	Biologend
CD8α APC (53-6.7)	BD bioscience
CD8α Biotin (53-6.7)	Biologend
CD8α Brilliant Violet 605 (53-6.7)	Biologend
CD8α PerCpCy5.5 (53-6.7)	Biologend
CD11b APCCy7(M1/70)	Biologend
CD11b FITC(M1/70)	Biologend
CD11b PE-Cy7(M1/70)	Biologend
CD11c APC (HL3)	BD bioscience
CD11c FITC (N418)	Biologend
CD11c PE (HL3)	BD bioscience
CD19 FITC (1D3)	BD bioscience
CD40 PE (44986)	BD bioscience
CD45 PE-Cy7 (30f-11)	Biologend
CD49b FITC (DX5)	Biologend
CD70 PE (FR70)	Biologend
CD80 Brilliant Violet 650 (16-10A1)	Biologend
CD80 PE (16-10A1)	BD bioscience
CD86 APC (GL1)	Biologend
CD252 Alexa fluor 647 (RM134L)	Biologend
H2kb PE (AF6-88.5)	Biologend
IA/IE MHC Kl.II PE (M5/114.15.2)	Biologend
IA/IE MHC Kl.II PerCpVio 700 (M5/114.15.2)	Miltenyi Biotec
IFN-γ APC (XMG1.2)	eBioscience
NK1.1 Brilliant Violet 421 (PK136)	Biologend
NK1.1 FITC (PK136)	Biologend
NK1.1 PE (PK136)	Biologend
PDCA 1 Biotin (129C1)	Biologend

Streptavidin Brilliant Violet 421	Biolegend
Streptavidin Brilliant Violet 711	Biolegend
Streptavidin Brilliant Violet 785	Biolegend
XCR-1 APC (ZET)	Biolegend

Tab. 4: Monoklonale Antikörper für die FACS-Analyse

Reagenz	Hersteller
10 x Permeabilization buffer	eBioscience
Anti FITC Microbeads	Milteny Biotec
Carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE)	eBioscience
CD16/CD32 (FcBlock)	eBioscience
Compensation Beads	BD Bioscience
Compensation Beads	eBioscience
IC Fixation buffer	ebioscience Inc
LIVE/DEAD Fixable Blue Dead Cell Stain Kit	Life technologies
Propidiumiodid (PI)	Sigma Aldrich

Tab. 5: Detektionsreagenzien für FACS

2.4. Angesetzte Puffer und Lösungen

2.4.1. Puffer für die Zellkultur

PBS:

10xPBS
Braunwasser

HBSS:

10xHBSS
Braunwasser

BMDC-Medium

RPMI 1640
10% hitzeinaktiviertes FCS
2mM L-Glutamat
50µM 2-Mercaptoethanol
100 U/ml Penicillin
100µg/ml Streptomycin

Erylysepuffer (I):

Braunwasser
0,15M NH₄Cl
0,016M Na₂CO₃
1mM EDTA
pH 7,3
steril filtrieren

Erylysepuffer (II):

Braunwasser
0,15M NH₄Cl
10mM KHCO₃
1mM EDTA
pH 7,2-7,4
steril filtrieren

Stimulationsmedium:

RPMI 1640
10% hitzeinaktiviertes FCS
0,01M HEPES
1mM Na-Pyruvat
0,5M 2-Mercaptoethanol
100U/ml Penicillin
100µg/ml Streptomycin

2.4.2. Puffer für die Zellisolation

MACS-Puffer:

PBS
5% hitzeinaktiviertes FCS

Komplettes DMEM:

DMEM
10% hitzeinaktiviertes FCS
2mM L-Glutamat
100U/ml Penicillin
100µg/ml Streptomycin

Gebrauchslösung Trypanblau (0,05%):

10 Teile NaCl-Lösung (0,89%)
1 Teil Trypanblau (0,5%)

2.4.3. Puffer für die Durchflusszytometrie

10x PBS:

Wasser
3,2mM Na₂HPO₄
0,5mM KH₂PO₄
1,3mM KCl
134mM NaCl
pH 7,4

FACS-Puffer (Färbung):

PBS
2% hitzeinaktiviertes FCS
1mM NaN₃ (10%)
2mM EDTA

FACS-Puffer (Spülen des Geräts):

PBS
10mM NaN₃

2.4.4. Puffer für die Genotypisierung

50 X TAE Puffer für Agarose Gel:

Millipore Wasser
0,2M TriseBase
50mM EDTA (pH 8,0)
0,1mM CH₃COOH (96%)

2.4.5. Puffer für ELISA

BSA-Lösung

PBS
1% BSA

Waschpuffer:

PBS
0,05% Tween 20
pH 7,2-7,4

Substratpuffer

0,1M Natriumacetat
2mM H₂O₂

Substratlösung

Substratpuffer
1mM H₂O₂
0,1mM Tetramethylbenzidin

2.5. Verbrauchsmaterial

Produkt	Hersteller
6-Well Platte	Costar
12-Well Platte	Costar
90mm Petrischale (Steril)	Sarstedt
96-Well Microlon high binding Flachbodenplatte für ELISA	Sarstedt
96-Well Rundbodenplatte	Costar
Cell Trics Sieb steril (40µm)	Partec / sysmex
Easy strainer Sieb steril (100µm)	Greiner Bio one
Einwegpipette (2ml, 5ml, 10ml, 25ml)	Greiner Bio one
FACS Messröhrchen (1,4ml)	Micronic
FACS Messröhrchen (5ml)	Sarstedt
Reaktionsgefäße (15ml, 50ml)	Sarstedt
Kanülen (23Gx1"; 27Gx3/4"; 25Gx5/8")	BD bioscience
Kanülen 26Gx1/2"	Braun
Neubauer Zählkammer	Paul Marienfeld
Pasteurpipetten Glas	Brand
Reaktionsgefäße (1,5ml, 2ml)	Eppendorf
Einmal Skalpell Cutfix	Braun
Spritzen (1ml; 5ml; 10ml; 20ml)	BD bioscience
Spritzen (Luer Lock) (1ml)	BD bioscience

Tab. 6: Verbrauchsmaterial

2.6. Geräte und Software

Gerät	Hersteller
AutoMACS	Miltenyi Biotec
Durchflusszytometer FACS Calibur	BD bioscience
Durchflusszytometer LSR II	BD bioscience
ELISA Reader	Tecan
ELISA Washer	Tecan
Eppifuge	Eppendorf
Gelkammer ⁺ Stromquelle	Biorad
Inkubator	Heraeus / Thermo Electron Corporation
Präzisionswaage	Sartorius
Schüttler MaxQ6000	Thermo Scientific
Sterilbank Mars Safety Class 2	Scanlaf
Thermocycler T 3000	Biometra
Lichtmikroskop	Olympus Optical
LightCycler480 II	Roche Diagnostics
Mikrowelle (1026L)	Privileg
Mikrozentrifuge (Mikro 22)	Hettrich Zentrifugen
Multifuge X3R	Heraeus/Thermo Scientific
Vortex (Minishaker MS2)	IKA works
Wasserbad	Medingen
Wärmeblock Thermomixer compact	Eppendorf
Zentrifuge Fresco17	Heraeus / Thermo Electron Corporation
Zentrifuge Rotina 46R	Hettrich Zentrifugen
Zentrifuge minispin	Eppendorf

Tab. 7: Verwendete Geräte

Software	Hersteller
Cell Quest	BD bioscience
FACS-Diva	BD bioscience
FlowJo (Version 10.0.7)	TreeStar
FlowLogic™	inivai technologies
graphpad Prism 5	GraphPad Software Inc.
LightCycler 480 Software	Roche Diagnostics
Magellan	Tecan
Microsoft Office 2007	Microsoft Cooperation
Microsoft Office 2013	Microsoft Cooperation

Tab. 8: Verwendete Software

3. Methoden

3.1. Genotypisierung der IL-15 transgenen Mäuse

Durch die heterozygote Verpaarung der KIN-Tiere entstanden aus der Zucht sowohl transgene als auch nicht transgene Mäuse. Für die Identifizierung der transgenen Tiere wurde die Anwesenheit des Transgens in der genomischen DNA unter Verwendung des REExtract-N-AMP Tissue PCR Kit von Sigma nachgewiesen. Die Extraktion der DNA erfolgte, indem die Ohrstanzen für 1 Stunde bei 55°C in der Extraction:Tissue Preparation Solution (4:1) inkubiert wurden. Zur Inaktivierung der Reaktion folgte eine 3min. Inkubation bei 95°C. Es folgte die Zugabe des gleichen Volumens an Neutralisationslösung B. Für die PCR Amplifikation wurden pro Probe 0,58pg der DNA, 22,9µl Nuklease freies Wasser, 3µl 10x Dream Taq DNA Polymerase, 0,15mM dNTP-Mix sowie je 0,4µM zweier für das IL-15 Transgen spezifischer Primer (Primer 3: 5' -GGTCTCTGGCCTCCTGAC-3' und Primer 4: 5' -CAGGACGTGTTGATGAACATTTGG-3') in ein PCR-Tube gegeben. Neben den DNA-Proben wurden drei Kontrollen (Wasser (Kontaminationskontrolle), transgen (positive Kontrolle) und nicht transgen (negative Kontrolle)) amplifiziert. Die Amplifikation der DNA-Proben erfolgte über 33 Zyklen in einem DNA Thermocycler, wobei jeder Zyklus aus einer Denaturierungsphase (94°C, 30"), einer anschließenden Annealing-Phase (59°C, 25") gefolgt von einer Extensionsphase (72°C, 40") besteht. Den 33 Zyklen schließt sich eine weitere Inkubationsphase (72°C, 5 min 20") an. Die erhaltenen Produkte der PCR wurden anschließend mit Hilfe eines Agarosegels aufgetrennt und analysiert.

3.2. Elektrophorese

Zur Erstellung eines 1,5%igen Agarose-Gels wurde wärmelösliche Agarose in TAE-Puffer für 5min. in der Mikrowelle erhitzt und auf 30°C abkühlen gelassen. Vor dem Gießen des Agarosegels in die Gelkammer wurde Rotisafe zu dem flüssigen Gel zugegeben. An Nukleinsäuren gebundenes Rotisafe emittiert eine grüne Fluoreszenz, welche unter dem UV-Licht detektiert werden kann. Sobald das Gel fest war wurden die Proben und Kontrollen auf das Gel aufgetragen. Als Standard wurden je 0,45µg des GeneRuler 1 kb DNA Ladder und des GeneRuler 100 bp DNA Ladder verwendet. Das Gel wurde 1 Stunde bei 120V laufen gelassen und anschließend unter UV-Licht fotografiert. Abbildung 9 zeigt das Resultat einer Genotypisierung.

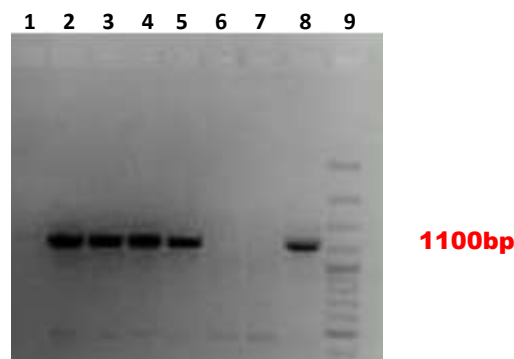


Abb. 9: Genotypisierung des IL-15 Transgens.. In 1-5 sind die zu analysierenden Proben zu sehen, 6-8 sind die Kontrollen (Wasser (6), transgen negativ (7), transgen positiv (8)). In 9 ist der Standard Gene Ruler 100 bp.

In den Spuren 6-8 sind Wasser, die negative und die positive Kontrolle aufgetragen. Die Wasserprobe dient hierbei dazu, eine Verunreinigung der Reagenzien ausschließen zu können. Bei der positiven

Kontrolle wird auf der Höhe von 1100bp eine Bande sichtbar, die die amplifizierte Transgen-DNA anzeigt. Bei der negativen Kontrolle ist kein Transgen enthalten, weshalb hier keine Bande auftritt. Die nur in den transgenen Tieren vorkommende Bande ermöglicht die Differenzierung von transgenen und nicht transgenen Nachkommen. In Kammer 1 ist keine Bande sichtbar, also handelt es sich hier um ein nicht transgenes Tier. In den Kammern 2-5 ist jeweils eine deutliche Bande zu sehen, was darauf schließen lässt, dass diese Tiere transgen sind.

3.3. Bestimmung der IL-15 Expression in den genetisch modifizierten Stämmen

3.3.1. RNA Extraktion

Die Extraktion der RNA der in *RNA Later* stabilisierten Gewebeproben aus den Milzen der Mäuse erfolgte mit Hilfe des *RNEasy Kit* (Quiagen) anhand der Herstellerangaben. Das Gewebe wurde hierfür in RLT-Puffer transferiert und mit Hilfe des Omni TH2 Homogenisators homogenisiert. Um optimale Voraussetzungen für das selektive Binden der RNA an die RNeasy-Membran zu schaffen, erfolgte vor dem Auftragen auf die RNeasy Mini spin column die Verdünnung der Lysate mit Ethanol. Nur die RNA bindet an der Siliziummembran, was das effiziente Entfernen von Kontaminationen durch mehrere Waschschrte mit RPE-Puffer ermöglicht. Das Lösen der aufgereinigten RNA von der Siliziumsäule wird durch die Inkubation und dem anschließenden Spülen in RNase freiem DEPC-Wasser (0,1%) erreicht. Im Anschluss folgte die Bestimmung der Konzentration der Extrahierten RNA unter Verwendung des Tecan Readers. Alle Schritte wurden auf Eis durchgeführt. Die extrahierte RNA wurde bis zu der cDNA-Synthese bei -80°C weggefroren.

3.3.2. Synthese der cDNA

Die Synthese der cDNA erfolgte unter der Verwendung von 2,5µg RNA, oligo-dT Primern (5'-TTTTGTACAAGC(TTT)10-3') (Invitrogen) und der Superscript III reversen Transkriptase (Life Technologies) unter Befolgung der Anleitung des Herstellers. Die oligo-dT Primer binden an das poly-A-Segment der RNA und ermöglichen somit mit Hilfe der Reversen Transkriptase die Synthese der Erststrang cDNA. 2µg RNA wurden in 10µl RNase-freiem H₂O resuspendiert und mit 0,42µg oligo dT-Primer 10min. bei 70°C inkubiert und auf Eis gelagert. Der Mastermix wurde laut Herstellerangaben erstellt und zu den Proben gegeben. Die Proben wurden für 1 Stunde bei 37°C und anschließend für 5min. bei 95°C inkubiert. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Proben bei -20°C weggefroren.

3.3.3. Analyse der CD11c/ IL-15 Expression

Die relative Genexpression von CD11c und IL-15 in Gewebeproben der Milz wurde mit der quantitativen RT-PCR unter Verwendung des LightCycler 480 II (Roche Diagnostics), des gebrauchsfertigen „hot start reaktion kit“ (LightCycler 480 Probe Master), den spezifischen Hydrolysierungsproben (Universal Probe Library, UPL) und Primern, welche von dem „Universal Probe Library Assay Design Center“ (www.universalprobelibrary.com) empfohlen wurden und in Tabelle 9 aufgelistet sind. Anhand dieser Analyse wurde untersucht, ob die genetisch modifizierten Stämme unterschiedliche Expressionsmuster der mRNA für CD11c und IL-15 zeigen. Hierfür erfolgte eine 1:5 Verdünnung der zuvor generierten cDNA mit DEPC-Wasser, von welcher 2,5µl als Vorlage für die qRT-PCR verwendet wurden. Zusätzlich zu der cDNA wurden 5µl des 2-fach TaqMan PCR Master Mix und jeweils 0,4µM der spezifischen Gensequenz zugehörigen *forward* – und *reverse*-Primer sowie 0,1µl der UPLs verwendet.

Primer	Primersequenz (5`- 3`)	UPL
IL-15_for	cagaggccaactggatagatg	#80
IL-15_rev	actgtcagtgataaaagtggtgtaa	#80
HPRT_for	tcctcctcagaccgctttt	#95
HPRT_rev	cctggttcatcatcgctaatac	#95
CD11c_for	aggctcaagacaggacat	#106
CD11c_rev	gaatcctggaggggatct	#106

Tab. 9: Für die qRT-PCR verwendete Primer und UPL-Proben

3.3.4. Quantitative Real Time-Polymerase Kettenreaktion

Die quantitative Real Time-Polymerase Kettenreaktion (qRT-PCR) stellt eine Amplifikationsmethode für Nukleinsäuren dar, die auf dem Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion beruht. Zusätzlich bietet sich hier die Möglichkeit zur Quantifizierung in Echtzeit, welche durch die Messung von Fluoreszenzen während oder nach einem PCR-Zyklus durchgeführt wird. Hierbei nimmt die Fluoreszenz proportional mit der Menge der PCR Produkte zu, was die Möglichkeit zur Quantifizierung bietet [257,258]. Die Fluoreszenzdetektion erfolgt in den hier durchgeführten Experimenten über die TaqMan-Sonde. Die TaqMan-Sonde ist ein Oligonukleotid, welches an einem Ende einen Reporter- und an dem anderen Ende einen Quencher-Fluoreszenzfarbstoff trägt, wobei die Quencher die Emission des Reporters unterdrückt. Durch die Aktivierung der Taq-Polymerase kommt es zum Abbau der Sonde, womit sich Quencher und Fluorophor voneinander entfernen, was zu einer gesteigerten Reporter-Fluoreszenz in der Messung führt [259].

3.4. Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis

Für die Immunisierung der Tiere und EAE-Induktion wurden die Stämme WT, IL-15KO, IL-15R α KO, KIN 64, KIN 69, KIN 65, KIN 71, KIN 71R α sowie dKO verwendet. Es wurden ausschließlich weibliche Tiere im Alter von 8-11 Wochen verwendet. Darüber hinaus wurde darauf geachtet, dass die Tiere in einer Versuchsreihe ein minimal abweichendes Ausgangsgewicht hatten. Bereits eine Woche vor der Immunisierung wurden die Tiere für den Versuch zusammengesetzt (bis zu 6 Tiere pro Käfig) um zusätzlichen Stress während der Immunisierung zu vermeiden. Zudem wurden nach Möglichkeit Wurfgeschwister aus den heterozygoten Verpaarungen verwendet.

3.4.1. Induktion der Experimentellen Autoimmunen Enzephalomyelitis

Die Induktion der Experimentellen Autoimmunen Enzephalomyelitis erfolgte mit Reagenzien zwei verschiedener Hersteller.

In der ersten Versuchsreihe wurde EAE in den Mäusen mit einem bereits gebrauchsfertig gelieferten Kit (Hooke Laboratories) unter Einhaltung der Anleitung des Herstellers induziert (http://hookelabs.com/protocols/eaeAI_C57BL6.html). Die immunisierten Tiere wurden in dieser Versuchsreihe 50 Tage lang beobachtet und deren Krankheitsverlauf analysiert. Die EAE-Kits beinhalteten bereits mit der homogenen Antigen/Kompletten Freund's Adjuvans-Emulsion vorgefüllte 1ml Spritzen. Diese Spritzen enthielten je eine 1mg MOG₃₅₋₅₅-Komplettes Freund's Adjuvans-Emulsion sowie 2mg/ml abgetötete *Mycobacterium tuberculosis*. Um die Prozedur der Immunisierung für die Tiere möglichst stressfrei zu gestalten, wurden diese für ca. 20 Sekunden mit einem CO₂/O₂-Gemisch (80% CO₂/20% O₂) betäubt.

In dieser Zeitspanne wurde den Tieren die MOG₃₅₋₅₅/Komplettes Freund's-Adjuvans-Emulsion *subcutan* mit einer 25G x 5/8" Kanüle je 100 μ l zwischen die Schulterblätter und zwischen die Hinterbeine auf

dem Rücken injiziert. 2-4 Stunden nach dieser Injektion wurde den Tieren 200ng in PBS gelöstes Pertussis Toxin intravenös in die Schwanzvene mit einer 26 G ½ “ Kanüle injiziert. Nach 48 Stunden erfolgte eine weitere Injektion von 200ng Pertussis Toxin in die Schwanzvene.

In einer weiteren Versuchsreihe wurden die Tiere mit einer selbst gemischten Emulsion immunisiert. Diese wurde ebenfalls an Tag 0 und Tag 2 *subkutan* injiziert und beinhaltete je 150µg MOG₃₅₋₅₅-Peptid in 100µl PBS, 100µl Kompletten Freund's Adjuvans und 400µg *Mycobacterium tuberculosis*. Die einzelnen Bestandteile (MOG₃₅₋₅₅-Peptid, *Mycobacterium tuberculosis* und Komplettes Freund's Adjuvans) wurden so lange abwechselnd auf einem Reagenzglasschüttler geschüttelt und auf Eis gekühlt bis eine einheitliche Emulsion entstanden ist, welche unter Ausschluss von Luftblasen in 1ml Spritzen aufgezogen und den Tieren wie zuvor beschrieben zwischen die Schulterblätter und die Hinterbeine injiziert wurde. 2-4 Stunden sowie 48 Stunden nach der *subkutanen* Injektion folgte auch hier eine intravenöse Injektion in die Schwanzvene von 400ng in PBS gelösten Pertussis Toxin pro Tier. 15 Tage nach der Immunisierung erfolgte bei diesen Tieren die Organentnahme. In Abbildung 10 sind die Immunisierung der Tiere sowie der Versuchsablauf schematisch dargestellt.

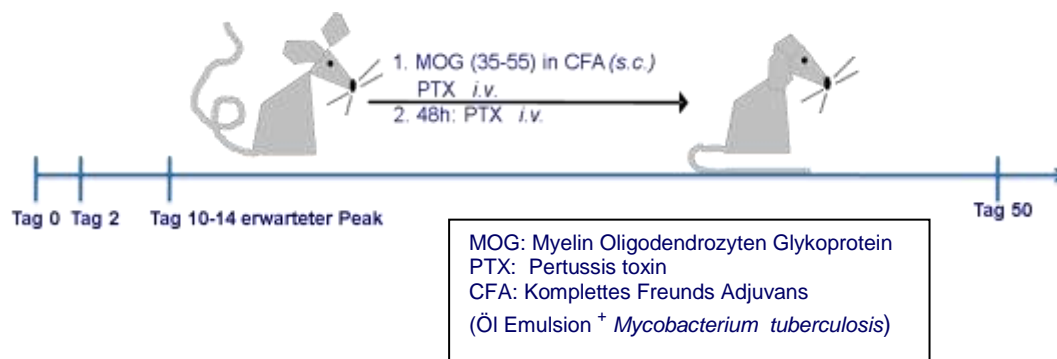


Abb. 10: Schematische Darstellung des EAE Versuchsaufbaus

Die *subkutane* Injektion der MOG₃₅₋₅₅/Komplettes Freund's-Adjuvans-Emulsion erfolgte an Tag 0, die intravenöse Injektion von Pertussis Toxin an Tag 0 und Tag 2. Die Tiere wurden je nach Versuchsreihe bis zu 50 Tage beobachtet, um den Effekt von IL-15/IL-15R α auf den Krankheitsverlauf zu analysieren. Der Peak der Erkrankung ist bei den WT-Tieren zwischen Tag 10-14 zu erwarten. Zu diesem Zeitpunkt der Erkrankung werden im ZNS als Hauptangriffspunkt der EAE, die größten zellulären Änderungen erwartet, weshalb die Analyse der Immunzellen in ZNS an Tag 15 nach der Immunisierung durchgeführt wurde. Bei den Tieren aus der ersten Versuchsreihe wurde der Krankheitsverlauf für 50 Tage beobachtet und anschließend Organe für die Analyse der Zellen auf längerfristige Änderungen durch die Erkrankung untersucht.

3.4.2. Beurteilung des Schweregrades der Krankheit

Ab Tag 5 nach der Immunisierung wurden die Tiere täglich auf Krankheitssymptome untersucht sowie einmal pro Woche gewogen. Für die einheitliche Bewertung der klinischen Symptome wurden die in Tabelle 10 aufgeführten Kriterien für die Festlegung der Schwere der Erkrankung (Score) festgelegt.

Score	Krankheitsbild
0	keine Beeinträchtigung
0,5	Reduktion des Schwanztonus
1	komplette Schwanzlähmung
1,5	Hinterbeinschwäche mit Beeinträchtigung im Geradeauslauf, teilweise Schwanzlähmung
2	reduzierter Geradeauslauf und komplette Schwanzlähmung
2,5	Hinterbeinschwäche mit Nachziehen der Beine
3	komplette Hinterbeinlähmung
4	komplette Hinterbeinlähmung mit Schwäche der Vorderbeine

Tab. 10: Einstufung der klinischen Symptomatik der immunisierten Tiere

Zeigten die Tiere Score 0,5-1,5, wurde dies als schwache Erkrankung gewertet. Konnten die Tiere sich nicht mehr auf dem Gitter festhalten (2) oder fingen sie an ihre Beine hinterher zu ziehen (2,5), wurde das als eine mittelstarke Erkrankung gewertet. Trat bei den Tieren eine komplette Lähmung der Hinterbeine auf (3) oder konnten sie sich im Käfig kaum noch vorwärts bewegen (4) wurde dies als schwere Erkrankung mit einer starken Beeinträchtigung der Tiere gewertet. Nach Ausbruch der Krankheit (Score 0,5) wurde den Tieren in Wasser aufgeweichte Futterpellets in die Käfige gegeben um weiterhin die Möglichkeit zur Nahrungsaufnahme gewährleisten zu können. Zeigte ein Tier länger als 24 Stunden das Krankheitsbild von Score 4, musste der Versuch für dieses Tier beendet werden. Während der Dauer des Versuches wurde eine maximale Reduktion des Ausgangsgewichtes von 20% toleriert. Im Fall der Überschreitung der Gewichtsabnahme musste der Versuch für das betreffende Tier ebenfalls beendet werden.

3.5. Techniken der Zellkultur

3.5.1. Ermittlung der Zellzahl

Die Zellzählung wurde gleichzeitig mit dem Ausschluss toter Zellen mittels Trypanblau-Färbung durchgeführt. Trypanblau dringt durch die Membran toter Zellen und färbt die Zellen blau an, was es ermöglicht unter dem Mikroskop tote von lebendigen Zellen zu differenzieren. Zur Bestimmung der Zellzahl wurde die Zellsuspension 1:20 in einer Trypanblau-Gebrauchslösung verdünnt und die Zahl der lebenden Zellen in einer Neubauer Zählkammer unter einem optischen Mikroskop bestimmt.

3.5.2. Lyse der Erythrozyten

Da die Anwesenheit von Erythrozyten die Messungen der Proben im Durchflusszytometer beeinträchtigen kann, wurden diese bei der Aufreinigung der Blutzellen sowie der Zellsuspensionen aller analysierter Organe vor der FACS-Färbung der Zellen entfernt. Für die Lyse der Erythrozyten in den Zellsuspensionen der Organe wurde der Erylysepuffer II verwendet, wobei das Zellpellet in 2ml des Puffers resuspendiert wurde. Nach einer Inkubationszeit von 2 min. bei Raumtemperatur wurde die Reaktion mit einem 10-fachen Überschuss an FCS-haltiger Lösung abgestoppt. Bei der Aufarbeitung von Blutproben wurde der langsamere und schonendere Erylysepuffer I verwendet. Hierfür wurden die Proben in je 1ml des Puffers resuspendiert und die Reaktion nach einer Inkubationszeit von 15min. bei Raumtemperatur durch die Zugabe von 2ml FCS-haltiger Lösung abgestoppt. Bei Bedarf wurde die Erylyse der Zellen einmal wiederholt.

3.5.3. Isolation der Zellen aus dem Blut

Den euthanasierten Tieren wurde das Blut mittels Herzpunktion mit einer 1ml Spritze und einer 23G x 1“ Kanüle entnommen und in einer 2,7% igen EDTA-Lösung in PBS resuspendiert. EDTA bindet die im Blut enthaltenen Ca^{2+} -Ionen, was die Gerinnung des Blutes nach der Entnahme verhindert und somit die Analyse der Zellen ermöglicht. Nach einer 5min. Zentrifugation bei 360g und Raumtemperatur wurden in den Proben die Erythrozyten lysiert (3.5.2.). Nach einem Waschschrift wurden die Zellen bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert.

3.5.4. Generierung und Kultivierung von *Bone Marrow Dendritic Cells*

3.5.4.1. Isolation des Knochenmarks

Den Versuchstieren wurde das Knochenmark entnommen, um die darin enthaltenen Stammzellen *in vitro* zu *Bone Marrow Dendritic Cells* (BMDCs) zu differenzieren. Hierfür wurden *Femur* und *tibia* den Tieren entnommen und bis zur Verwendung in kaltem PBS gelagert. In steriler Umgebung wurden die Knochen von Muskeln und Geweberesten befreit. Es folgte die Entfernung der Endstücke der gereinigten Knochen um das Knochenmark mit einer 10ml Spritze, einer 27G $\frac{3}{4}$ “ Kanüle und 2-3ml PBS heraus zu spülen und in ein steriles Reaktionsgefäß zu überführen. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Zellen auf Eis gelagert.

3.5.4.2. Einfrieren von Knochenmark

Wurden Tiere aufgrund der Entnahme anderer Organe abgetötet, konnte zusätzlich das Knochenmark entnommen und weggefroren werden, um es zu einem späteren Zeitpunkt zur Generierung von BMDCs zu verwenden. Die Gewinnung des Knochenmarks erfolgte hier wie bereits in 3.5.4.1. beschrieben. Die erhaltene Zellsuspension wurde bei 427g und 4°C für 5min. zentrifugiert. Das Pellet wurde in 900 μ l inaktiviertem FCS (4°C) und 100 μ l DMSO resuspendiert und bei -80°C weggefroren. Nach dem Auftauen der Zellen war keine Lyse der Erythrozyten mehr notwendig.

3.5.4.3. Generierung von *Bone Marrow Dendritic Cells*

Die Generierung der BMDCs erfolgte weitgehend nach der von M. Lutz et al. publizierten Methode [10]. Hierfür wurde das in 3.5.4.1. isolierte Knochenmark mit PBS gewaschen (427g, 4°C, 5min), die Erythrozyten lysiert (3.5.2.) sowie die Anzahl der lebenden Zellen bestimmt (3.5.1.). Alternativ wurden die gefrorenen BMDCs zügig aufgetaut, indem sie in 37°C temperiertem BMDC-Medium resuspendiert und ebenfalls deren Zellzahl bestimmt (3.5.1.) wurden. Pro Tier wurden 3×10^6 Zellen mit 10ml BMDC-Medium sowie 20ng/ml GMCSF in 90mm Petrischalen für 7 Tage bei 37°C und 5% CO_2 kultiviert. Nach 3 Tagen wurde zu jedem Ansatz 10ml frisches BMDC-Medium mit 20ng/ml GMCSF gegeben. An Tag 6 wurden 10ml Medium aus der Kultur entnommen, zentrifugiert (427g, 4°C, 5min.) und das Pellet erneut in 10ml frischem BMDC-Medium mit 20ng/ml GMCSF resuspendiert. Die Zellen wurden wieder in die Petrischale überführt.

3.5.4.4. Ablösen der *Bone Marrow Dendritic Cells*

BMDCs sind adhärenente Zellen, die am Boden der Petrischale festwachsen. Nach der 7 tägigen Kultur wurden diese mit Hilfe warmer Akkutase vom Boden der Kultivierungsplatten gelöst. Nach der Überführung des Überstands in ein steriles Reaktionsgefäß erfolgte das Spülen der Petrischale mit PBS. Die adhärenenten Zellen wurden in 3ml warmer Akkutase für 10min. inkubiert (37°C, 5% CO_2). Die

gelösten BMDCs wurden zu dem Überstand überführt, zentrifugiert (427g, 4°C, 5min) und deren Zellzahl bestimmt (3.5.1.). Bis zur weiteren Verwendung wurden die Zellen auf Eis gelagert. Pro 3×10^6 ausplattierte Knochenmarkszellen betrug die Ausbeute nach der Kultivierung $8\text{-}12 \times 10^6$ BMDCs, wobei der Anteil der lebenden Zellen in allen Experimenten mindestens 80% betrug. Die Ausbeute war bei den IL-15 und IL-15R α defizienten Tieren in einem Teil der Experimente leicht, jedoch nicht signifikant, reduziert.

3.5.5. Isolation der Zellen aus der Milz

Zur Isolation der lymphoiden Zellen aus der Milz wurde diese in steriler Umgebung durch ein 100 μ m Sieb gerieben. Nach der Lyse der Erythrozyten (3.5.2.) und einem Waschschrift mit PBS (427g, 4°C, 5min.) erfolgte die Bestimmung der Zellzahl (3.5.1.). Die Ausbeute der Zellen lag bei den dargestellten Experimenten zwischen $80\text{-}100 \times 10^6$ Zellen pro Tier. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Zellen auf Eis gelagert.

3.5.6. Isolation der Zellen aus der Milz zur Analyse der Dendritischen Zellen

Um die DCs schonend aus der Milz zu isolieren, wurde diese enzymatisch verdaut [261]. Die Milz wurde mit einem Skalpell zerkleinert und 30min. bei 37°C in kompletten DMEM, welches 1mg/ml Collagenase IV enthält, verdaut. Nach der anschließenden Lyse der Erythrozyten (3.5.2.) und der Bestimmung der Zellzahl (3.5.1.) wurden je Well 2×10^6 Zellen in eine 96Well-Rundboden-Platte überführt, welche bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert wurde. Nach dem Verdau der Zellen betrug die Ausbeute in den meisten Fällen zwischen $75\text{-}90 \times 10^6$ Zellen pro Milz

3.5.7. Aufreinigung von CD8⁺ T-Zellen durch negative Selektion unter Verwendung des *Magnetic Activated Cell Sorting*

Zur Analyse der *in vitro* Proliferation von CD8⁺ T-Zellen wurden diese aus den Lymphknoten von OTI-Mäusen über eine negative Selektion unter Verwendung der MACS-Technik isoliert.

Magnetic Activated Cell Sorting (MACS) ist ein Verfahren zur Zellsortierung, bei dem magnetisch geladene Zellen anhand ihrer Ladung von nicht geladenen Zellen getrennt werden. Dieses Verfahren kann sowohl durch ein speziell hierfür entwickeltes Gerät (AutoMACS), als auch von Hand durchgeführt werden. In dieser Arbeit wurde die Negativseparation der Zellen verwendet, da die gewonnenen CD8⁺ T-Zellen anschließend in den Proliferationsassay eingesetzt wurden. Die Zellen wurden erst mit Antikörpern und anschließend mit Microbeads markiert. Die mit den Microbeads markierten Zellen wurden bei der Sortierung im magnetischen Feld der Säulen des AutoMACS zurückgehalten, während die nicht markierten CD8⁺ T-Zellen die Säule problemlos passieren konnten. Für die Separation wurde das Programm „depletes“ verwendet, da bei diesem Programm die Separation mit reduzierter Fließgeschwindigkeit erfolgt, was zum einen schonender für die Zellen ist und zum anderen eine höhere Reinheit der isolierten Zellen ermöglicht.

Den Tieren wurden die inguinalen, mesenterialen, axillaren, brachialen sowie die oberflächlichen Halslymphknoten entfernt und in steriler Umgebung durch ein 100 μ m Sieb gerieben. Nach der Lyse der Erythrozyten (3.5.2.) und der Bestimmung der Zellzahl (3.5.1.) wurde eine Zellkonzentration von 1×10^8 Zellen/ml in MACS-Puffer eingestellt. Die Zellsuspension wurde mit ausreichender Menge monoklonaler Antikörper, die keine CD8⁺ T-Zellen binden (CD4, CD45R/B220, CD49b, CD11c und CD11b) für 20min. bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Nach einem Waschschrift (427g, 4°C, 5min) mit MACS-Puffer wurden die Zellen zusätzlich mit Microbeads, welche an die zuvor gebundenen Antikörper

binden, inkubiert (20min., 4°C, im Dunkeln). Nach einem weiteren Waschschrift (427g, 4°C, 5min.) wurden die in MACS-Puffer aufgenommenen Zellen durch ein 30µm Sieb filtriert und mit dem AutoMACS unter der Verwendung des Programms „depletes“ sortiert. In der negativen Fraktion befanden sich die nicht markierten, aufgereinigten CD8⁺ T-Zellen. Die Effektivität der Aufreinigung wurde direkt im Anschluss mit einer FACS-Analyse an dem FACS-Calibur kontrolliert. Ein exemplarisches Beispiel für die Effektivität der Anreicherung der CD8⁺ T-Zellen ist in Abbildung 11 dargestellt.

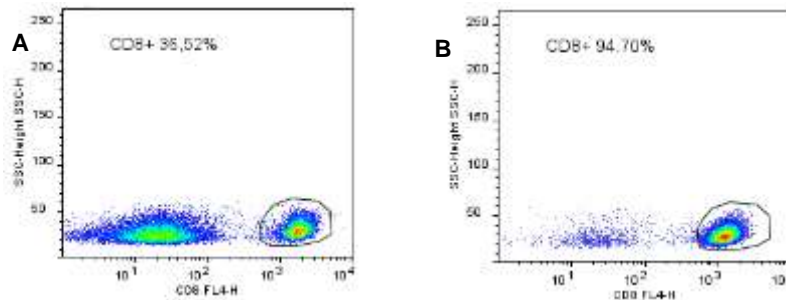


Abb. 11: Anreicherung der CD8⁺ T-Zellen durch die Negativselektion. A: Die Zellen der Lymphknoten vor der Selektion. **B:** CD8⁺ T-Zellen nach der Selektion

Für die Kontrollfärbung wurden die toten Zellen durch die PI-Färbung aus der Analyse ausgeschlossen. Die lebenden Zellen wurden auf ihren Anteil an CD8⁺ T-Zellen untersucht. Vor der Selektion der Zellen mit der MACS-Methode betrug der Anteil der CD8⁺ T-Zellen ungefähr 30%, welcher durch die Selektion auf knapp 95% anstieg. Die Reinheit der CD8⁺ T-Zellen nach der Aufreinigung betrug in allen Experimenten mindestens 90%.

3.5.8. Isolation von Lymphozyten und Mikroglia aus dem Gehirn

Da die Erkrankung an MS bei dem Menschen und Induktion der EAE bei den Mäusen hauptsächlich das ZNS betrifft, wurde in dieser Arbeit die Zusammensetzung der Lymphozyten im Gehirn von naiven und immunisierten Mäusen untersucht. Nach dem enzymatischen Verdau der Gehirne erfolgte die Auftrennung mit einem Percoll-Gradienten [11]. Die Aufarbeitung der Gehirne erfolgte mit dem „Neural tissue Dissociation Kit (Papain)“ (Miltenyi Biotec) anhand der Gebrauchsanweisung des Herstellers. Nach der Zerkleinerung mit einem Skalpell wurden die Gehirne in *Hanks Balanced Salt Solution* (HBSS) gewaschen (550g, 2min., 18°C) und in dem Enzymmix 1 (37°C) bei langsamer Rotation 15min. bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von Enzymmix 2 gefolgt von 2 Inkubationsschritten von je 10min. bei 37°C. Zwischen den Inkubationsschritten wurden die Zellen mehrmals mit einer Pasteurpipette resuspendiert. Die verdauten Zellen wurden durch ein 30µm Sieb filtriert, mit PBS gewaschen (550g, 2min., 18°C) und die Erythrozyten lysiert (3.5.2.). Aus Percoll und 10xHBSS wurde in einem Reaktionsgefäß eine 70%ige Percoll Lösung erstellt, welche von den in einer 30%igen Percoll-HBSS-Lösung resuspendierten Zellen überschichtet wurde. Es folgte eine 30 minütige Zentrifugation bei 390g und 18°C (ohne Verwendung der Bremse). Die zwischen den Percollschichten entstandene Interphase, welche die mononukleären Zellen beinhaltet, wurde entnommen, mit PBS gewaschen (550g, 5min., 18°C) und die Anzahl der enthaltenen lebenden Zellen bestimmt (3.5.1). Bis zur weiteren Verwendung wurden die Zellen auf Eis gelagert.

Nach der beschriebenen Isolation lag die Ausbeute bei naiven Tieren bei 1×10^6 Zellen pro Tier, bei Tieren nach der EAE Induktion zwischen $2-4 \times 10^6$ Zellen pro Tier. IL-15KO und IL-15R α KO Tiere zeigten eine leichte, jedoch nicht signifikante, Reduktion der absoluten Zellzahl im Gehirn.

3.6. Zellstimulation *in vitro*

3.6.1. Stimulation der Bone Marrow Dendritic Cells

Zur Steigerung der IL-15 Expression in den BMDCs, wurden diese zum Teil *in vitro* mit Lipopolysaccharid (LPS) aus *S. friedenaui* stimuliert. Dies erfolgte an Tag 6 der Kultur durch die Zugabe von 100ng/ml LPS zu dem in den Kulturen enthaltene BMDC-Medium ungefähr 24 Stunden vor dem ablösen der BMDCs.

3.6.2. Induktion der Proliferation von CD8⁺ Zellen

Die aufgereinigten CD8⁺ T-Zellen der OTI-Mäuse besitzen einen transgenen T-Zell-Rezeptor, welcher spezifisch für das OVA²⁵⁷⁻²⁶⁴ im Komplex mit MHC Klasse I Molekülen ist. Um den Einfluss von IL-15/IL-15R α auf die Aktivierung von CD8⁺ T-Zellen durch BMDCs untersuchen zu können, wurden die BMDCs mit den aus den OTI-Mäusen isolierten CD8⁺ T-Zellen kultiviert und die Proliferation von CD8⁺ T Zellen gemessen. Aus den BMDCs wurden zwei Ansätze mit je 2×10^6 Zellen erstellt, von denen einer unbehandelt blieb und der andere mit 2 μ g/ml OVA²⁵⁷⁻²⁶⁴ –Peptid inkubiert wurde. Während einer dreistündigen Inkubation (37°C) wird das Peptid von den BMDCs aufgenommen und bindet an deren MHC Klasse I Rezeptoren. Im Anschluss wurden die BMDCs in BMDC-Medium gewaschen (427g, 4°C, 5min.) sowie die Zahl der lebenden Zellen bestimmt (3.5.1.). Pro Stimulationsansatz (200 μ l) wurden 1×10^4 BMDCs gelöst in BMDC-Medium (100 μ l) mit den angereicherten, CFSE-markierten CD8⁺ T-Zellen ($2,5 \times 10^4$ in 100 μ l BMDC-Medium) in 96-Well Rundbodenplatten kultiviert.

3.6.3. Stimulation von Lymphozyten

Zur Analyse des Einflusses von IL-15 oder IL-15R α auf die Produktion von IFN- γ durch Lymphozyten, erfolgte die Stimulation von den aus der Milz isolierten Lymphozyten mit PMA/Ionomycin. Diese Stimulation hat die maximale Aktivierung der Lymphozyten zur Folge. Brefeldin A verhindert die Sekretion von Zytokinen, was zur Anreicherung der gebildeten Zytokine innerhalb der Zelle führt. Aus den isolierten Lymphozyten wurden zwei Ansätze (je 5×10^6 Zellen) erstellt, von denen einer mit 10 μ g/ml Brefeldin A (Stimulationskontrolle) und der andere neben Brefeldin A zusätzlich mit 100ng/ml PMA und 10 μ M Ionomycin für 6 Stunden (37°C, 5% CO₂) inkubiert wurden.

3.7. Färbung und Fixierung der Zellen für durchflusszytometrische Analysen

3.7.1. Prinzip der Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie (FACS: *Fluorescence Activated Cell Sorting*) stellt eine Methode zur quantitativen und qualitativen Charakterisierung verschiedener Zellpopulationen dar. Mit dieser Methode können sowohl morphologische Kriterien wie Größe und Granularität der Zellen als auch die Expression spezifischer Proteine auf oder in den Zellen untersucht werden. Während der Messung passiert zu einem Zeitpunkt immer nur eine einzelne Zelle die Messzelle. In dieser Messzelle durchqueren die Zellen verschiedene Laserstrahlen mit unterschiedlichen Wellenlängen. Werden die an die Zellen gebundenen Fluorochrome von dem entsprechenden Laserstrahl angeregt, entsteht ein Signal, welches von dem Durchflusszytometer erfasst und visualisiert wird. In den für diese Arbeit durchgeführten Messungen wurde entweder an dem das FACS-Calibur (BD-biosciences) oder an dem

LSRII (BD-biosciences) durchgeführt. Für die Darstellung der durch die Durchflusszytometer erhaltenen Daten wurden die Programme flowjo und flowlogic verwendet.

3.7.2. Markierung der Zellen mit Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester

Die Markierung der aus den OTI-Mäusen angereicherten CD8⁺ T-Zellen mit Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester (CFSE) ermöglicht die Analyse der Anzahl der Zellteilung während der Kultur mit den mit OVA²⁵⁷⁻²⁶⁴ beladenen BMDCs. Das während der Färbung der Zellen aufgenommene fluoreszente CFSE wird bei der Zellteilung zur Hälfte an die neu gebildete Zelle weitergegeben, was sich bei der FACS-Analyse durch eine reduzierte Fluoreszenz bemerkbar macht [263]. Die Zellkonzentration der angereicherten CD8⁺ T-Zellen wurde in PBS auf 8×10^7 Zellen/ml eingestellt und mit dem gleichen Volumen einer 6 μ M CFSE-Lösung (in PBS) 6min. bei 18°C auf dem Reagenzglasschüttler inkubiert. Zum Abstoppen der Reaktion wurde die gleiche Menge kaltes, inaktiviertes FCS zugegeben und die Zellen mit BMDC-Medium gewaschen (427g, 4°C, 5min.). Die Qualität der CFSE-Markierung wurde direkt mittels FACS-Analyse (FACS-Calibur) kontrolliert. Für die Kultur mit den beladenen BMDCs wurden je Ansatz $2,5 \times 10^5$ CFSE markierte CD8⁺ T-Zellen (in 100 μ l BMDC-Medium) eingesetzt. Nach 72-stündiger Inkubation bei 37°C und 5% CO₂ wurden die Zellen mit PI und einem CD8⁺ T-Zellen markierenden Antikörper gefärbt und einer durchflusszytometrischen Analyse (FACS-Calibur) unterzogen. Abbildung 12 zeigt die Kontrolle der CFSE-Markierung der lebenden CD8⁺ T-Zellen.

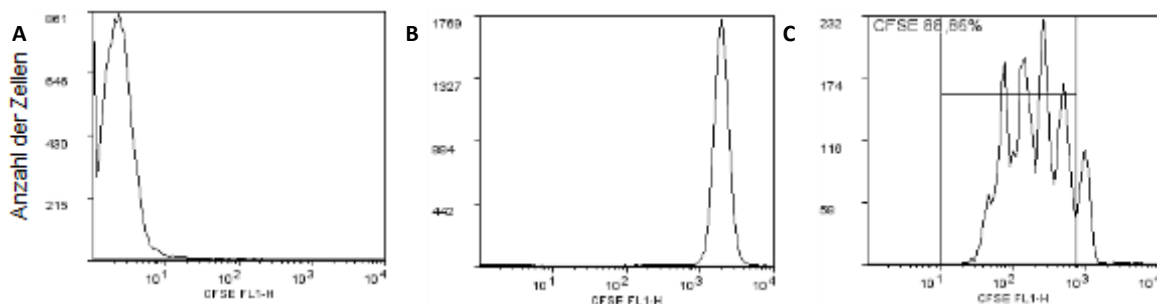


Abb. 12: Kontrolle der CFSE-Markierung der CD8⁺ T-Zellen. A: Nicht markierte CD8⁺ T-Zellen. B: CFSE-markierte CD8⁺ T-Zellen. C: Verdünnung der CFSE-Markierung durch die Proliferation von CD8⁺ T-Zellen.

In Bild A und B ist der bei der FACS-Messung durch die CFSE-Markierung entstandene deutliche Unterschied zu den nicht markierten CD8⁺ T-Zellen dargestellt. In Bild C sind CFSE-markierte, CD8⁺ T-Zellen nach der 72 stündigen Kultur mit den beladenen BMDCs zu sehen. Hier zeigen die durch die Verdünnung der CFSE-Markierung entstandenen Peaks die Anzahl der durchlaufenen Zellteilungen der CD8⁺ T-Zellen an. Hierbei ist anzumerken, dass je größer ein Peak ist, desto mehr CD8⁺ T-Zellen befinden sich auf dieser Stufe der Zellteilung erreicht.

3.7.3. Kontrollen für die FACS-Färbung

Um die Spezifität der Färbung zu prüfen und um sicher festzustellen, dass die detektierten Signale tatsächlich aus der Bindung der markierten Antikörper resultieren und nicht durch unspezifische Signale der anderen Antikörper zustande kommen, wurden sogenannte *fluorescence minus one* (FMO)-Kontrollen angefertigt. Bei der Färbung der Kontrollen wurde jeweils ein Antikörper weggelassen („minus one“). Anhand der FMO-Kontrollen konnte damit der Einfluss eines spezifischen Fluorochroms auf die anderen in der Färbung verwendeten Fluorochrome analysiert werden. Als zusätzliche Kontrolle zur Detektion der Autofluoreszenz der Zellen wurde bei allen Experimenten eine Probe mit ungefärbten Zellen gemessen.

3.7.4. CD16/32 (Fc-block)

Der monoklonale CD16/32-spezifische Antikörper bindet an die Fc-Rezeptoren der Zellen und verhindert somit die unspezifische Bindung der später eingesetzten Antikörper. Vor der eigentlichen Färbung mit den Antikörpern wurden die Zellen in FACS-Puffer mit 10µg/ml CD16/CD32-spezifischen Antikörpern für 10 min. bei 4°C im Dunkeln inkubiert.

3.7.5. Oberflächenfärbung

Die Oberflächenfärbung der Zellen erfolgte in bei allen Experimenten FACS-Puffer. Die Färbungen wurden sowohl mit bereits konjugierten monoklonalen Antikörpern als auch mit biotinylierten Antikörpern und markierten Streptavidin, durchgeführt. Hierbei wurden die Antikörper in ihrer zuvor bestimmten optimalen Konzentration eingesetzt und für 20 min. bei 4°C im Dunkeln inkubiert und anschließend mit FACS-Puffer gewaschen (427g, 4°C, 5min.). Die biotinylierten Antikörper wurden zusätzlich mit dem Streptavidin für weitere 20 min. inkubiert und in FACS-Puffer gewaschen (427g, 4°C, 5min).

3.7.6. Lebend- / Tod-Färbung

Tote Zellen können Antikörper unspezifisch binden, was zu falsch positiven Ergebnissen bei der durchflusszytometrischen Analyse führen kann. Aus diesem Grund wurden in allen Versuchen die toten Zellen mit Hilfe von zwei unterschiedlichen Farbstoffen aus der Analyse entfernt.

3.7.6.1. Propidiumiodid (PI)

Propidiumiodid (PI) gelangt durch die nicht intakte Zellmembran bei toten Zellen in das Innere der Zelle, wo es die DNA anfärbt. Die Membran von lebenden Zellen kann PI nicht durchdringen, weshalb diese Zellen nicht angefärbt werden. Um die Zellviabilität bei der Messung mit dem FACS-Calibur (BD bioscience) zu bestimmen, erfolgte die Färbung der Zellen mit PI, dessen Fluoreszenz-Signal im FL3-Kanal detektiert wurde. Zur Färbung der Zellen mit PI wurde kurz vor der Messung 1µg/ml PI (in FACS-Puffer) zu den Proben gegeben, die Proben zentrifugiert (300g, 4°C, 5min.) und in FACS-Puffer resuspendiert.

3.7.6.2. Live/dead Färbung

Bei Messungen, die mit dem LSRII (BD bioscience) durchgeführt wurden, erfolgte die Exklusion der toten Zellen anhand des *LIVE/DEAD Fixable Blue Dead Cell Stain Kit* (Life technologies). Der reaktive Farbstoff ist in der Lage die Zellmembran nekrotischer Zellen zu überqueren und mit freien Aminen sowohl im Inneren der Zelle als auch auf der Zelloberfläche zu reagieren, was zu einer stark fluoreszierenden Färbung der Zelle führt [264]. Bei lebendigen Zellen kann der Farbstoff nur an die auf der Zelloberfläche vorhandenen Aminogruppen binden, was zu einer um das Vielfache schwächeren Intensität der Fluoreszenz führt. Die Färbung erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Nach einer Inkubationszeit von 10 min. bei 4°C wurde die Färbung durch einen Waschschrift (427g, 4°C, 5min.) beendet.

3.7.7. Fixierung der Zellen und anschließende intrazelluläre Färbung

Um die Messung der gefärbten Zellen zu einem späteren Zeitpunkt zu ermöglichen, wurden die Zellen, nach der extrazellulären- und der Lebend-Tot-Färbung mit dem IC-fixation Buffer (ebioscience) fixiert. Hierfür wurden die Proben mit je 50µl des Fixierungspuffers für 10min. bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem Waschschrift (300g, 4°C, 5min.) wurden die Zellen entweder bis zur Messung bei 4°C im Dunkeln gelagert oder intrazellulär gefärbt. Die intrazelluläre Färbung von Zellen ermöglicht die

Detektion der gebildeten Zytokine. Für die intrazelluläre Färbung wurden die Zellen für 10 min. bei 4°C in Permeabilisierungspuffer (ebioscience) inkubiert, welcher die Permeabilisierung der Zellmembran ermöglicht. Diese Permeabilisierung ist reversibel, weshalb der Permeabilisierungspuffer bei allen Schritten der intrazellulären Färbung anwesend sein muss. Die entsprechenden Antikörper wurden in einer Konzentration von 2µg/ml in Permeabilisierungspuffer eingesetzt und für 20min., bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Nach einem Waschschrift (427g, 4°C, 5min.) mit FACS-Puffer wurden die Zellen bis zur Messung am LSRII bei 4°C im Dunkeln gelagert.

3.8. Messung der Zytokine in Zellkulturüberständen

Enzyme-linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) ist ein auf Antikörper basierendes Nachweisverfahren. Um die Zytokinproduktion messen zu können, wurden die Zellkulturüberstände entnommen und bei -20°C gelagert. Die Durchführung der ELISA-Experimente erfolgte mit dem Kit DuoSet ELISA Development System (R&D Systems) nach der Anleitung des Herstellers. Alle Waschschrift wurden mit 0,05% Tween 20 in PBS in ELISA-Wascher (Tecan hydrospeed) durchgeführt. Die ELISA-Platten wurden mit 4µg/ml (IFN-γ) oder 1µg/ml (IL-2) *capture* Antikörper in PBS über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem Waschschrift erfolgte die Blockierung der unspezifischen Bindungen durch die Inkubation mit 1% *Bovine Serum Albumin* (BSA) in PBS (1h, RT). Die Proben und Standards (2000pg/ml für IFN-γ und 1000pg/ml für IL-2 in 1% BSA-Lösung) wurden in einer separaten 96-Well Flachbodenplatte verdünnt, in die mit dem *capture* Antibody inkubierten Platten überführt und für 2h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift folgte eine Inkubation mit 50µl *detection Antibody* (800ng/ml (IFN-γ) und 400ng/ml (IL-2) in 1% BSA Lösung pro Well) für weitere 2h bei Raumtemperatur. Nach dem erneuten Waschen der Proben wurde Streptavidin-horseradish-peroxidase (HRP) zugegeben und für 20 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Streptavidin-HRP bindet an den biotinylierten *detection Antibody*, was die Detektion des Antikörpers während der Messung ermöglicht. Nach der Inkubation wurden die Platten erneut gewaschen und bei Raumtemperatur mit 50µl Substratlösung je Well inkubiert. Das in der Substratlösung enthaltene Tetramethylbenzidin wird umgesetzt, wodurch eine blaue Färbung entsteht, welche ihr Absorptionsmaximum bei 650 nm hat. Die Zugabe von 1M H₂SO₄ nach 15 min Reaktionszeit stoppt die Reaktion und führt zu einer lichtempfindlichen gelblichen Färbung des Tetramethylbenzidins, welche bei 450nm detektiert werden kann. Anschließend erfolgte die Messung der Optischen Dichte (OD) bei 450nm sowie eine Referenzmessung bei 650nm unter Verwendung des Spektrofotometers (Tecan). Zusätzlich erfolgte eine Messung bei 650nm, da der entstandene Farbstoff hier keine Absorbtien zeigt. Die Extinktion dieser Refferenzmessung wurde von den Werten der bei 450nm gemessenen Proben subtrahiert. Anhand der OD der Standardverdünnung erfolgte die Berechnung der Zytokinkonzentration anhand der linearen Regression.

3.9. Statistik

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe der GraphPad Prism 5 Software für Datenanalyse. In den Abbildungen sind die geometrischen Mittel, oder die erhaltenen Werte, deren Mittelwerte und bei einem Teil der Experimente zusätzlich die Standardabweichungen gezeigt. Für die statistische Auswertung wurden der *One Way Analysis of Variance* (one way ANOVA) mit anschließendem Tukey-Test als Post-hoc-Test und der Kruskal Wallis-Test verwendet. In allen Experimenten erfolgte die Berechnung der signifikanten Unterschiede zu IL-15KO.

In den IL-15R α KO Tieren erfolgte zudem die Berechnung der Signifikanz zu KIN 71. Bei der Berechnung der Signifikanzen gilt: *($p \leq 0.05$), **($p \leq 0.01$), ***($p \leq 0.001$).

4. Ergebnisse

4.1. Vergleich der relativen Expression von CD11c und IL-15 in den genetisch modifizierten Tieren

Die Expression von IL-15 erfolgt hauptsächlich durch DCs, Monozyten, Nervenzellen und Stromazellen des Knochenmarks. Die in dieser Arbeit verwendeten IL-15 transgenen Stämme wurden so generiert, dass in diesen Tieren die Expression von IL-15 ausschließlich durch CD11c⁺-Zellen erfolgt. Die Expression von CD11c und IL-15 in der Milz wurde anhand der qRT-PCR untersucht. Da die Bildung von IL-15 in den IL-15 transgenen Stämmen durch CD11c⁺ Zellen erfolgt, wurde vorerst analysiert, ob die Stämme unterschiedliche Mengen mRNA für CD11c exprimieren. Die relative Expression von CD11c ist in Abbildung 13 graphisch dargestellt.

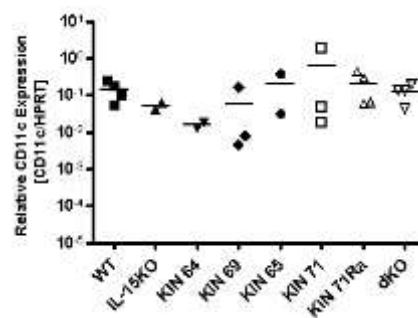


Abb. 13: Expression von CD11c RNA in der Milz der IL-15 CD11c Tiere. Die Expression von CD11c in der Milz wurde mittels qRT-PCR analysiert. n = 2-4.

In WT, IL-15KO, KIN 64, KIN 69, KIN 65, KIN 71 sowie dKO sind keine wesentlichen Unterschiede in der Expression von CD11c⁺ Zellen erkennbar, was darauf schließen lässt, dass der Anteil an CD11c⁺ Zellen in den Stämmen vergleichbar ist und keine Abhängigkeit zu IL-15 oder IL-15R α zeigt.

Anschließend wurde die relative Expression von IL-15 in den verwendeten Stämmen analysiert, was in Abbildung 14 dargestellt wird.

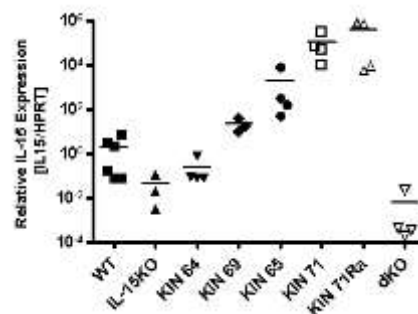


Abb. 14: Expression von IL-15 in den modifizierten Stämmen. Die Expression von IL-15 in der Milz wurde mittels qRT-PCR analysiert. n = 3-6.

Bei den IL-15KO und den dKO Tieren, verglichen zu den WT Tieren, ist die relative Expression von IL-15 reduziert. Aufgrund der genetischen Modifikation ist die Expression in IL-15KO und dKO nicht möglich. Von KIN 64 über KIN 69, KIN 65 und KIN 71 kommt es zu einem Anstieg der relativen IL-15 Expression, wobei der höchste Wert bei KIN 71 vorkommt. Die relative Expression von IL-15 ist in KIN 71 und KIN 71R α vergleichbar.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass die relative Expression von CD11c in den untersuchten Stämmen vergleichbar ist. Die relative Expression von IL-15 ist in KIN69, KIN 65, KIN 71 und KIN 71R α zum WT deutlich erhöht.

4.2. Charakterisierung von *in vitro* kultivierten *Bone Marrow Dendritic Cells*

Die Differenzierung von CD8⁺ T-Zellen wird von DCs reguliert, was diese stark abhängig von dem Einfluss der DCs macht. Aus diesem Grund wurde untersucht, ob die variierenden Mengen von IL-15 in den genetisch modifizierten KIN-Stämmen, oder die Abwesenheit des IL-15R α , intrinsische oder modulatorische Effekte auf *in vitro* kultivierte DCs aus den Knochenmark (BMDCs) haben. Hierfür wurden die Zellen aus dem Knochenmark isoliert und 7 Tage *in vitro* kultiviert. Nach 6 Tagen in Kultur erfolgte in der Hälfte der Proben die Stimulation der BMDCs mit LPS, was die Produktion von IL-15 durch die BMDCs verstärkt. An Tag 7 wurden die BMDCs gelöst und für die FACS-Analyse vorbereitet. Im Zuge der FACS-Analyse erfolgt der Ausschluss der toten Zellen mit Hilfe der Propidiumiodid-Färbung. Die verbliebenen lebenden Zellen konnten anhand ihrer CD11b⁺CD11c⁺ doppelpositiven Färbung als BMDCs bestimmt werden. Die so erhaltene Population diente als Grundlage für die Analyse der Expression verschiedener kostimulatorischer Moleküle auf der Zellmembran von BMDCs in Abhängigkeit zu IL-15/IL-15R α .

4.2.1. Charakterisierung des Einflusses von IL-15 auf *in vitro* kultivierte *Bone Marrow Dendritic Cells*

Um den Einfluss von IL-15 auf die kultivierten BMDCs charakterisieren zu können, wurden die geometrischen Mittel ausgewählter kostimulatorischer Moleküle der CD11b⁺CD11c⁺-BMDCs untersucht. Die auf den BMDCs exprimierten MHC Klasse I und II Moleküle sind essentiell für die Aktivierung von CD8⁺ und CD4⁺ T-Lymphozyten. Im Folgenden ist die Expression dieser Moleküle in Anhängigkeit von IL-15 dargestellt.

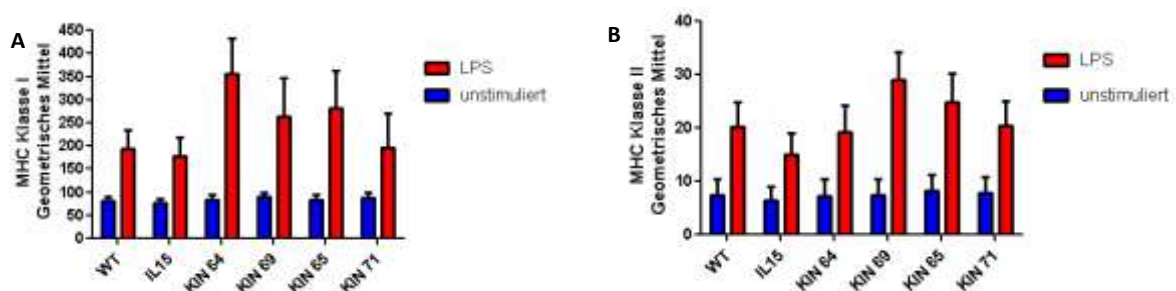


Abb. 15: Effekt von IL-15 auf die Expression der MHC Moleküle von BMDCs. A: Geometrische Mittel der Expression der MHC Klasse I Moleküle von stimulierten/nicht stimulierten BMDCs. B: Geometrische Mittel der Expression der MHC Klasse II Moleküle von stimulierten/nicht stimulierten BMDCs. Die Zellen aus dem Knochenmark wurden für 7 Tage in Anwesenheit von GM-CSF stimuliert. Am Tag 6 erfolgte bei einem Teil der Zellen die Stimulation mit LPS. Gezeigt sind die berechneten Mittelwerte sowie die Standardabweichung. Die Berechnung der Signifikanzen erfolgte mittels one way ANOVA mit anschließendem Tukey-Test. n = 4-10.

Die Expression der MHC Klasse I und II Moleküle wird bei nicht stimulierten BMDCs von der Anwesenheit von IL-15 nicht beeinflusst. Die Stimulation der BMDCs mit LPS hat in allen Stämmen mindestens eine Verdopplung der geometrischen Mittel der Expression der MHC-Klasse I und II Moleküle zur Folge. Bei der Expression der MHC Klasse I Moleküle sind die geometrischen Mittel von WT, IL-15KO und KIN 71 vergleichbar. Dies gilt ebenfalls für KIN 69 und KIN 65. Bei KIN 64 ist das stimulationsbedingte geometrische Mittel der MHC Klasse I Expression am größten. Obwohl sich die geometrischen Mittel der Expression von MHC Klasse I Molekülen durch BMDCs in Abhängigkeit zu IL-15 optisch differenzieren, bestehen aufgrund der Abweichungen der Werte keine signifikanten Differenzen. Bei der Expression der MHC Klasse II Moleküle sind die geometrischen Mittel von WT, IL-15KO, KIN 64 und KIN 71 vergleichbar. Bei KIN 69 und KIN 65 kommt es zu einem minimalen Anstieg des geometrischen Mittels, was aber auch hier zu keinen signifikanten Differenzen bei der Expression der MHC Klasse II Moleküle führt.

Zur effektiven Aktivierung von T-Zellen durch BMDCs wird neben dem antigen-spezifischen TCR ein zusätzlicher Rezeptor benötigt (CD28). Dieser bindet an die auf den DCs vorhandenen kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86, welche Repräsentanten der B7-Familie sind [246]. Ob IL-15 einen Effekt auf diese kostimulatorischen Moleküle der BMDCs hat wird in Abbildung 16 gezeigt.

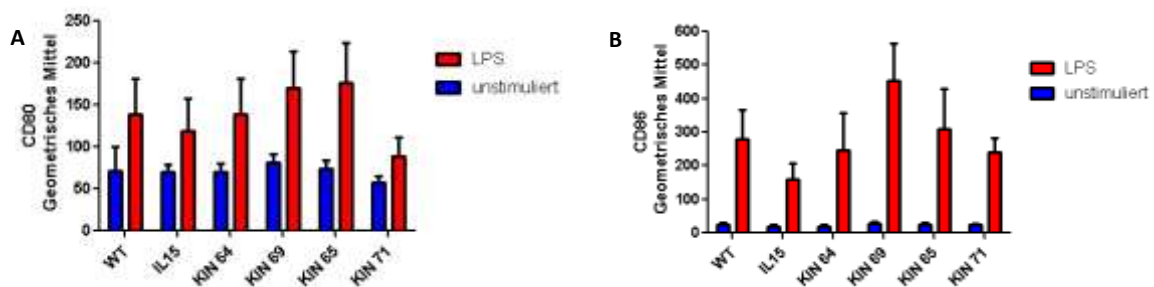


Abb. 16: Einfluss von IL-15 auf die Expression von CD80 und CD86 Molekülen von BMDCs. **A:** Geometrisches Mittel der Expression von CD80 von stimulierten/nicht stimulierten BMDCs. **B:** Geometrisches Mittel der CD86 Expression von stimulierten/nicht stimulierten BMDCs. Die Zellen aus dem Knochenmark wurden für 7 Tage in Anwesenheit von GM-CSF stimuliert. Am Tag 6 erfolgte bei einem Teil der Zellen die Stimulation mit LPS. Gezeigt sind die berechneten Mittelwerte sowie die Standardabweichung. Die Berechnung der Signifikanzen erfolgte mittels one way ANOVA mit anschließendem Tukey-Test. $n = 4-10$.

Die geometrischen Mittel der Expression der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 werden bei nicht stimulierten BMDCs ebenfalls nicht von der Anwesenheit von IL-15 beeinflusst. Die Stimulation der BMDCs mit LPS führt auch bei den kostimulatorischen Molekülen CD80 und CD86 zu einer verstärkten Expression. Bei den mit LPS stimulierten BMDCs sind die geometrischen Mittel der CD80 Expression von WT, IL-15KO und KIN 64 vergleichbar. Die mittlere CD80 Expression in KIN 69 und KIN 65 liegt ebenfalls auf einer Ebene. Bei KIN 71 ist die Expression von CD80, verglichen zu den anderen Stämmen, reduziert. Die Expression von CD86 ist bei WT, KIN 64 und KIN 71 vergleichbar. Bei KIN 65 und KIN 69 hingegen ist die Expression von CD86 erhöht, unter Abwesenheit von IL-15 (IL-15KO) wiederum reduziert.

Neben der Stimulation der Produktion inflammatorische Zytokine und Chemokine von DCs dient CD40 als Aktivierungssignal bei der antigenspezifischen Aktivierung naiver B-Lymphozyten [265]. Zudem ist CD40 in der Lage sowohl die Expression von MHC Klasse I und II Molekülen als auch von den kostimulatorischen Molekülen CD80 und CD86 zu beeinflussen [265].

Neben CD40 spielt auch CD252 eine weitere entscheidende Rolle für die qualitative Aktivierung von T-Lymphozyten durch DCs [270]. Aus diesem Grund erfolgt in Abbildung 17 die Analyse des Einflusses von IL-15 auf die Expression von CD40 und CD252 durch BMDCs.

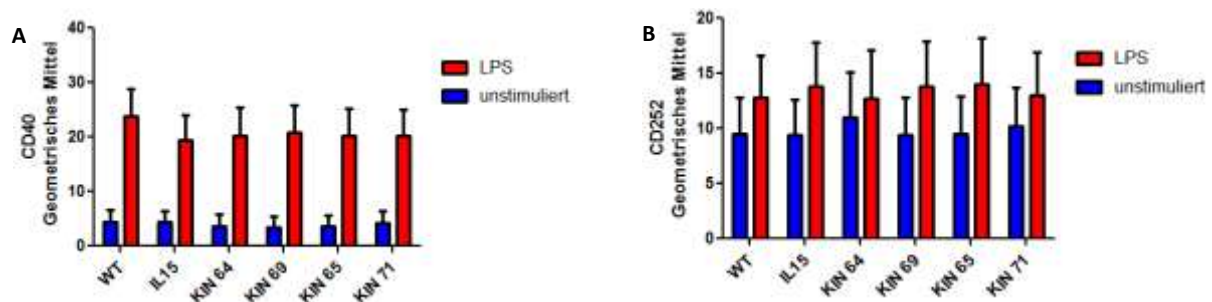


Abb. 17: IL-15 bedingter Effekt auf die Expression von CD40 und CD252 Molekülen von BMDCs. **A:** Geometrisches Mittel der CD40 Expression. **B:** Geometrisches Mittel der Expression von CD252. Die Zellen aus dem Knochenmark wurden für 7 Tage in Anwesenheit von GM-CSF stimuliert. Am Tag 6 erfolgte bei einem Teil der Zellen die Stimulation mit LPS. Gezeigt sind die berechneten Mittelwerte sowie die Standardabweichung. Die Berechnung der Signifikanzen erfolgte mittels one way ANOVA mit anschließendem Tukey-Test. $n = 4-10$.

Bei den nicht stimulierten BMDCs werden weder bei den geometrischen Mitteln der Expression von CD40 noch von CD252 IL-15 abhängige Differenzen erkennbar. Im Falle der Expression von CD40 bewirkt die Stimulation mit LPS einen starken Anstieg der geometrischen Mittel. Auch nach der Stimulation ist hier kein durch die Anwesenheit von IL-15 verursachter Einfluss erkennbar. Bei der Expression von CD252 bewirkt die Stimulation der BMDCs mit LPS im Vergleich zu den nicht stimulierten Zellen nur einen schwachen Anstieg. Auch hier können keine durch die Anwesenheit von IL-15 bedingten Effekte detektiert werden.

Aktivierte DCs exprimieren das kostimulatorische Molekül CD70, welches auf spezifische, auf T-Zellen exprimierte, Moleküle bindet (CD27). Diese Bindung ermöglicht sowohl die primäre als auch die sekundäre Antwort der CD8⁺ T-Zellen [266]. In Abbildung 18 ist der Effekt von IL-15 auf die Expression dieser Moleküle zu sehen.

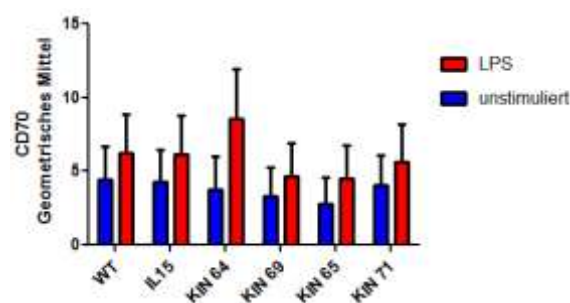


Abb. 18: IL-15 bedingter Einfluss auf die Expression von CD70 Molekülen durch BMDCs. Geometrisches Mittel der Expression von CD70. Die Zellen aus dem Knochenmark wurden für 7 Tage in Anwesenheit von GM-CSF stimuliert. Am Tag 6 erfolgte bei einem Teil der Zellen die Stimulation mit LPS. Gezeigt sind die berechneten Mittelwerte sowie die Standardabweichung. Die Berechnung der Signifikanzen erfolgte mittels one way ANOVA mit anschließendem Tukey-Test. $n = 4-10$.

Die Stimulation der DCs mit LPS hat eine Erhöhung der Expression von CD70 zur Folge, welche bei KIN 64 am größten ausfällt. Bei WT und IL-15KO ist die stimulationsbedingte Erhöhung des geometrischen Mittels vergleichbar. Ebenso zeigen KIN 69, KIN 65 und KIN 71 einen vergleichbaren Anstieg der Expression von CD70.

4.2.2. Charakterisierung der IL-15R α abhängigen Aktivierung von *Bone Marrow Dendritic Cells*

Neben dem direkten Effekt der Präsenz von IL-15 erfolgte ebenfalls die Analyse des Einflusses der Transpräsentation auf die kostimulatorischen Moleküle. Hierfür wurden IL-15R α defiziente Mäuse untersucht, bei denen der für die Transpräsentation essentielle IL-15R α fehlt (IL-15R α KO, KIN 71R α , dKO). Um den Einfluss des Rezeptors zu visualisieren, werden die bereits gezeigten Stämme WT, IL-15KO und KIN 71 in den Grafiken nochmals dargestellt.

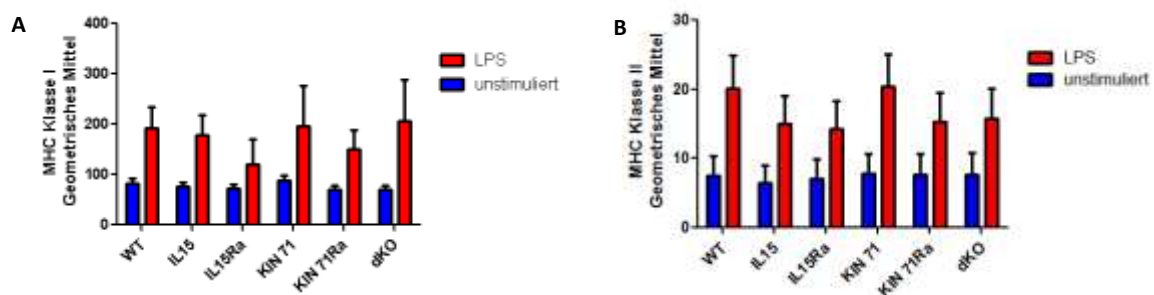


Abb. 19: Einfluss von IL-15R α auf die Expression von MHC Moleküle von BMDCs. **A:** Geometrische Mittel der Expression der MHC Klasse I Moleküle von stimulierten/nicht stimulierten BMDCs. **B:** Geometrische Mittel der Expression der MHC Klasse II Moleküle von stimulierten/nicht stimulierten BMDCs. Die Zellen aus dem Knochenmark wurden für 7 Tage in Anwesenheit von GM-CSF stimuliert. Am Tag 6 erfolgte bei einem Teil der Zellen die Stimulation mit LPS. Gezeigt sind die berechneten Mittelwerte sowie die Standardabweichung. Die Berechnung der Signifikanzen erfolgte mittels one way ANOVA mit anschließendem Tukey-Test. $n = 4-10$.

Im Falle der nicht stimulierten BMDCs ist weder bei der Expression von MHC Klasse I als auch MHC Klasse II Molekülen ein durch die Anwesenheit des IL-15R α bedingte Änderung des geometrischen Mittels erkennbar. Die Stimulation der BMDCs mit LPS hat verglichen zu den nicht stimulierten Zellen eine Reduktion der MHC Klasse I Expression sowohl bei IL-15R α KO als auch bei KIN 71R α zur Folge. Bei dKO hingegen ist diese vergleichbar mit KIN 71. Die geometrischen Mittel der Expression der MHC Klasse II Moleküle von IL-15R α KO, KIN 71R α und dKO sind vergleichbar mit denen bei IL-15KO. Die Abwesenheit des Rezeptor α führt weder bei der Expression der MHC Klasse I noch bei der der MHC Klasse II Moleküle zu signifikanten Differenzen.

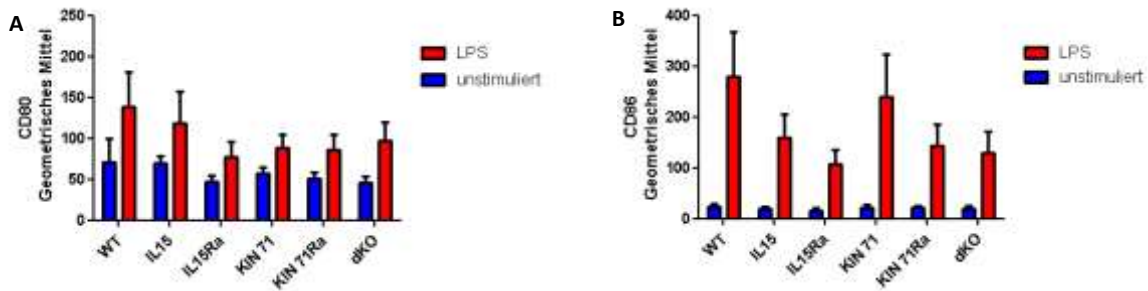


Abb. 20: Effekt von IL-15R α auf die Expression von CD80 und CD86 Molekülen auf BMDCs. **A:** Geometrisches Mittel der Expression von CD80 von stimulierten/nicht stimulierten BMDCs. **B:** Geometrisches Mittel der Expression von CD86 von stimulierten/nicht stimulierten BMDCs. Die Zellen aus dem Knochenmark wurden für 7 Tage in Anwesenheit von GMCSF stimuliert. Am Tag 6 erfolgte bei einem Teil der Zellen die Stimulation mit LPS. Gezeigt sind die berechneten Mittelwerte sowie die Standardabweichung. Die Berechnung der Signifikanzen erfolgte mittels one way ANOVA mit anschließendem Tukey-Test. $n=4-10$.

Die Expression von CD80 Molekülen auf BMDCs von IL-15R α defizienten Mäusen wird durch die Stimulation mit LPS ebenfalls positiv beeinflusst. Zudem sind die Mittel aller Stämme, denen IL-15R α fehlt (IL-15R α KO, KIN 71R α und dKO) vergleichbar mit denen von KIN 71. Die Expression des kostimulatorischen Moleküls CD86 ist in den Stämmen ohne IL-15R α durch die LPS-Stimulation ebenfalls erhöht, dies allerdings in einem geringeren Maß als bei IL-15KO. Die Abwesenheit von IL-15R α hat bei den geometrischen Mitteln der Expression von CD80 und CD86 keine signifikanten Effekte.

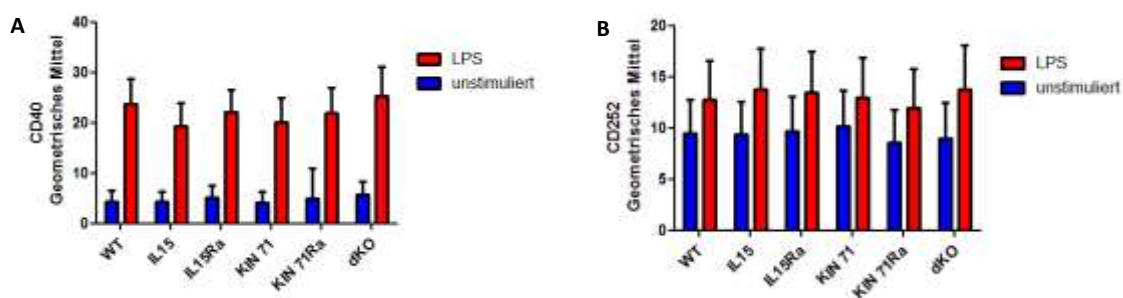


Abb. 21: Effekt von IL-15R α auf die Expression von CD40 und CD252 auf BMDCs. **A:** Geometrisches Mittel der Expression von CD40 von stimulierten/nicht stimulierten BMDCs. **B:** Geometrisches Mittel der Expression von CD252 von stimulierten/nicht stimulierten BMDCs. Die Zellen aus dem Knochenmark wurden für 7 Tage in Anwesenheit von GMCSF stimuliert. Am Tag 6 erfolgte bei einem Teil der Zellen die Stimulation mit LPS. Gezeigt sind die berechneten Mittelwerte sowie die Standardabweichung. Die Berechnung der Signifikanzen erfolgte mittels one way ANOVA mit anschließendem Tukey-Test. $n = 4-10$.

Bei den nicht stimulierten BMDCs sind die geometrischen Mittel der Expression von CD40 und CD252 unabhängig von IL-15R α in allen Stämmen vergleichbar. Durch die Stimulation mit LPS erhöhen sich die geometrischen Mittel beider kostimulatorischer Oberflächenmoleküle ebenfalls unabhängig von IL-15R α , wobei die Stimulation die Expression von CD40 einen stärker positiv beeinflusst wird als die von CD252.

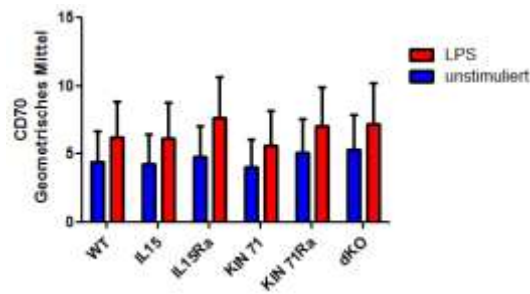


Abb. 22: Effekt von IL-15R α auf die CD70 Expression von BMDCs. Geometrisches Mittel der Expression von CD70. Die Zellen aus dem Knochenmark wurden für 7 Tage in Anwesenheit von GM-CSF stimuliert. Am Tag 6 erfolgte bei einem Teil der Zellen die Stimulation mit LPS. Gezeigt sind die berechneten Mittelwerte sowie die Standardabweichung. Die Berechnung der Signifikanzen erfolgte mittels one way ANOVA mit anschließendem Tukey-Test. $n = 4-10$.

Die Expression von CD70 Molekülen zeigt bei nicht stimulierten BMDCs keine Differenzen in den IL-15R α defizienten Mäusen. Die Stimulation der BMDCs mit LPS führt auch bei der Expression von CD70 Molekülen zu einer schwachen Erhöhung, welche vergleichbar mit der von WT, IL-15 KO und KIN 71 ist.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Expression der in dieser Arbeit untersuchten kostimulatorischen Moleküle auf nicht stimulierten BMDCs unabhängig von IL-15 und von IL-15R α verläuft. Die LPS-Stimulation der BMDCs hat eine erhöhte Expression aller untersuchten kostimulatorischen Moleküle zur Folge, wobei dieser Effekt am deutlichsten bei CD86 und am wenigsten bei CD70 und CD252 ausgeprägt ist. Bei der Expression der kostimulatorischen Moleküle CD40 und CD252 ist kein Einfluss von IL-15 oder IL-15R α erkennbar. Bei der Expression von CD80, CD86, CD70 sowie den MHC Klasse I und II Molekülen hat die Anwesenheit von geringen Mengen von IL-15 (KIN 64, KIN 69 und KIN 65) einen leicht stimulierenden, jedoch nicht signifikanten Effekt auf die geometrischen Mittel. Die Expression von CD70 Molekülen auf BMDCs ist unbeeinflusst von der Abwesenheit von IL-15 und IL-15R α . Bei MHC Klasse I und II, CD80 sowie CD86 Molekülen führt das Fehlen des IL-15R α zu einer nicht signifikant reduzierten Expression.

4.3. Effekt von IL-15 auf die antigenabhängige Stimulation von CD8⁺ T-Zellen

CD8⁺ T-Zellen werden in Ihrer Funktion stark von IL-15 beeinflusst. Die Produktion von IL-15 wiederum erfolgt stimulusabhängig durch DCs. Die in diesem Kapitel der vorliegenden Arbeit dargestellten Experimente wurden durchgeführt um zu untersuchen, ob in einem *in vitro* Modell das von den BMDCs produzierte IL-15, oder die genetischen Unterschiede in den verwendeten Mausstämmen in Bezug auf die IL-15 Produktion, die Fähigkeit besitzen, die Proliferation oder das Überleben von CD8⁺ T-Zellen zu beeinflussen. Hierfür wurde als Modellsystem die Proliferation von transgenen OVA²⁵⁷⁻²⁶⁴-spezifischen (OTI) CD8⁺ T-Zellen herangezogen. In dem ersten Teil der Experimente wurden die zuvor 7 Tage lang kultivierten BMDCs mit OVA²⁵⁷⁻²⁶⁴-Peptid beladen und mit den angereicherten, CFSE-markierten CD8⁺ T-Zellen der OTI Tiere kokultiviert. Als negative Kontrolle dienten nicht beladene BMDCs, welche ebenfalls mit den angereicherten CD8⁺ T-Zellen kokultiviert wurden. Das Überleben der CD8⁺ T-Zellen wurde durch die Färbung mit Propidiumiodid analysiert. Die Proliferation der CD8⁺ T-Zellen wurde mit Hilfe der CFSE-Verdünnung gemessen. In dem zweiten Teil dieser Experimente wurden die BMDCs vor der Beladung mit dem Peptid über Nacht mit LPS stimuliert. Ziel dieser Stimulation war es, die Produktion von IL-15 durch die BMDCs zu verstärken.

In der folgenden Abbildung ist repräsentativ die Gating-Strategie für die an dem FACS-Calibur durchgeführte FACS-Analyse sowohl an stimulierten als auch an nicht stimulierten Zellen dargestellt.

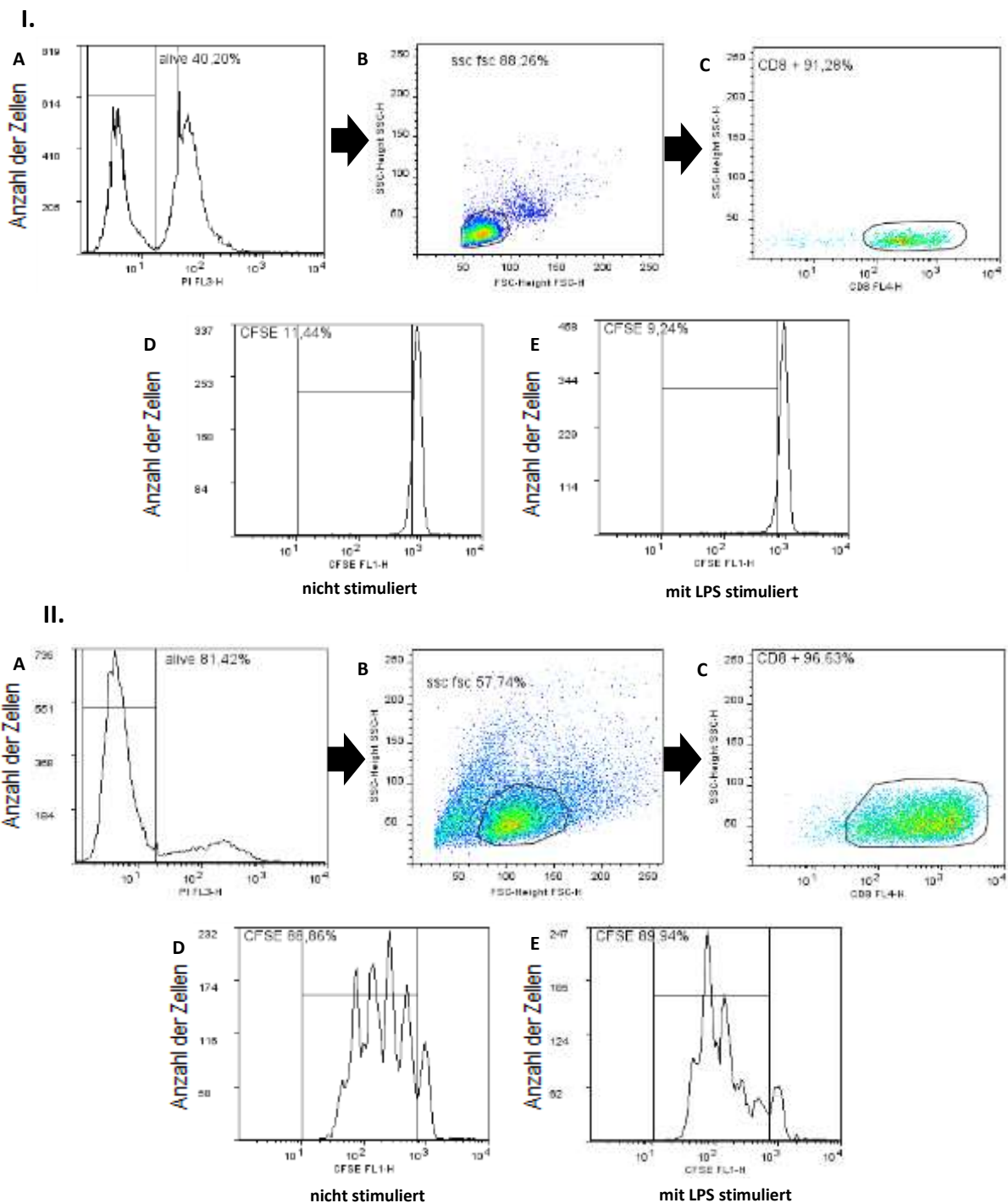


Abb. 23: Repräsentative Gating-Strategie für die FACS-Analyse der Proliferation von CD8⁺ T-Zellen. I. Gating-Strategie für die Analyse der Proliferation durch nicht beladenen BMDCs (negative Kontrolle). II. Gating-Strategie für die Analyse der Proliferation durch mit OVA²⁵⁷⁻²⁶⁴-Peptid beladene BMDCs. A: Ausschluss der toten Zellen durch die Färbung mit PI. B: Bestimmung der lymphoiden Zellen mit Hilfe des ssc-fsc Gates. C: Selektion der CD8⁺ T-Zellen für die weitere Analyse. D: Analyse der CFSE-Verdünnung in der Kultur mit nicht mit LPS stimulierten BMDCs. E: Analyse der CFSE-Verdünnung in der Kultur mit LPS stimulierten BMDCs.

Um falsch positive Ereignisse ausschließen zu können, wurden die toten Zellen durch die Färbung mit PI aus der Analyse ausgeschlossen. Als nächstes wurden die lymphoiden Zellen anhand ihrer Größe und Granularität mit Hilfe des ssc-fsc-Gates identifiziert. In den Kulturen mit den mit OVA²⁵⁷⁻²⁶⁴-Peptid beladenen BMDCs ist die Größe sowie Granularität der CD8⁺ T-Zellen verändert, sodass das Gate hier angepasst werden musste. Aufgrund der so entstandenen unterschiedlichen Gatings ist ein Vergleich der Zellen nur bedingt möglich. Die vorherige Stimulation der BMDCs mit LPS hat keine Auswirkungen auf die Größe und Granularität der CD8⁺ T-Zellen. Aus den lymphoiden Zellen wurden die CD8⁺ T-Zellen selektiert sowie deren CFSE-Färbung analysiert. Wie in Punkt I. der Abbildung 23 erkennbar, nimmt die CFSE-Fluoreszenz der CD8⁺ T-Zellen der OTI-Tiere ohne das TCR-spezifische Signal des OVA²⁵⁷⁻²⁶⁴-Peptids kaum ab. Durch die Beladung der BMDCs mit dem OVA²⁵⁷⁻²⁶⁴-Peptid induzieren diese eine starke Proliferation der CD8⁺ T-Zellen. Die vorherige Stimulation der BMDCs mit LPS hat kaum Einfluss auf die prozentuale Erhöhung der Proliferation der CD8⁺ T-Zellen, jedoch proliferieren diese viel schneller, was daran zu erkennen ist, dass zum Zeitpunkt der Messung ein größerer Anteil der Zellen 4 Zellteilungen durchlaufen hat.

4.3.1. Einfluss von IL-15 auf die antigenabhängigen Effekte von *Bone Marrow Dendritic Cells* auf CD8⁺ T-Zellen

Zur Analyse der IL-15 abhängigen Beeinflussbarkeit der antigenabhängigen Effekte von BMDCs auf CD8⁺ T-Lymphozyten wurden die CD8⁺ T-Lymphozyten wie zuvor beschrieben festgelegt und die CFSE-Verdünnung dieser Zellen analysiert.

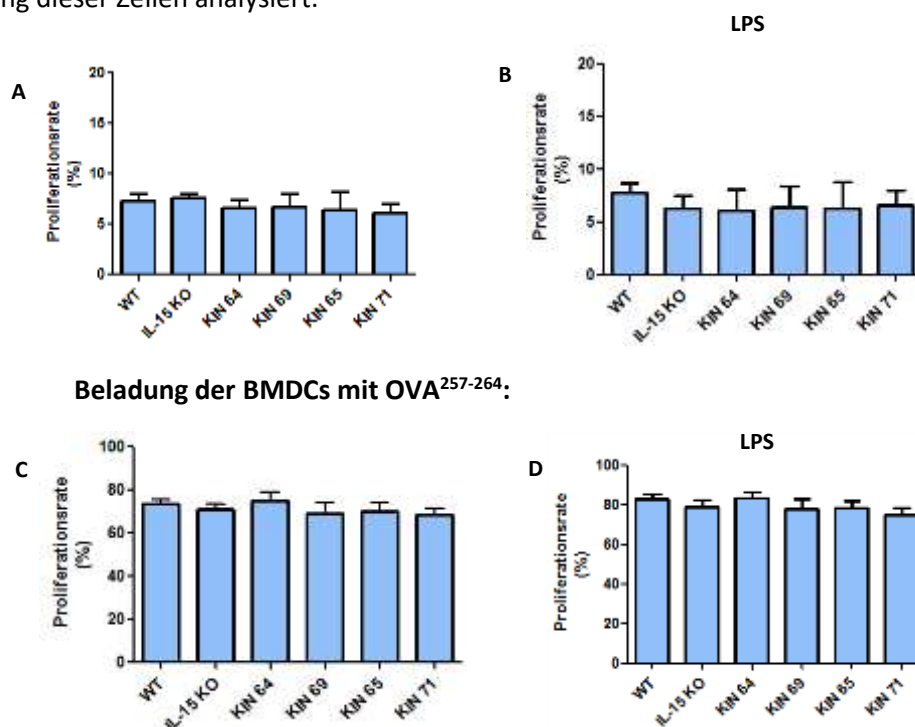


Abb. 24: Einfluss von IL-15 auf die antigenspezifische Proliferation von CD8⁺ T-Zellen. **A:** Proliferation in Anwesenheit von nicht stimulierten BMDCs. **B:** Proliferation in Anwesenheit von mit LPS stimulierten BMDCs. **C:** Anteil der proliferierenden CD8⁺ T-Zellen in Anwesenheit von mit OVA²⁵⁷⁻²⁶⁴-Peptid beladenen BMDCs. **D:** Anteil der proliferierenden CD8⁺ T-Zellen in Anwesenheit von mit OVA²⁵⁷⁻²⁶⁴-Peptid beladenen und zusätzlich mit LPS stimulierten BMDCs. Die kultivierten BMDCs (mit/ohne LPS) wurden 72 Stunden mit CFSE-markierten CD8⁺ T-Zellen der OTI-Mäuse kultiviert. Anschließend erfolgte die Analyse der CFSE-Fluoreszenz der CD8⁺ T-Zellen mittels FACS-Calibur. Gezeigt sind die berechneten Mittelwerte sowie die Standardabweichung. Die Berechnung der Signifikanzen erfolgte mittels one way ANOVA mit anschließendem Tukey-Test. $n = 5-12$

In den Kulturen mit den nicht stimulierten und den nicht beladenen BMDCs liegt die durchschnittliche Proliferationsrate der CD8⁺ T-Zellen unabhängig von IL-15 vergleichbar bei 6-8%. Die Stimulation der BMDCs mit LPS führt zu einer minimalen Erhöhung des Anteils der proliferierenden CD8⁺ T-Zellen um 1-2%. Durch die Stimulation mit LPS wird ebenfalls keine Abhängigkeit zu IL-15 deutlich, da die durch die Stimulation bewirkte verstärkte Proliferation in den untersuchten Stämmen gleichermaßen ansteigt. Die Beladung der BMDCs mit dem für den TCR der CD8⁺-Zellen spezifischen OVA²⁵⁷⁻²⁶⁴-Peptid führt in allen Stämmen zu einem deutlichen Anstieg der proliferierenden CD8⁺ T-Zellen auf 70-80%. Dieser Anstieg der Proliferation der CD8⁺ T-Zellen durch die Anwesenheit des OVA²⁵⁷⁻²⁶⁴-Peptides ist in WT, IL-15KO sowie den verschiedenen KIN-Stämmen vergleichbar und somit unabhängig von der Expression von IL-15. Die Stimulation der BMDCs mit LPS und die gleichzeitige Beladung mit dem für den TCR spezifischen OVA²⁵⁷⁻²⁶⁴-Peptid führen zu einem weiteren minimalen Anstieg des Anteils der proliferierenden CD8⁺ T-Zellen um bis zu 5%. Allerdings ist auch hier kein Einfluss durch die Präsenz von IL-15 erkennbar.

Abschließend kann man sagen, dass die Rekonstitution von IL-15 keinen Einfluss auf die antigenabhängigen Effekte von BMDCs auf CD8⁺T-Zellen hat.

4.3.2. Einfluss der Abwesenheit von IL-15R α auf die antigenabhängigen Effekte von *Bone Marrow Dendritic Cells* auf CD8⁺ T-Zellen

Neben dem Effekt von IL-15 sollte in weiteren Experimenten der Einfluss der die Transpräsentation auf die antigenspezifische Proliferation von CD8⁺ T-Zellen analysiert werden. Hierfür wurden die BMDCs der IL-15R α defizienten Tiere (IL-15R α KO, KIN 71R α und dKO) mit den angereicherten, TCR transgenen CD8⁺ T-Lymphozyten der OTI Tiere kultiviert und deren Proliferation wie in 4.3. erläutert anhand der CFSE-Verdünnung ermittelt. Um den Einfluss des IL-15R α optisch eindeutiger darzustellen, werden die Werte der bereits analysierten Stämme WT, IL-15KO und KIN 71 in Abbildung 25 nochmals gezeigt.

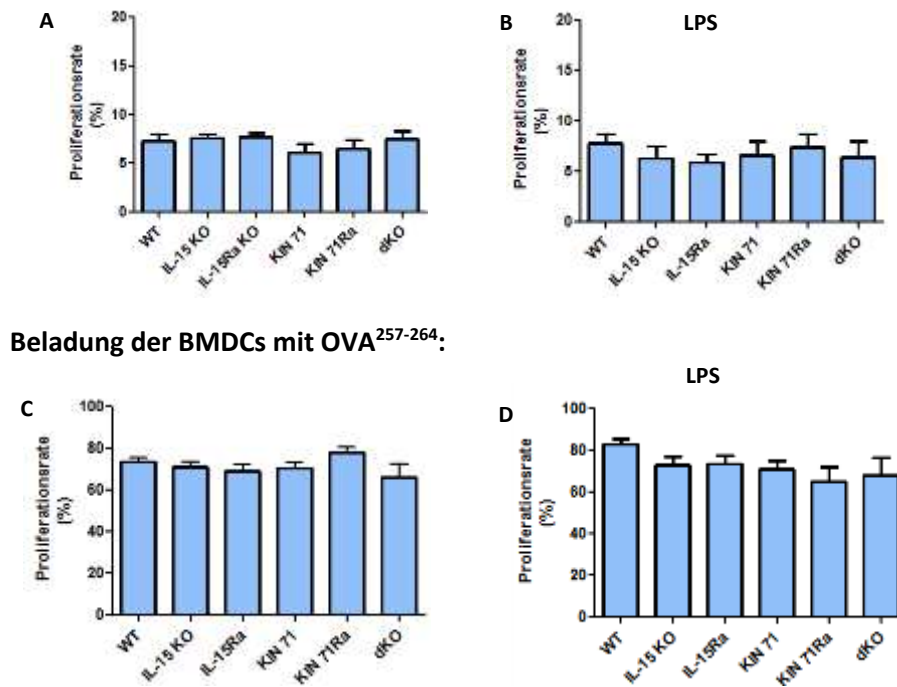


Abb. 25: Effekt von IL-15R α auf die antigenspezifische Proliferation der CD8⁺ T-Zellen. **A:** Proliferation in Anwesenheit von nicht stimulierten BMDCs. **B:** Proliferationsrate in Anwesenheit von mit LPS stimulierten BMDCs. **C:** Anteil der proliferierenden CD8⁺ T-Zellen in Anwesenheit von mit OVA²⁵⁷⁻²⁶⁴-Peptid beladenen BMDCs. **D:** Anteil der proliferierenden CD8⁺ T-Zellen in Anwesenheit von mit LPS stimulierten und zusätzlich mit OVA²⁵⁷⁻²⁶⁴-Peptid beladenen BMDCs. Die kultivierten BMDCs (mit/ohne LPS) wurden 72 Stunden mit CFSE-markierten CD8⁺ T-Zellen der OTI-Mäuse kultiviert. Anschließend erfolgte die Analyse der CFSE-Fluoresz der CD8⁺ T-Zellen mittels FACS-Calibur. Gezeigt sind die berechneten Mittelwerte sowie die Standardabweichung. Die Berechnung der Signifikanzen erfolgte mittels one way ANOVA mit anschließendem Tukey-Test. $n = 5-12$

Werden die CD8⁺ T-Zellen mit nicht stimulierten und nicht beladenen BMDCs kultiviert ist die Proliferation der CD8⁺ T-Zellen bei den BMDCs der IL-15R α defizienten Stämme (IL-15R α KO, KIN 71R α und dKO) vergleichbar mit der von WT, IL-15KO und KIN 71 (6-8%). Durch die Stimulation der BMDCs mit LPS erhöht sich der Anteil der proliferierenden CD8⁺ T-Zellen um 1-2%, bleibt jedoch auch bei den IL-15R α defizienten Mäusen vergleichbar zu den Kontrollstämmen WT, IL-15KO und KIN 71. Die Beladung der BMDCs mit dem TCR spezifischen OVA²⁵⁷⁻²⁶⁴-Peptid hat bei den Mäusen ohne IL-15R α einen starken Anstieg an proliferierenden CD8⁺ T-Zellen zur Folge welcher bei IL-15R α KO und KIN 71R α (67-69 %) vergleichbar mit den bereits zuvor analysierten WT, IL-15KO und KIN 71 ist. Stammen die beladenen BMDCs aus dKO Tieren ist der Anteil der proliferierenden CD8⁺ T-Zellen um wenige Prozente reduziert (64 %). Die Beladung der BMDCs mit OVA²⁵⁷⁻²⁶⁴-Peptid und die gleichzeitige Stimulation mit LPS hat bei IL-15R α KO und dKO keine Auswirkungen auf den Anteil der proliferierenden CD8⁺ T-Zellen. Bei BMDCs von KIN 71R α wirkt sich dies wiederum negativ auf die Proliferationsrate der CD8⁺ T-Zellen aus (63%).

Zusammenfassend ist zu sagen, dass die Präsenz von IL-15 und IL-15R α bei *in vitro* kultivierten BMDCs in den hier gezeigten Experimenten keinen Einfluss auf die spezifische Proliferation von CD8⁺ T-Zellen hat. Die Stimulation der BMDCs mit LPS hat einen schwachen jedoch stimulierenden Einfluss auf die Proliferation der CD8⁺ T-Zellen. Die Beladung der BMDCs mit dem OVA²⁵⁷⁻²⁶⁴-Peptid hingegen wirkt sich positiv auf die Proliferation der CD8⁺ T-Zellen aus, was durch die gleichzeitige Stimulation der BMDCs mit LPS nochmals geringfügig verstärkt wird.

4.3.3. Effekt von IL-15 auf die Viabilität von *in vitro* kultivierten CD8⁺ T-Zellen

Voraussetzung für die Messung der Proliferation der CD8⁺ T-Zellen ist deren Überleben in der Zellkultur. Im Folgenden wird analysiert, ob die Anwesenheit von durch BMDCs produziertem IL-15 bereits Einfluss auf die Viabilität der CD8⁺ T-Zellen ausübt. Hierfür wurden die BMDCs, wie bereits in 3.2. beschrieben, kultiviert, stimuliert und beladen. Der Anteil der Überlebenden CD8⁺ T-Zellen wurde wie beschrieben durch die Färbung mit PI bestimmt.

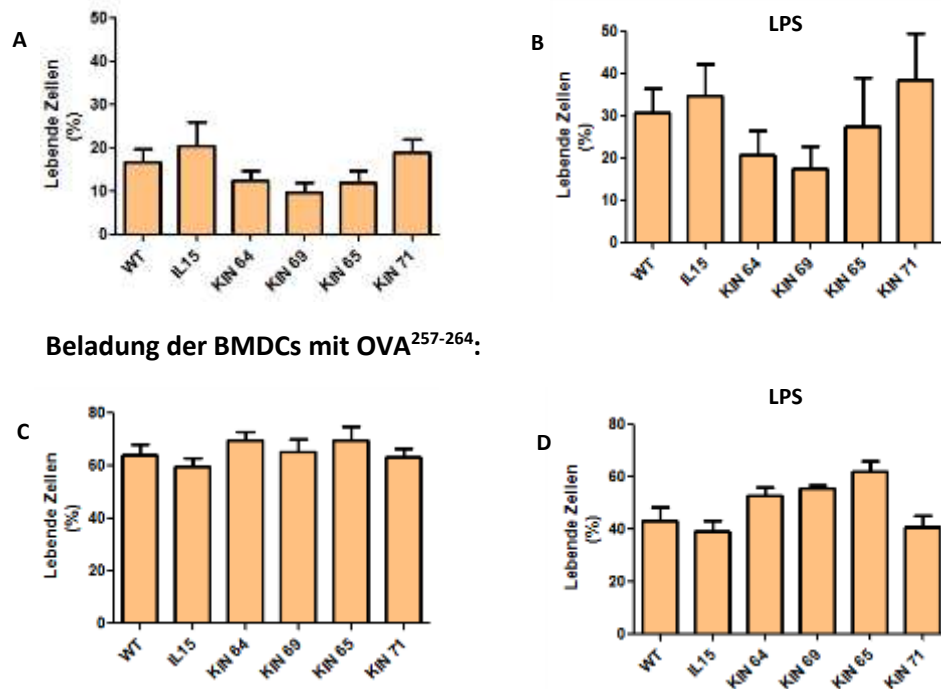


Abb. 26: Einfluss von IL-15 auf die Viabilität der TCR-spezifischen CD8⁺ T-Lymphozyten in Kultur mit BMDCs. **A:** Überlebensrate in Anwesenheit nicht stimulierter BMDCs. **B:** Überlebensrate der CD8⁺ T-Zellen in Anwesenheit von mit LPS stimulierten BMDCs. **C:** Überlebensrate der CD8⁺ T-Zellen in Anwesenheit von mit OVA²⁵⁷⁻²⁶⁴-Peptid beladenen BMDCs. **D:** Viabilität der CD8⁺ T-Zellen in Anwesenheit von mit LPS stimulierten und mit OVA²⁵⁷⁻²⁶⁴-Peptid beladenen BMDCs. Die kultivierten BMDCs (mit/ohne LPS) wurden 72 Stunden mit CFSE-markierten CD8⁺ T-Zellen der OTI-Mäuse kultiviert. Anschließend erfolgte die Bestimmung der Viabilität der CD8⁺ T-Zellen durch die Färbung mit PI und die anschließende Messung mittels FACS-Calibur. Gezeigt sind die berechneten Mittelwerte sowie die Standardabweichung. Die Berechnung der Signifikanzen erfolgte mittels one way ANOVA mit anschließendem Tukey-Test. *n* = 4-7

Der prozentuale Anteil der lebenden CD8⁺ T-Zellen in Anwesenheit nicht stimulierter BMDCs ist in IL-15KO und KIN 71 ähnlich dem Wert des WT. Verglichen hierzu ist in KIN 64, KIN 69 und KIN 65 der Anteil lebender CD8⁺ T-Zellen reduziert. Durch die Stimulation der BMDCs mit LPS erhöht sich der Anteil der lebenden CD8⁺ T-Zellen in allen Stämmen. In den Kulturen mit den BMDCs von KIN 64, KIN 69 und KIN 65 ist die Überlebensrate der CD8⁺ T-Zellen am geringsten, in IL-15KO und KIN 71 am größten. Durch die Beladung der BMDCs mit dem OVA²⁵⁷⁻²⁶⁴-Peptid wird die antigenspezifische Proliferation der T-Zellen induziert. Dabei erhöht sich der Anteil der überlebenden CD8⁺ T-Zellen unabhängig von IL-15 in allen Stämmen gleichermaßen auf 60-65%. Hierbei wird die bei den nicht stimulierten BMDCs detektierte reduzierte Viabilität der CD8⁺ T-Zellen in KIN 64, KIN 69 und KIN 65 komplett aufgehoben. Werden die BMDCs neben der Beladung mit dem OVA²⁵⁷⁻²⁶⁴-Peptid zusätzlich mit LPS stimuliert, wirkt sich das negativ auf die Viabilität der CD8⁺ T-Zellen aus. Bei WT, IL-15KO und KIN 71 sinkt der Anteil vergleichbar auf ca. 40%. Bei KIN 64, KIN 69 und KIN 65 wird der Anteil der überlebenden CD8⁺ T-Zellen weniger stark reduziert (50-60%), was dazu führt, dass diese Stämme die

größte Viabilität der CD8⁺ T-Zellen aufweisen. Bei der Stimulation mit LPS ohne die Beladung mit dem spezifischen Peptid weisen diese drei Stämme die geringste Überlebensrate von CD8⁺ T-Zellen auf.

4.3.4. Effekt von IL-15R α auf die Viabilität von *in vitro* kultivierten CD8⁺ T-Zellen

Neben IL-15 könnte auch die Transpräsentation durch IL-15/IL-15R α einen Effekt auf die Viabilität von CD8⁺ T-Zellen haben. Um dies zu analysieren wurde, wie in 3.2. beschrieben, der Anteil der Überlebenden CD8⁺ T-Zellen in den Kulturen mit IL-15R α defizienten BMDCs ermittelt. Zur Analyse dieser Resultate werden auch hier die bereits dargestellten Werte von WT, IL-15KO und KIN 71 nochmals gezeigt.

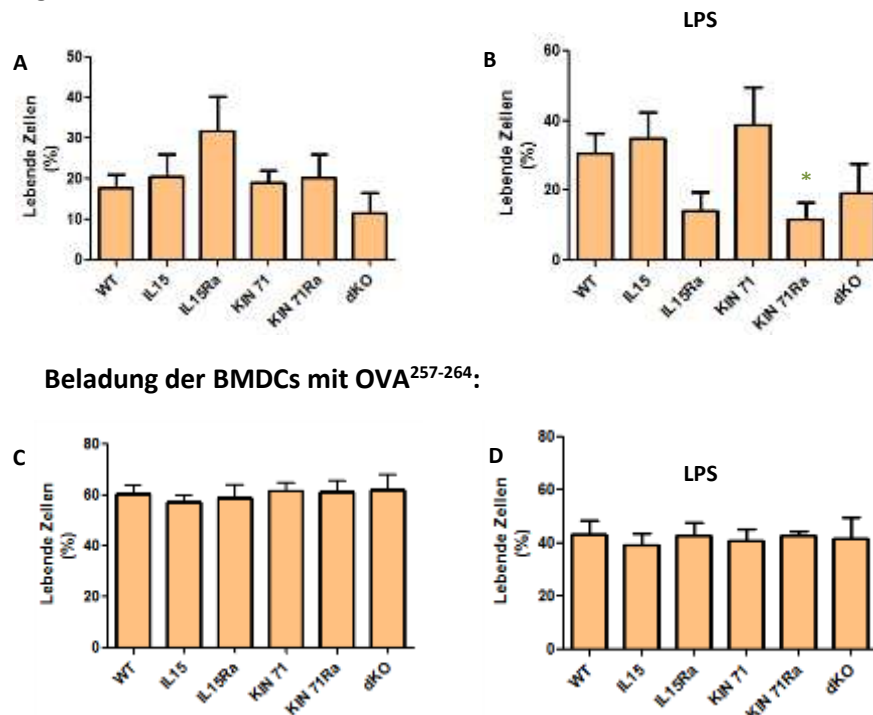


Abb. 27: Einfluss von IL-15R α auf die Viabilität von TCR-spezifischen CD8⁺ T-Lymphozyten in Kultur mit BMDCs. **A:** Viabilität der CD8⁺ T-Zellen in Anwesenheit nicht stimulierter BMDCs. **B:** Viabilität in Anwesenheit von mit LPS stimulierter BMDCs. **C:** Viabilität der CD8⁺ T-Zellen in Anwesenheit mit OVA²⁵⁷⁻²⁶⁴-Peptid beladener BMDCs. **D:** Viabilität in Anwesenheit von mit LPS stimulierter und mit OVA²⁵⁷⁻²⁶⁴-Peptid beladener BMDCs. Die kultivierten BMDCs (mit/ohne LPS) wurden 72 Stunden mit CFSE-markierten CD8⁺ T-Zellen der OTI-Mäuse kultiviert. Anschließend erfolgte die Bestimmung der Viabilität der CD8⁺ T-Zellen durch die Färbung mit PI und die anschließende Messung mittels FACS-Calibur. Gezeigt sind die berechneten Mittelwerte sowie die Standardabweichung. Die Berechnung der Signifikanzen erfolgte mittels one way ANOVA mit anschließendem Tukey-Test. Signifikanzen wurden zu KIN 71 (grün) berechnet (* = p \leq 0,05). n = 4-7

Die Überlebensrate der CD8⁺ T-Zellen ist in Anwesenheit nicht stimulierter BMDCs bei KIN 71R α vergleichbar zu den bereits zuvor gezeigten WT, IL-15KO und KIN 71. Bei IL-15R α ist der Anteil der lebenden CD8⁺ T-Zellen verglichen zu KIN 71R α erhöht. Die Kulturen mit BMDCs von dKO Tieren hingegen zeigen eine Reduktion der Viabilität der CD8⁺ T-Zellen. Durch die Stimulation der BMDCs mit LPS wird der Anteil der überlebenden CD8⁺ T-Zellen bei den Kulturen mit IL-15R α und KIN 71R α leicht reduziert, was zu einer signifikanten Differenz zwischen KIN 71 und KIN 71R α führt. Werden die Zellen mit LPS stimulierten BMDCs von dKO Tieren kultiviert, kommt es hier, verglichen zu nicht stimulierten Zellen, zu einem leichten Anstieg der Überlebensrate der CD8⁺ T-Zellen. Die Beladung der BMDCs mit OVA²⁵⁷⁻²⁶⁴-Peptid hat zwar einen starken positiven Effekt auf die Viabilität der CD8⁺ T-Zellen zur Folge, jedoch gehen hierdurch auch die durch die Defizienz von IL-15R α entstandenen Effekte auf das

Überleben der CD8⁺ T-Zellen verloren. Die vorherige Stimulation mit LPS und anschließende Beladung mit OVA²⁵⁷⁻²⁶⁴-Peptid der BMDCs wirkt sich in allen Stämmen negativ auf das Überleben der CD8⁺ T-Zellen aus (ca. 40%).

Die Stimulation der BMDCs mit LPS bewirkt die Erhöhung des Anteils der lebenden CD8⁺ T-Zellen in der Kultur im Vergleich zu nicht stimulierten. Durch diese Stimulation bleibt der schwache Effekt von IL-15 erhalten. Die Beladung der BMDCs mit dem spezifischen OVA²⁵⁷⁻²⁶⁴-Peptid hat eine Umkehrung des schwachen Effektes von IL-15 zur Folge, was durch die gleichzeitige Stimulation mit LPS verstärkt wird. Die Stimulation der BMDCs hat bei IL-15KO und KIN 71 die Reduktion der Überlebenden CD8⁺ T-Zellen zur Folge. Durch die Beladung der BMDCs mit dem spezifischen Peptid steigt der Anteil der überlebenden CD8⁺ T-Zellen auf 60 %, jedoch gehen auch die durch die IL-15R α -Defizienz erhaltenen Effekte verloren. Die vorherige Stimulation der BMDCs mit LPS und die anschließende Beladung mit dem spezifischen OVA²⁵⁷⁻²⁶⁴-Peptid hat unabhängig von IL-15 und IL-15R α eine Reduktion des Anteils der überlebenden CD8⁺ T-Zellen zur Folge.

4.3.5. Effekt von IL-15 auf die Zytokinproduktion bei der antigenabhängigen Stimulation von CD8⁺ T-Zellen

Neben dem Effekt auf die Proliferation der CD8⁺ T-Zellen wurde ebenfalls untersucht, ob IL-15 während der antigenspezifischen Stimulation die Sekretion von Zytokinen beeinflusst. Hierfür erfolgte die Messung der Zytokinkonzentration in den Überständen der für 72 Stunden inkubierten BMDC CD8⁺ T-Zell-Kulturen mittels ELISA. Die Zytokine IFN- γ und IL-2 werden von aktivierten T-Lymphozyten produziert. Hierbei ist IL-2 ein wichtiger Wachstumsfaktor für T-Zellen und IFN- γ entscheidend für die zelluläre Immunabwehr. Neben dem Einfluss von IL-15 wurde auch der Einfluss von der Stimulation der BMDCs mit LPS untersucht. Es werden nur die Zytokinproduktionen der mit dem spezifischen OVA²⁵⁷⁻²⁶⁴-Peptid beladenen BMDC-Kulturen gezeigt, da in den nicht beladenen Kulturen keine spezifische Stimulation stattfinden konnte und die Zytokinproduktion deshalb sehr gering ist. Abbildung 28 zeigt die durch die CD8⁺ T-Zellen produzierte Menge von IFN- γ und IL-2 in den Überständen der stimulierten und nicht stimulierten Kulturen.

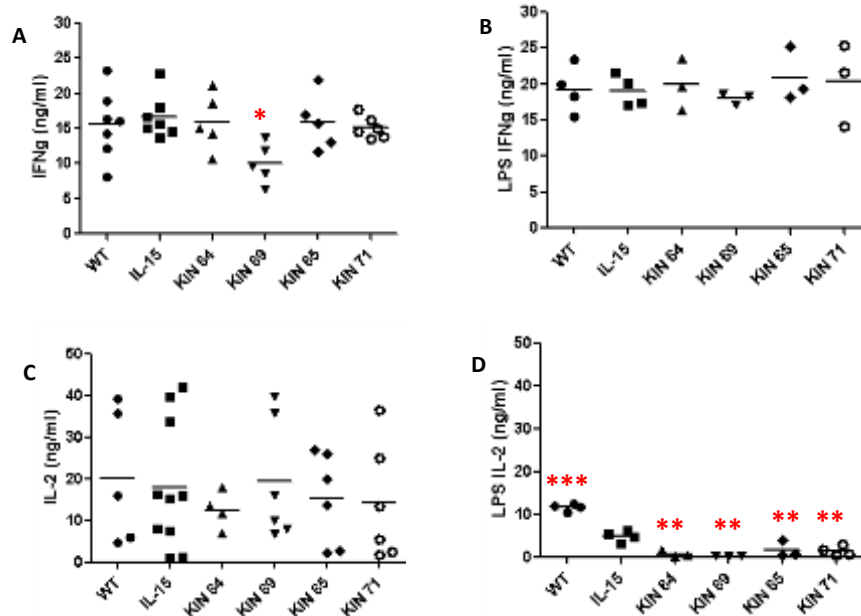


Abb. 28: IL-15 abhängige Zytokinproduktion während der antigenspezifischen Stimulation. A: Sekretion von IFN- γ . **B:** Sekretion von IFN- γ in den Kulturen mit LPS stimulierten BMDCs. **C:** Menge des sekretierten IL-2. **D:** IL-2 -Sekretion in Anwesenheit von mit LPS stimulierten BMDs. Stimulierte/nicht stimulierte BMDs wurden mit CD8⁺ T-Zellen kultiviert. Nach 72 Stunden erfolgte die Messung der produzierten Zytokine IL-2 und IFN- γ in den Überständen der Kulturen mittels ELISA. Dargestellt sind die jeweils gemessenen Einzelwerte sowie die Mittelwerte der Messungen. Die Berechnung der Signifikanzen erfolgte mittels one way ANOVA mit anschließendem Tukey-Test. Signifikanzen wurden zu IL-15KO (rot) berechnet (* = $p \leq 0,05$, ** = $p \leq 0,01$, *** = $p \leq 0,001$) = $n = 3-10$

Nach der 72 stündigen Kultivierung der BMDCs mit den CD8⁺ T-Zellen ist in den KIN 69 Überständen ist die Menge des durch die CD8⁺ T-Zellen produzierten IFN- γ signifikant reduziert (*). In den Anderen Stämmen ist die gemessene Menge von IFN- γ vergleichbar. Wurden die BMDCs mit LPS stimuliert, hat dies unabhängig von IL-15 einen Anstieg des produzierten IFN- γ zur Folge, sodass keine IL-15 abhängigen Differenzen mehr vorhanden sind. In den Kulturen mit den nicht stimulierten BMDCs ist die Menge des gemessenen IL-2 unabhängig von IL-15 in allen Stämmen ähnlich. Die Stimulation der BMDCs mit LPS hat bei allen Stämmen eine Verminderung der gemessenen Menge an IL-2 nach der 72 stündigen Inkubation zur Folge. In den WT-Überständen ist die Menge des gebildeten IL-2 nach der Stimulation verglichen zu IL-15KO signifikant erhöht (***). Bei den IL-15 transgenen Stämmen (KIN 64, KIN 69, KIN 65 und KIN 71) wird eine, verglichen zu IL-15KO, signifikant reduzierte Menge an IL-2 detektiert (**).

4.3.6. Einfluss von IL-15R α auf die Produktion von Zytokinen während der antigenspezifischen Stimulation von CD8⁺ T-Zellen

Da IL-15 hauptsächlich mit seinem hoch affinen IL-15R α agiert wurde neben dem Einfluss von IL-15 auch der Effekt von IL-15R α analysiert. Hierfür wurde die Menge der Zytokine IFN- γ und IL-2 nach 72 stündiger Inkubation auch in den IL-15R α defizienten Tieren (IL-15 R α KO, KIN 71R α und dKO) mittels ELISA gemessen. Um den Effekt von IL-15R α besser visualisieren zu können, wurden die bereits analysierten Daten der Stämme WT, IL-15KO und KIN 71 nochmals gezeigt. In Abbildung 29 ist die Menge von IFN- γ und IL-2 in den Kulturen mit stimulierten/nicht stimulierten BMDCs und CD8⁺ T-Zellen nach 72 Stunden Inkubation zu sehen.

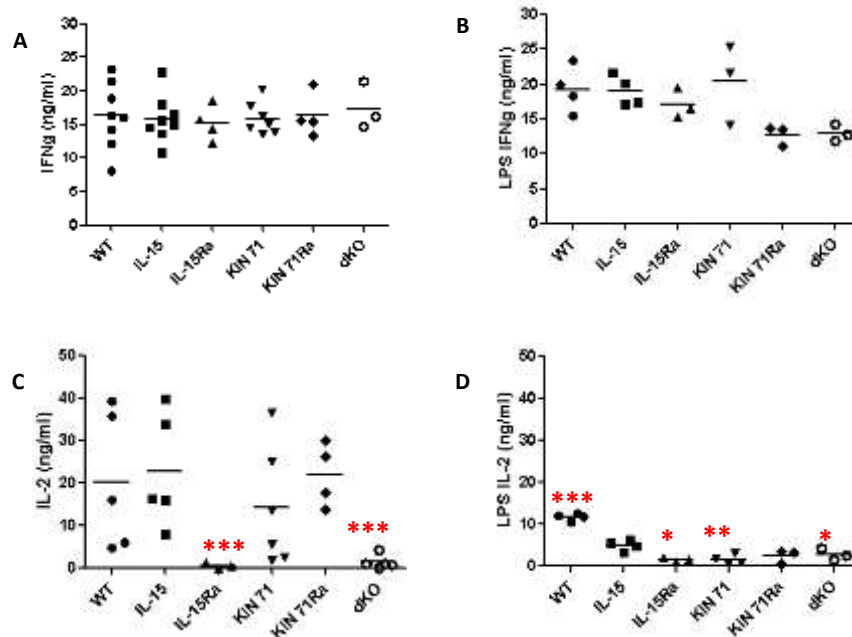


Abb. 29: IL-15R α abhängige Zytokinproduktion während der antigenspezifischen Stimulation. A: Sekretion von IFN- γ . **B:** Sekretion von IFN- γ in den Kulturen mit LPS stimulierten BMDCs. **C:** IL-15R α abhängige IL-2 Produktion. **D:** IL-2 Sekretion in Anwesenheit von mit LPS stimulierten BMDCs. Stimulierte/nicht stimulierte BMDCs wurden mit CD8⁺ T-Zellen kultiviert. Nach 72 Stunden erfolgte die Messung der produzierten Zytokine IL-2 und IFN- γ in den Überständen der Kulturen mittels ELISA. Dargestellt sind die jeweils gemessenen Einzelwerte sowie die Mittelwerte der Messungen. Die Berechnung der Signifikanzen erfolgte mittels one way ANOVA mit anschließendem Tukey-Test. Signifikanzen wurden zu IL-15KO (rot) berechnet. (* = $p \leq 0,05$, ** = $p \leq 0,01$, *** = $p \leq 0,001$) $n = 3-10$

Die nach der 72 stündigen Inkubation ermittelte Menge an IFN- γ unterscheidet sich in den Kulturen mit BMDCs von IL-15R α defizienten Tieren nicht von den WT oder IL-15KO. In den Kulturen mit stimulierten BMDCs unterscheidet sich die Menge des produzierten INF- γ nicht von den nicht stimulierten Kulturen. Bei IL-15R α KO und dKO ist die detektierte Menge an IL-2 in den Überständen stark reduziert (***), bei KIN 71R α hingegen ist die Menge an IL-2 mit der in IL-15KO und WT vergleichbar. Die Stimulation der BMDCs mit LPS bewirkt auch hier die Reduktion der nach 72 Stunden gemessenen Menge von IL-2. Auch hier ist in IL-15R α KO und dKO die Menge des produzierten IL-2 verglichen zu IL-15KO reduziert (*). In KIN 71R α ist sie wiederum vergleichbar mit IL-15KO.

Zusammenfassend kann man sagen, dass Stimulation der BMDCs zu einer erhöhten Produktion von IFN- γ und zu einer Reduktion der Anwesenheit von IL-2 nach 72 stündiger Inkubation führt. Die gemessene Menge an IFN- γ wird, wenn überhaupt, nur schwach von IL-15 und nicht von IL-15R α beeinflusst. Die Menge an sekretiertem IL-2 wird durch die Stimulation mit LPS von IL-15 beeinflusst. In IL-15R α KO und dKO ist die nach der Inkubation gemessene Menge an IL-2 unabhängig von der LPS-Stimulation verglichen zu IL-15KO reduziert.

4.4. Untersuchung der IL-15 abhängigen Effekte auf den Phänotyp der Dendritischen Zellen der Milz

Die vorliegenden Versuche wurden durchgeführt, um den Einfluss von IL-15 und IL-15R α in den genetisch modifizierten Stämmen auf in der Milz gereifte DCs zu analysieren. Die Isolation der DCs aus dem Gewebe der Milz erfolgte durch einen Kollagenase-Verdau. Diese Methode ist schonend für die

Zellen und somit für die Isolation der reifen DCs geeignet. Abbildung 30 stellt die repräsentative Gating-Strategie für die Analyse der isolierten DCs dar.

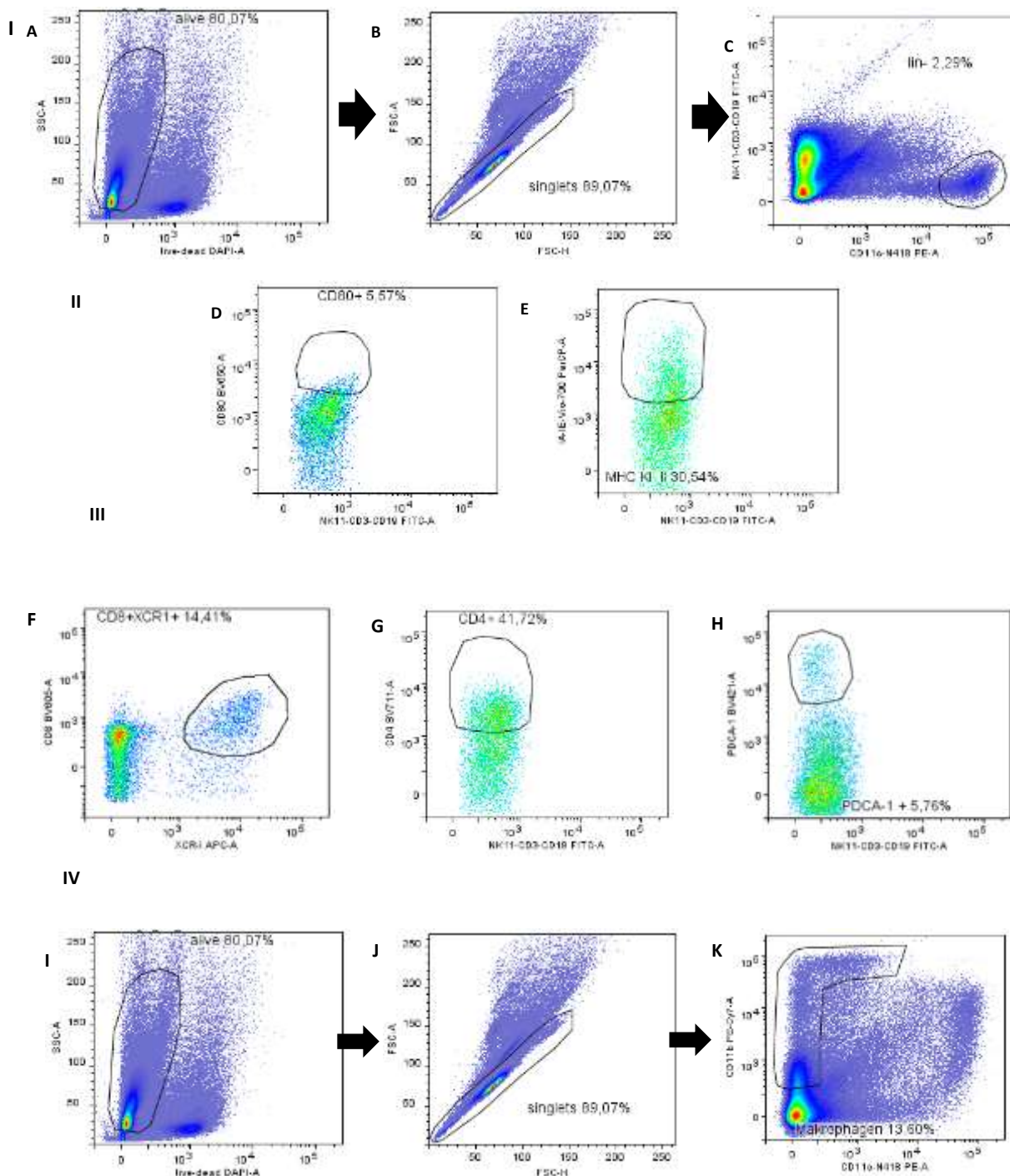


Abb. 30: Repräsentative Gating-Strategie für die FACS-Analyse der aus der Milz isolierten DCs. **I: Bestimmung der lin-DC-Population.** **A:** Ausschluss der toten Zellen durch die Färbung mit einem Lebend-Tot-Farbstoff. **B:** Ausschluss von Zellartefakten und Doubletten. **C:** Festlegung der lin-CD11c^{high+} DC-Population. **II: Charakterisierung der DCs.** **D/E:** Expression von CD80 (D) und MHC Klasse II (E)-Molekülen auf den DCs. **III: Subpopulationen der isolierten DCs.** **F:** Identifizierung der CD8⁺XCR1⁺ DCs. **G:** Festlegung der CD4⁺ DCs. **H:** Bestimmung der plasmazytoiden DCs. **IV: Bestimmung der Makrophagen-Population** **I:** Ausschluss der toten Zellen mittels Lebend-Tot-Färbung. **J:** Ausschluss von Zellartefakten und Doubletten. **K:** Identifikation der Makrophagen-Population.

Um falsch positive Ereignisse zu minimieren, werden im ersten Schritt mit Hilfe eines Lebend-Tot-Farbstoffs die toten Zellen aus der Analyse entfernt. Nachdem die Artefakte und Zellaggregate ausgeschlossen sind verbleiben für die Analyse die einzelnen Zellen. Aus dieser Population werden zum einen die $CD11b^+CD11c^-$ -Zellen als Makrophagen (IV) und zum anderen die lineage- (lin^-)(NK1.1, CD3 $^-$, CD19 $^-$) und $CD11c^{high+}$ Zellen als DCs identifiziert. Um den Einfluss von IL-15/IL-15R α auf die reifen DCs analysieren zu können, wurde die Expression der kostimulatorischen Moleküle CD80 und die MHC Klasse II Proteine betrachtet. Zudem wurde der Effekt auf $CD8^+XCR-1^+$, $CD4^+$ - und die plasmazytoiden DCs, welche Unterpopulationen der DCs darstellen, analysiert.

4.4.1. Modulationen des Phänotyps der Dendritischen Zellen der Milz durch IL-15

Da DCs in der Lage sind IL-15 zu produzieren, beeinflusst die Anwesenheit von DCs die Präsenz von IL-15. In folgenden Experimenten wurde analysiert, in wie fern der Phänotyp der DCs durch IL-15 beeinflusst werden kann. In Abbildung 31 sind die absoluten Zellzahlen der, wie in 3.3. beschrieben, ermittelten DCs in Abhängigkeit zu IL-15 dargestellt.

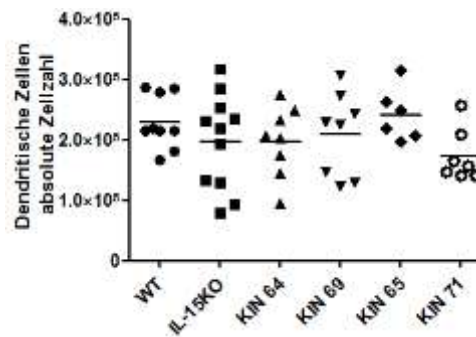


Abb. 31: Effekt von IL-15 auf DCs in der Milz. Absolute Zellzahl der DCs. Zur Isolation der reifen DCs aus der Milz erfolgte ein enzymatischer Verdau mit Kollagenase. DCs sind als lin^- ($CD3-NK1.1-CD19^-$) und $CD11c^{high+}$ definiert. Dargestellt sind die jeweils gemessenen Werte sowie die Mittelwerte der Messungen. Die Berechnung der Signifikanzen erfolgte mittels one way ANOVA mit anschließendem Tukey-Test. $n = 6-10$

Die absolute Zellzahl der DCs ist in IL-15KO und KIN 64 verglichen zu dem WT schwach, jedoch nicht signifikant reduziert. Die Zellzahlen in KIN 69 und KIN 65 hingegen sind vergleichbar mit denen des WT. Bei KIN 71 kommt die geringste Menge von DCs vor, was ebenfalls nicht zu einer signifikanten Differenz zu IL-15KO führt.

Des Weiteren erfolgte die Analyse der IL-15 abhängigen Expression der kostimulatorischen Moleküle CD80 und MHC Klasse II auf der Oberfläche der DCs.

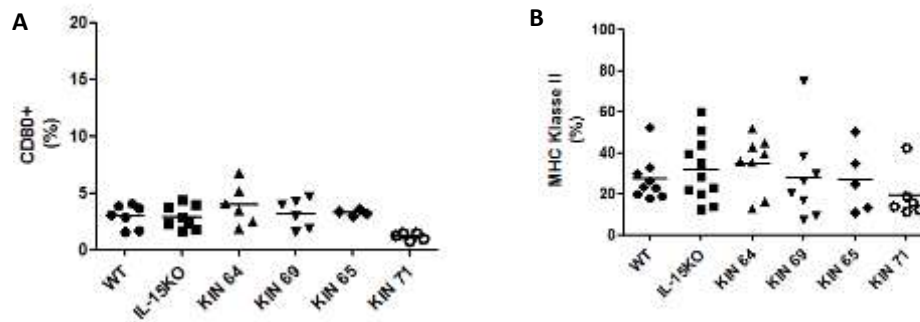


Abb. 32: Einfluss von IL-15 auf die Expression von CD80 und MHC Klasse II Molekülen auf den DCs der Milz. A: Prozentualer Anteil der DCs die CD80 Moleküle exprimieren. **B:** Prozentualer Anteil der MHC Klasse II Moleküle exprimierenden DCs. Zur Isolation der reifen DCs aus der Milz erfolgte ein enzymatischer Verdau mit Kollagenase. DCs sind als lin^- ($CD3-NK1.1-CD19^-$) und $CD11c^{high+}$ definiert. Dargestellt sind die jeweils gemessenen Werte sowie die Mittelwerte der Messungen. Die Berechnung der Signifikanzen erfolgte mittels one way ANOVA mit anschließendem Tukey-Test. $n=5-11$

Der Anteil der DCs die CD80 Moleküle exprimieren ist in KIN 71 reduziert. Die Werte von IL-15KO, KIN64, KIN 69 und KIN 65 sind vergleichbar mit denen des WT. Auch die Expression der MHC Klasse II Moleküle durch DCs ist bei KIN 71 am geringsten. Bei IL-15KO und KIN 64 ist der Anteil der MHC Klasse II positiven DCs verglichen zu dem WT in geringem Maße erhöht. KIN 69 und KIN 65 hingegen zeigen eine mit dem WT vergleichbare Expression von MHC Klasse II Molekülen.

$CD8^+XCR-1^+$ DCs haben im nicht infizierten Organismus immunregulatorische Aufgaben, welche unter anderem darin bestehen, die Selbsttoleranz aufrecht zu erhalten. Im Falle einer Infektion ist diese Subpopulation der DCs besonders für die Aktivierung zytotoxischer $CD8^+$ T-Zellen verantwortlich [267]. Die $CD4^+$ DCs bilden den größten Anteil der resident in der Milz lokalisierten DCs [267].

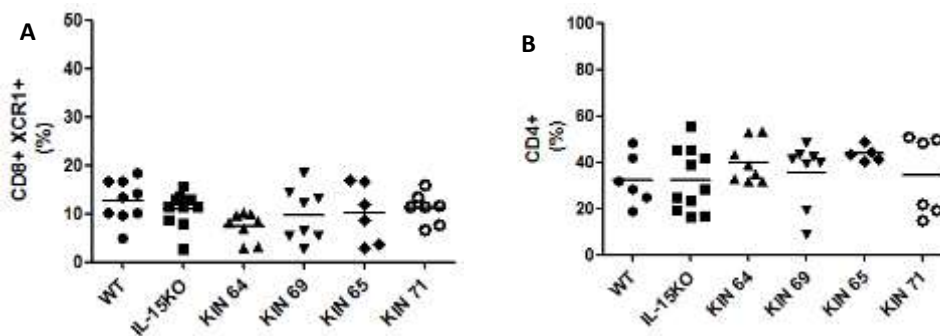


Abb. 33: Effekt von IL-15 auf die Subpopulationen der DCs in der Milz. A: Prozentualer Anteil der $CD8^+XCR1^+$ DCs. **B:** Prozentualer Anteil der $CD4^+$ Zellen in der Milz. Zur Isolation der reifen DCs aus der Milz erfolgte ein enzymatischer Verdau mit Kollagenase. DCs sind als lin^- ($CD3-NK1.1-CD19^-$) und $CD11c^{high+}$ definiert. Dargestellt sind die jeweils gemessenen Werte sowie die Mittelwerte der Messungen. Die Berechnung der Signifikanzen erfolgte mittels one way ANOVA mit anschließendem Tukey-Test. $n = 5-11$

Der Anteil der $CD8^+XCR-1^+$ DCs ist in KIN 64 im Vergleich zu dem WT und den anderen Stämmen schwach reduziert. In KIN 64 und KIN 65 ist der Anteil der $CD4^+$ DCs verglichen zum WT leicht erhöht. In IL-15KO, KIN 69 und KIN 71 ist dieser jedoch vergleichbar mit der des WT.

Eine weitere Unterpopulation der DCs stellen die plasmazytoide DCs dar, welche einen wichtigen Bestandteil des angeborenen Immunsystems in den peripheren Organen des Immunsystems darstellen.

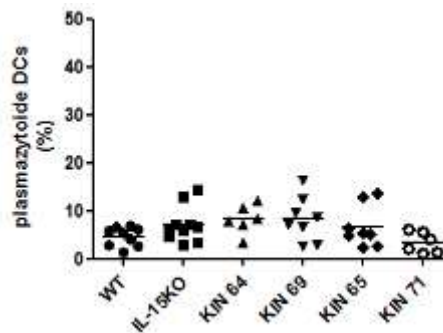


Abb. 34: Plasmazytoide DCs in Abhängigkeit von IL-15. Prozentualer Anteil plasmazytoider DCs. Zur Isolation der reifen DCs aus der Milz erfolgte ein enzymatischer Verdau mit Kollagenase. Plasmazytoide DCs sind als lin^- ($CD3-NK1.1-CD19^-$) und $CD11c^{high+}$ mit zusätzlicher Expression von PDCA-1 definiert. Dargestellt sind die jeweils gemessenen Werte sowie die Mittelwerte der Messungen. Die Berechnung der Signifikanzen erfolgte mittels one way ANOVA mit anschließendem Tukey-Test. $n = 5-11$

Der Anteil der plasmazytoiden DCs ist in IL-15KO, KIN 64 und KIN 69 verglichen zum WT leicht angestiegen und in KIN 71 reduziert. Der Anteil der plasmazytoiden DCs ist in KIN 65 ist vergleichbar mit dem des WT. Durch die Abwesenheit von IL-15 entstehen jedoch keine signifikanten Effekte.

4.4.2. IL-15R α -abhängige Effekte in der Modulation des Phänotyps der Dendritischen Zellen aus der Milz

Der Effekt der Transpräsentation auf die aus der Milz isolierten DCs wurde durch die Abwesenheit des IL-15R α untersucht. Wie bei den vorhergehenden Experimenten wurden auch hier zur Kontrolle des Einflusses durch den Rezeptor α die Stämme WT, IL-15KO und KIN 71 nochmals dargestellt. Abbildung 35 zeigt den Einfluss des Rezeptors auf die DCs in der Milz.

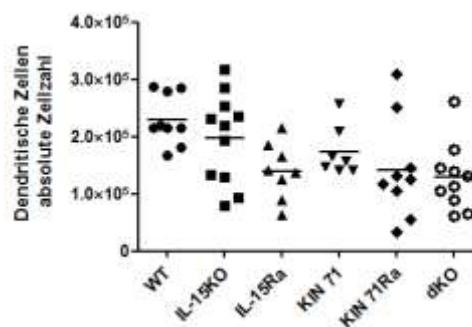


Abb. 35: Effekt von IL-15R α auf DCs in der Milz. Absolute Zellzahl der DCs. Zur Isolation der reifen DCs aus der Milz erfolgte ein enzymatischer Verdau mit Kollagenase. DCs sind als lin^- ($CD3-NK1.1-CD19^-$) und $CD11c^{high+}$ definiert. Dargestellt sind die jeweils gemessenen Werte sowie die Mittelwerte der Messungen. Die Berechnung der Signifikanzen erfolgte mittels one way ANOVA mit anschließendem Tukey-Test. $n = 6-10$

Die absoluten Zellzahlen der DCs liegen bei den IL-15R α defizienten Stämmen (IL-15R α KO, KIN 71R α und dKO) vergleichbar auf einer Höhe und sind verglichen zu WT, IL-15KO und KIN 71 minimal reduziert, was nicht zu einer signifikanten Differenz führt.

Zur weiteren Analyse des Einflusses der Transpräsentation auf DCs erfolgte ebenfalls die Analyse der Expression der kostimulatorischen Moleküle in Abwesenheit des IL-15R α .

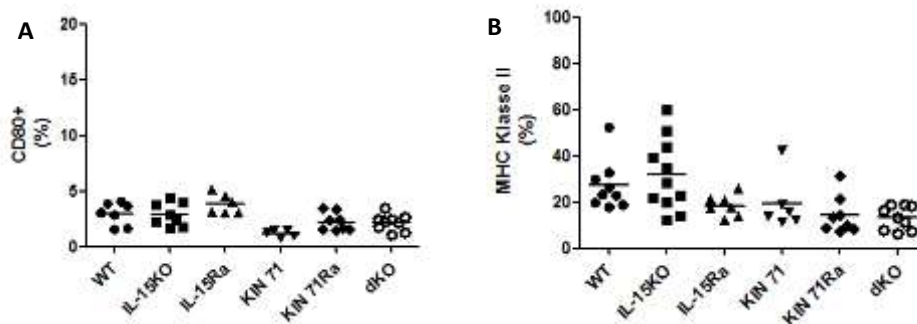


Abb. 36: Effekt von IL-15R α auf die Expression kostimulatorischer Moleküle der DCs. A: Anteil der CD80⁺ DCs. B: Anteil der MHC Klasse II exprimierenden DCs. Zur Isolation der reifen DCs aus der Milz erfolgte ein enzymatischer Verdau mit Kollagenase. DCs sind als *lin*⁻ (CD3-NK1.1-CD19⁻) und CD11c^{high} definiert und auf ihre Expression von CD80 und MHC Klasse II Molekülen analysiert. Dargestellt sind die jeweils gemessenen Werte sowie die Mittelwerte der Messungen. Die Berechnung der Signifikanzen erfolgte mittels one way ANOVA mit anschließendem Tukey-Test. *n* = 5-11

Bei IL-15R α KO ist der prozentuale Anteil der CD80⁺DCs vergleichbar mit dem von WT und IL-15KO. Bei KIN 71R α und dKO hingegen ist der Anteil dieser Zellen auf ein zu KIN 71 vergleichbares Niveau reduziert. Bei der Expression der MHC Klasse II Moleküle durch DCs bewirkt der fehlende IL-15R α in IL-15R α KO, KIN 71R α und dKO eine nicht signifikante Reduktion des prozentualen Anteils verglichen zum WT.

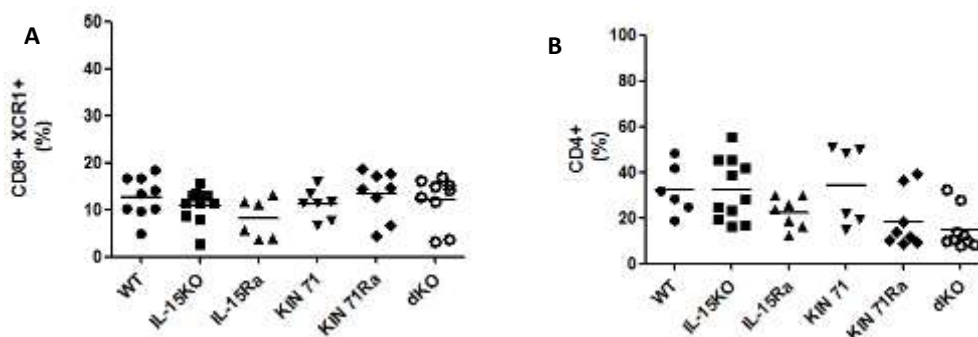


Abb. 37: Effekt von IL-15R α auf Subpopulationen der DCs in der Milz. A: Prozentualer Anteil der CD8⁺XCR1⁺ DCs B: Prozentualer Anteil der CD4⁺ DCs in der Milz. Zur Isolation der reifen DCs aus der Milz erfolgte ein enzymatischer Verdau mittels Kollagenase. Die als DCs bestimmte *lin*-CD11c^{high} Population wurde auf ihre Expression von CD8-XCR1 und CD4 Molekülen analysiert. Dargestellt sind die jeweils gemessenen Werte sowie die Mittelwerte der Messungen. Die Berechnung der Signifikanzen erfolgte mittels one way ANOVA mit anschließendem Tukey-Test. *n* = 5-11

Der prozentualer Anteil der CD8⁺XCR1⁺ DCs ist in IL-15R α KO reduziert. Bei KIN 71R α und dKO hat der Fehlende IL-15R α keinen Einfluss auf die Anwesenheit dieser Subpopulation. Das Fehlen des IL-15R α führt in den defizienten Stämmen (IL-15R α KO, KIN71R α und dKO) zu einer Verminderung des prozentualen Anteils der CD4⁺ Subpopulation der DCs.

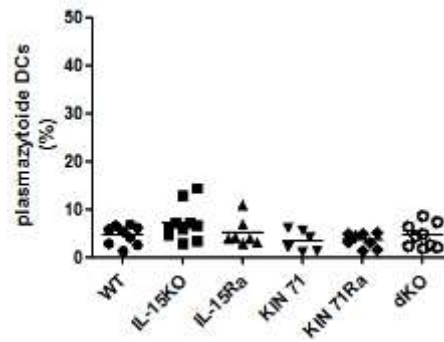


Abb. 38: Plasmazytoide DCs in Abhängigkeit von IL-15R α . Prozentualer Anteil der plasmazytoiden DCs. Zur Isolation der reifen DCs aus der Milz erfolgte ein enzymatischer Verdau mittels Kollagenase. Die als DCs bestimmte lin-CD11c^{high+} Population wurde auf ihre Expression von PDCA-1, was ein Marker für plasmazytoiden Zellen ist, untersucht. Dargestellt sind die jeweils gemessenen Werte sowie die Mittelwerte der Messungen. Die Berechnung der Signifikanzen erfolgte mittels one way ANOVA mit anschließendem Tukey-Test.. n = 5-11

Das Fehlen des IL-15R α in IL-15R α KO, KIN 71R α und dKO hat im Fall der plasmazytoiden DCs keinen Effekt auf die prozentualen Anteile dieser Zellen.

Zusammenfassend kann man sagen, dass weder IL-15 noch IL-15R α die Differenzierung der Subpopulationen von DCs oder die Expression derer kostimulatorischer Moleküle in der Milz beeinflussen.

4.5. Effekt von IL-15 und IL-15R α auf die Makrophagen in der Milz

Da neben den DCs auch Makrophagen wichtige Mediatoren der Immunantwort darstellen, wurde im Folgenden auch bei diesen Zellen die Möglichkeit der Modulation durch IL-15/IL-15R α analysiert, wofür die Population der Makrophagen, wie in 4.4. beschrieben, bestimmt wurde.

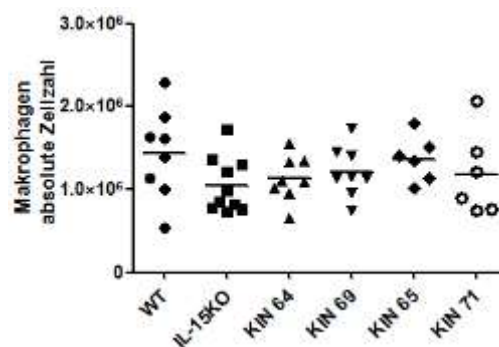


Abb. 39: Effekt von IL-15 auf die Makrophagen der Milz. Absolute Zellzahl der Makrophagen. Zur Isolation der Makrophagen aus der Milz erfolgte ein enzymatischer Verdau mit Kollagenase. Zellen, die CD11b⁺ und CD11c^{low+} sind, wurden als Makrophagen bestimmt. Dargestellt sind die jeweils gemessenen Werte sowie die Mittelwerte der Messungen. Die Berechnung der Signifikanzen erfolgte mittels one way ANOVA mit anschließendem Tukey-Test. n = 5-11

Die absolute Zellzahl der Makrophagen ist in WT am höchsten und steigt von IL-15KO über KIN 64 und KIN 69 zu KIN 65 schwach an. Bei KIN 71 ist diese vergleichbar mit dem Wert von KIN 64.

Abbildung 40 stellt den Einfluss der Transpräsentation dar, welche in den IL-15R α defizienten Stämmen nicht mehr möglich ist. Zur verbesserten visuellen Darstellung dieses Einflusses wurde die bereits analysierten Stämme WT, IL-15KO sowie KIN 71 nochmals gezeigt.

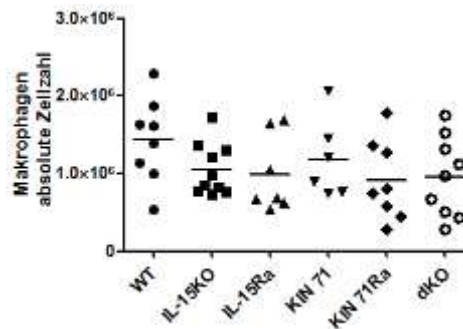


Abb. 40: Effekt von IL-15 α auf die Makrophagen der Milz. A: Absolute Zellzahl der Makrophagen. Zur Isolation der Makrophagen aus der Milz erfolgte ein enzymatischer Verdau mit Kollagenase. Zellen, die CD11b⁺ und CD11c^{low} oder CD11c^{low} sind, wurden als Makrophagen bestimmt. Dargestellt sind die jeweils gemessenen Werte sowie die Mittelwerte der Messungen. Die Berechnung der Signifikanzen erfolgte mittels one way ANOVA mit anschließendem Tukey-Test. $n = 5-11$

In den IL-15 α defizienten Stämmen (IL-15 α , KIN 71 α und dKO) ist die absolute Zellzahl der Makrophagen ähnlich zu IL-15KO reduziert.

Zusammenfassend zeigte sich in diesen Experimenten, dass IL-15 oder IL-15 α keinen Einfluss auf Makrophagen, DCs oder plasmazytoide DCs in der Milz zur Folge haben.

4.6. Charakterisierung der IL-15-abhängigen Effekte auf die lymphoiden Zellen im Blut

Neben der Analyse der lymphoiden Zellen in verschiedenen Organen erfolgte auch im Blut die Analyse des Effektes von IL-15/IL-15 α auf die lymphoiden Zellen. Es sollte herausgefunden werden, ob der Einfluss von IL-15/IL-15 α nur die in den Organen lokalisierten lymphoiden Zellen oder auch die lymphoiden Zellen in der Zirkulation betrifft. Die folgende Grafik stellt die repräsentative Gating-Strategie für die FACS-Analyse der Lymphozyten aus dem Blut dar.

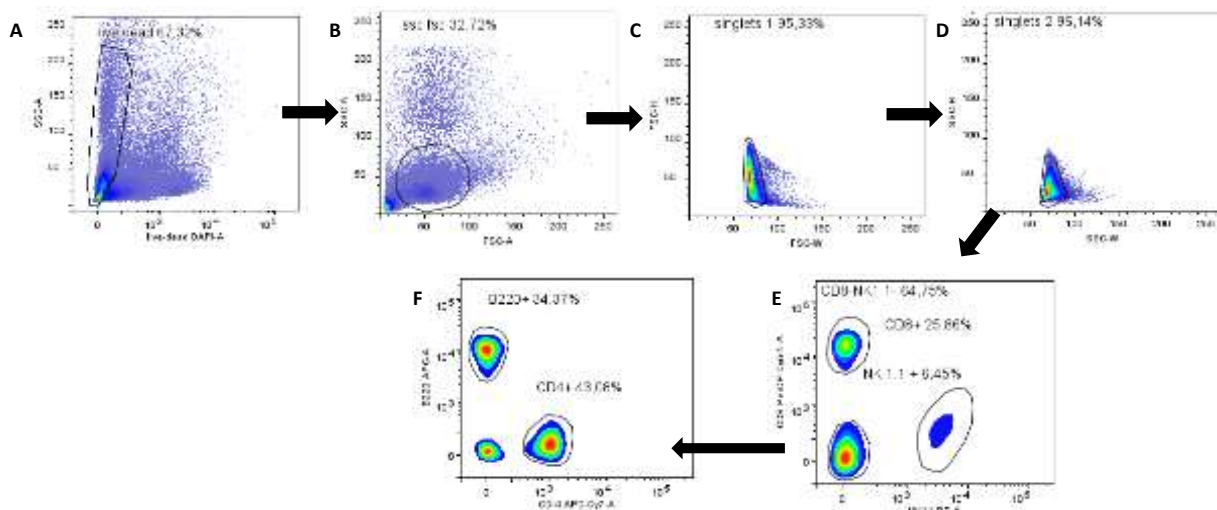


Abb. 41: Repräsentative Gating-Strategie für die FACS-Analyse der Lymphozyten aus dem Blut. A: Ausschluss der toten Zellen durch die Färbung mit einem Lebend-Tot-Farbstoff. **B:** Bestimmung der lymphoiden Zellen mit Hilfe des ssc-fsc Gates. **C/D:** Ausschluss von Zellartefakten und Doubletten. **E:** Identifikation der CD8⁺ und der NK Zellen **F:** Bestimmung der CD4⁺ und B Zell-Populationen anhand des CD8⁺NK1.1⁻ Gate.

Durch den Ausschluss der toten Zellen wird das Auftreten falsch positiver Ereignisse minimiert. Die Bestimmung der lymphoiden Zellen durch das ssc-fsc Gate beruht auf den bisher gesammelten Erfahrungen bei der Zellanalyse im Blut. Da Zellartefakte und Doubletten ebenfalls zu falsch positiven Ereignissen führen können, werden diese ebenfalls aus der Analyse ausgeschlossen. Der Anteil der CD4⁺ sowie B-Zellen wurde aus dem CD8⁻NK1.1⁻ Gate bestimmt. Der prozentuale Wert bezog sich hierbei auf die Population der „singlets 2“.

4.6.1. IL-15 bedingte Änderungen der lymphoiden Zellen im Blut

In der folgenden Abbildung ist der Einfluss von IL-15 auf die CD4⁺- und CD8⁺ T-Zellen, sowie die NK- und B-Zellen im Blut zu sehen.

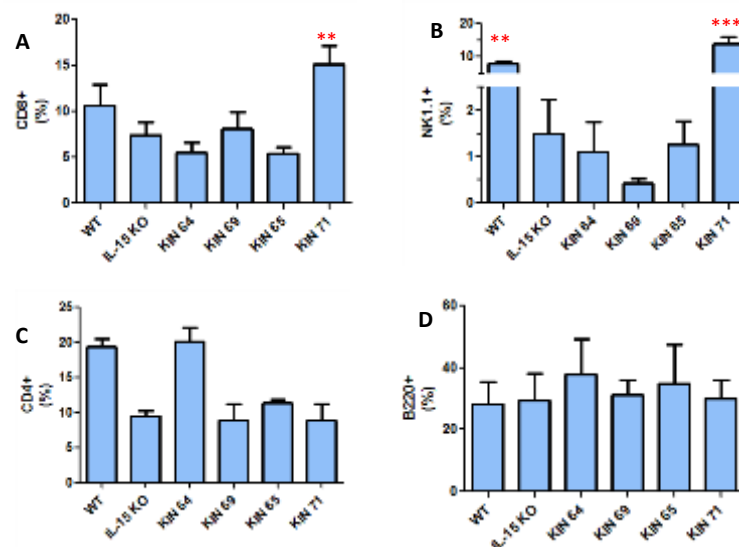


Abb. 42: Einfluss von IL-15 auf die Lymphozyten im Blut. **A:** Prozentualer Anteil der CD8⁺ T-Zellen. **B:** Anteil der NK-Zellen. **C:** Anteil der CD4⁺ T-Zellen. **D:** Prozentualer Anteil der B-Zellen. Nach der Entnahme wurden die Erythrozyten aus dem Blut lysiert und die Zellen mit Antikörpern gefärbt. Die Messung erfolgte unter Verwendung des LSRII. Dargestellt sind die Mittelwerte sowie die Standardabweichungen der Messungen. Die Berechnung der Signifikanzen erfolgte mittels one way ANOVA mit anschließendem Tukey-Test. Signifikanzen wurden zu IL-15KO (rot) berechnet ** = $p \leq 0,01$, *** = $p \leq 0,001$. $n = 4-8$

Verglichen zu WT ist der prozentuale Anteil der CD8⁺ T-Zellen bei IL-15KO und KIN 69 auf einen vergleichbaren Wert reduziert. Bei KIN 64 und KIN 65 ist der Anteil der CD8⁺ T-Zellen ebenfalls auf einen vergleichbaren Wert reduziert. Lediglich in KIN 71 kommt es verglichen zu IL-15KO zu einem signifikanten Anstieg der CD8⁺ T-Zellen (**). Der Anteil der NK-Zellen ist bei dem WT verglichen zu IL-15KO signifikant erhöht (**). Der prozentuale Anteil der NK-Zellen in KIN 64, KIN 69 und KIN 65 ist geringer als bei IL-15KO. Bei KIN 71 ist der Anteil der NK-Zellen größer als bei dem WT, was zu einer erhöhten signifikanten Differenz zu IL-15KO führt (***). Der Anteil der CD4⁺ T-Zellen im Blut ist in IL-15KO vergleichbar mit KIN 69, KIN 65 und KIN 71. Bei dem WT und KIN 64 ist der prozentuale Anteil der CD4⁺ T-Zellen vergleichbar, jedoch nicht signifikant zu IL-15KO erhöht. Der Anteil der B-Zellen ist in WT, IL-15KO, KIN 69 und KIN 71 vergleichbar. Bei KIN 64 und KIN 65 ist der Anteil dieser Zellen zwar geringfügig, aber nicht signifikant erhöht.

4.6.2. IL-15R α abhängige Änderungen der lymphoiden Zellen im Blut

Auch bei der Analyse des Blutes wurde neben dem Effekt von IL-15 der quantitative Einfluss der Transpräsentation auf die Lymphozyten untersucht. Um den durch die Abwesenheit des IL-15R α entstandenen Effekt zu veranschaulichen, werden in Abbildung 43 die bereits analysierten Resultate für WT, IL-15KO und KIN 71 nochmals dargestellt.

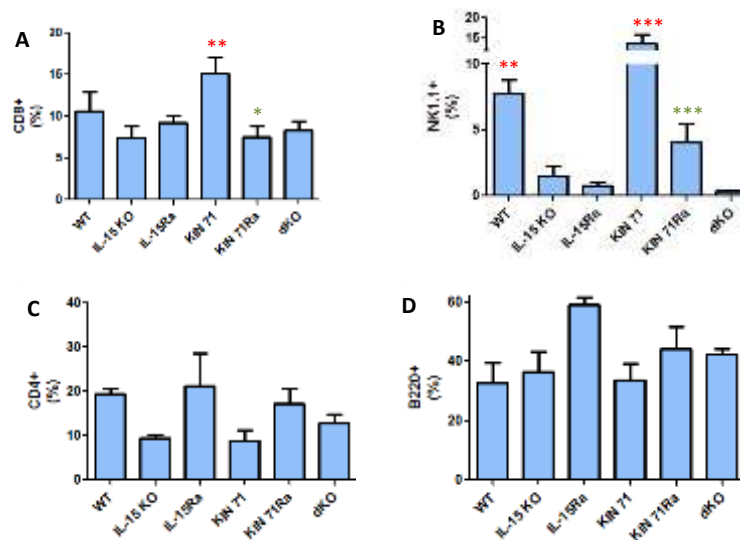


Abb. 43: Einfluss von IL-15R α auf lymphoide Zellen im Blut. **A:** Prozentualer Anteil der CD8⁺ T-Zellen. **B:** Anteil der NK-Zellen. **C:** Anteil der CD4⁺ T-Zellen. **D:** Prozentualer Anteil der B-Zellen. Nach der Entnahme wurden die Erythrozyten aus dem Blut lysiert und die Zellen mit Antikörpern gefärbt. Die Messung erfolgte unter Verwendung des LSRII. Dargestellt sind die Mittelwerte sowie die Standardabweichungen der Messungen. Die Berechnung der Signifikanzen erfolgte mittels one way ANOVA mit anschließendem Tukey-Test. Signifikanzen wurden zu IL-15KO (rot) sowie bei den IL-15R α defizienten Mäusen zu KIN 71 (grün) berechnet. (* = $p \leq 0,05$, ** = $p \leq 0,01$, *** = $p \leq 0,001$). $n = 4-8$

Durch das Fehlen des IL-15R α sind in IL-15R α KO, KIN 71R α und dKO die prozentualen Anteile der CD8⁺ T-Zellen vergleichbar zu IL-15KO reduziert, was zu einem signifikanten Effekt zwischen KIN 71 und KIN 71R α (*) führt. Die prozentualen Anteile der NK-Zellen sind ebenfalls bei den IL-15R α defizienten Stämmen reduziert. Bei IL-15R α KO und dKO liegt der Anteil dieser Zellen bei unter 1%, bei KIN 71R α ist dieser Anteil zwar größer, jedoch signifikant reduziert zu KIN 71 (***). Der Anteil der CD4⁺ T-Zellen in IL-15R α KO ist vergleichbar zum WT. Bei KIN 71R α und dKO erfolgt eine stärkere, jedoch nicht signifikante Reduktion dieser Zellpopulation. Die Anteile der B-Zellen sind in den IL-15R α defizienten Zellen verglichen zu WT und IL-15KO leicht erhöht.

In diesem Kapitel wurde festgestellt, dass sowohl IL-15 als auch IL-15R α Einfluss auf CD8⁺ T-Zellen und NK-Zellen im Blut haben, wobei der Einfluss von IL-15R α auf CD8⁺ T-Zellen stärker als auf NK-Zellen ist. CD4⁺ T-Zellen und B-Zellen bleiben hingegen von der Abwesenheit von IL-15R α und der Rekonstitution von IL-15 unbeeinflusst.

4.7. Effekte von IL-15/ IL-15R α auf die Zellen in der Milz

Die Milz als sekundäres lymphoides Organ stellt einen unverzichtbaren Teil bei der Regulation der angeborenen und adaptiven Immunität dar. Modulatorische Effekte in diesem Organ könnten somit als existentielle Grundlage autoimmuner Erkrankungen fungieren. Zur Analyse der lymphoiden Zellen aus der Milz wurde diese nach der Entnahme durch ein Sieb gerieben und die Erythrozyten lysiert. Da diese Zellen Teil eines weiteren Experiments waren, wurden diese für 6 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ mit Brefeldin A inkubiert und anschließend für die FACS-Analyse gefärbt und mit dem LSRII gemessen. Im Folgenden ist repräsentativ die Gating-Strategie zur Analyse der FACS-Färbungen der Milzzellen von einer C57Bl6 (WT) Maus dargestellt.

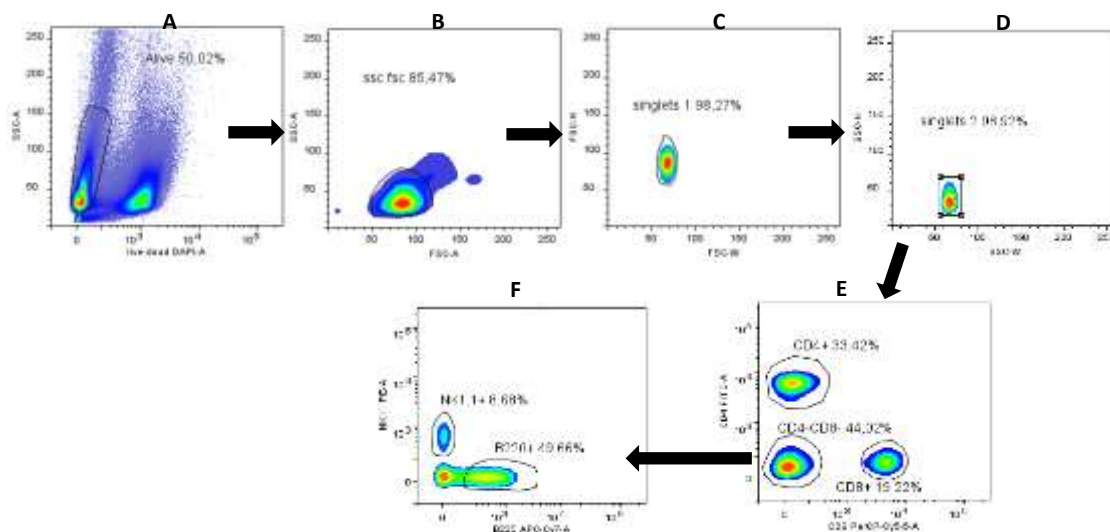


Abb. 44: Repräsentatives Gating für die FACS-Analyse der Milzzellen. **A:** Färbung der Zellen mit einem Lebend-Tot Farbstoff. **B:** Identifikation der lymphoiden Zellen mittels ssc-fsc-Gate. **C/D:** Ausschluss von Zellartefakten. **E:** Bestimmung der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen aus der „singlets2“ Population. **F:** Definition der NK- und B-Zellen aus der CD4⁺CD8⁻ Population.

Die toten Zellen werden aus der Analyse ausgeschlossen, da diese unspezifisch an Antikörper binden können, was zu falsch positiven Ereignissen führt. Mit Hilfe des ssc-fsc Gates erfolgt die Bestimmung der Lymphozyten anhand ihrer Größe und Granularität. Durch die darauffolgenden Gatings auf Singlets werden unter anderem Zellartefakte und Doubletten aus der Analyse eliminiert. Aus der erhaltenen Singletpopulation werden die CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen bestimmt. Um eine genauere Analyse zu ermöglichen erfolgt die Identifizierung der NK- und B-Zellen aus der CD4⁺CD8⁻-Population. Nach dieser Gating-Strategie wurde der prozentuale Anteil der CD4⁺, CD8⁺, NK (CD4⁻CD8⁻B220⁻NK1.1⁺) und B-Zellen (CD4⁻CD8⁻NK1.1⁻B220⁺) bestimmt und auf die Anteile in der Singletpopulation zurückgerechnet. Die Umrechnung auf die absolute Zellzahl pro Milz erfolgte Anhand der Verrechnung der so erhaltenen prozentualen Anteile der Population mit der nach der Aufarbeitung der Milzen ermittelten Gesamtzellzahl.

4.7.1. Einfluss von IL-15 auf die lymphoiden Zellen der Milz

Da neben den T-Zellen auch NK- und B-Zellen eine entscheidende Rolle in verschiedenen Autoimmunerkrankungen spielen und der Anteil dieser Zellen wichtige Parameter des Immunsystems sind, wurde untersucht, ob die Rekonstitution von IL-15 in den DCs in der Lage ist diese Zellen zu modulieren.

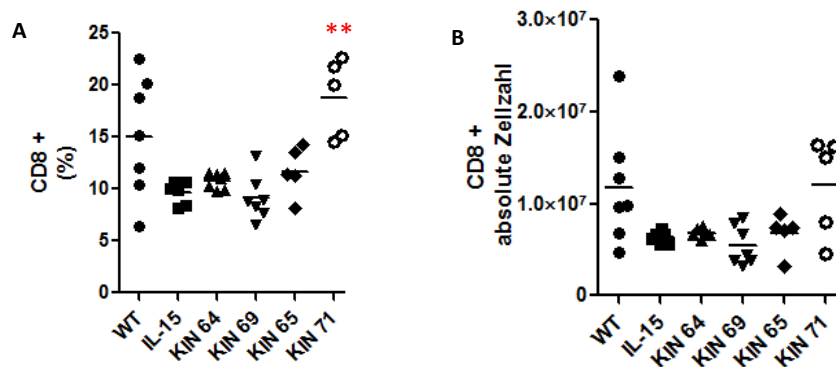


Abb. 45: Einfluss von IL-15 auf CD8⁺ T-Zellen in der Milz. **A:** Prozentualer Anteil der CD8⁺ T-Zellen. **B:** IL-15 abhängige absolute Zellzahl der CD8⁺ T-Zellen. Die entnommenen Milzen wurden filtriert, die Erythrozyten lysiert, mit Antikörpern gefärbt und mittels LSRII analysiert. Die Ermittlung der absoluten Zellzahl erfolgte anhand der Berechnung der prozentualen Anteile auf die nach der Aufarbeitung ermittelte Gesamtzellzahl. Dargestellt sind die jeweils gemessenen Werte sowie die Mittelwerte der Messungen. Die Berechnung der Signifikanzen erfolgte mittels one way ANOVA mit anschließendem Tukey-Test. Signifikanzen wurden zu IL-15KO (rot) berechnet (**=p≤0,01). n = 5-7

Der prozentuale Anteil der CD8⁺ T-Zellen in der Milz ist, verglichen zu den WT Tieren, bei IL-15KO, KIN 64, KIN 69 und KIN 65 reduziert. Der Anteil bei KIN 71 ist in Relation zu dem bei IL-15KO signifikant erhöht (**). Bei der Betrachtung der absoluten Zellzahl der CD8⁺ T-Zellen bleibt der durch die prozentuale Darstellung erhaltene Effekt von IL-15 bestehen. Durch eine größere Streuung der Werte unterscheiden sich diese hier jedoch nicht mehr signifikant voneinander.

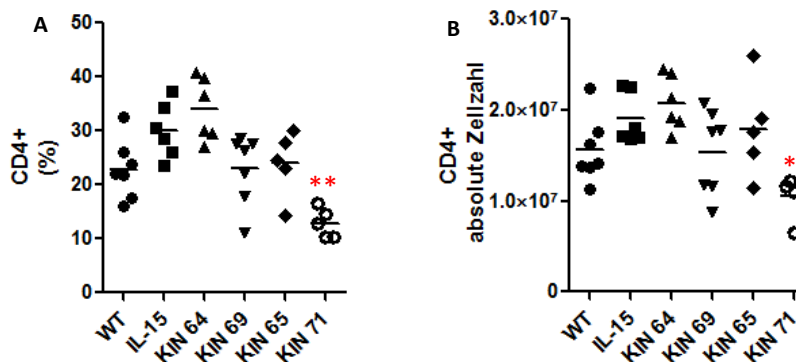


Abb. 46: Einfluss von IL-15 auf CD4⁺ T-Zellen in der Milz. **A:** Prozentualer Anteil der CD4⁺ T-Zellen. **B:** IL-15 abhängige absolute Zellzahl der CD4⁺ T-Zellen. Die entnommenen Milzen wurden filtriert, die Erythrozyten lysiert, mit Antikörpern gefärbt und mittels LSRII analysiert. Die Ermittlung der absoluten Zellzahl erfolgte anhand der Berechnung der prozentualen Anteile auf die nach der Aufarbeitung ermittelte Gesamtzellzahl. Dargestellt sind die jeweils gemessenen Werte sowie die Mittelwerte der Messungen. Die Berechnung der Signifikanzen erfolgte mittels one way ANOVA mit anschließendem Tukey-Test. Signifikanzen wurden zu IL-15KO (rot) berechnet (* = p≤0,05, ** = p≤0,01). n = 5-7

Der prozentuale Anteil an CD4⁺ T-Zellen ist in WT, KIN 69 und KIN 65 vergleichbar. In IL-15KO und KIN 64 ist der prozentuale Anteil der Zellen verglichen zu WT erhöht, während bei KIN 71 der Anteil dieser Zellen verglichen zu IL-15KO signifikant reduziert ist (**). Die Darstellung der absoluten Zellzahlen der CD4⁺ T-Zellen zeigt bei WT, IL-15KO, KIN 64, KIN 69 und KIN 65 einen mit der Darstellung der prozentualen Werte vergleichbaren Einfluss von IL-15. Die stärkere Streuung bei den absoluten Werten hat zur Folge, dass die signifikante Differenz zwischen IL-15KO und KIN 71 reduziert ist (*). Ein direkter Effekt von hohen Mengen an IL-15 auf CD4⁺ T-Zellen ist nicht bekannt. Grund für die signifikante Reduktion der CD4⁺ T-Zellen könnte der gleichzeitige starke Anstieg an CD8⁺ T-Zellen sein.

NK-Zellen sind eine sehr stark von IL-15 abhängige Zellpopulation. Ziel der Untersuchung dieser Zellen war es zu analysieren, ob durch die unterschiedlichen IL-15 Mengen in den KIN Mäusen eine Rekonstitution der NK-Zellen ermöglicht wird.

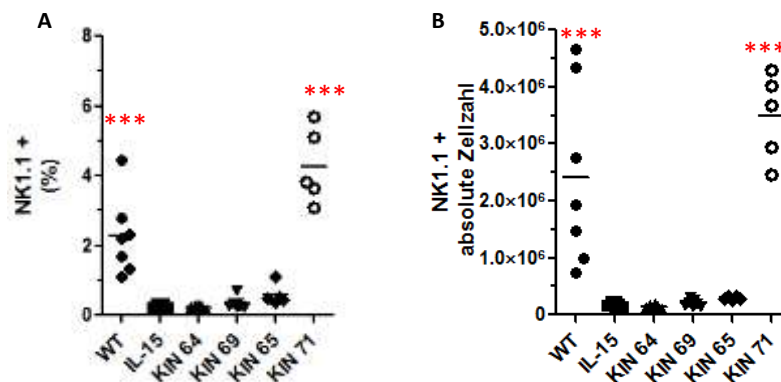


Abb. 47: Einfluss von IL-15 auf NK-Zellen in der Milz. A: Prozentualer Anteil der NK-Zellen. B: IL-15 abhängige absolute Zellzahl der NK-Zellen. Die entnommenen Milzen wurden filtriert, die Erythrozyten lysiert, mit Antikörpern gefärbt und mittels LSRII analysiert. Die Ermittlung der absoluten Zellzahl erfolgte anhand der Berechnung der prozentualen Anteile auf die nach der Aufarbeitung ermittelte Gesamtzellzahl. Dargestellt sind die jeweils gemessenen Werte sowie die Mittelwerte der Messungen. Die Berechnung der Signifikanzen erfolgte mittels one way ANOVA mit anschließendem Tukey-Test. Signifikanzen wurden zu IL-15KO (rot) berechnet (***)= $p \leq 0,001$). $n=5-7$

Der prozentuale Anteil und die absolute Zellzahl der NK-Zellen in WT und in KIN 71 sind verglichen zu IL-15KO deutlich signifikant erhöht (***). Die ermittelten Werte des prozentualen Anteils und der absoluten Zellzahl steigen von KIN 64 über KIN 69 und KIN 65 in geringem Maße an, zeigen aber keine signifikante Differenz zu IL-15KO.

Für B-Zellen ist kein direkter Effekt durch die Abwesenheit oder die Überexpression von IL-15 bekannt. Ziel der Analyse der B-Zellen war es herauszufinden, ob die unterschiedlichen Mengen an IL-15 in den KIN Stämmen direkten oder indirekten Einfluss auf diese ausüben können.

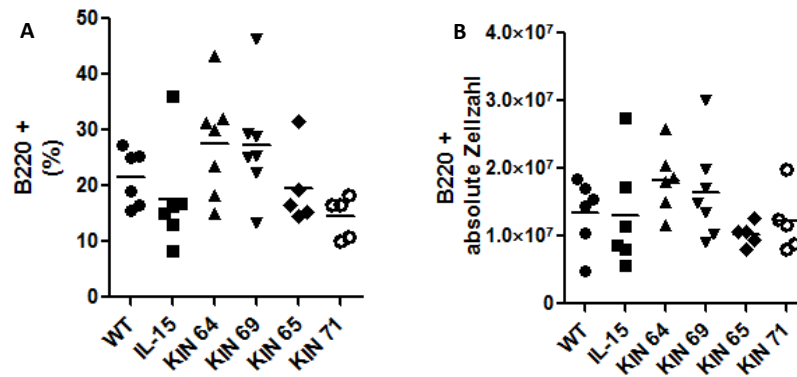


Abb. 48: Einfluss von IL-15 auf B-Zellen in der Milz. A: Prozentualer Anteil der B-Zellen. **B:** IL-15 abhängige absolute Zellzahl der B-Zellen. Die entnommenen Milzen wurden filtriert, die Erythrozyten lysiert, mit Antikörpern gefärbt und mittels LSRII analysiert. Die Ermittlung der absoluten Zellzahl erfolgte anhand der Berechnung der prozentualen Anteile auf die nach der Aufarbeitung ermittelte Gesamtzellzahl. Dargestellt sind die jeweils gemessenen Werte sowie die Mittelwerte der Messungen. Die Berechnung der Signifikanzen erfolgte mittels one way ANOVA mit anschließendem Tukey-Test. $n=5-7$

Verglichen zu dem WT sind bei der prozentualen Darstellung die B-Zellen in IL-15KO, KIN 65 und KIN 71 reduziert. Bei KIN 64 und KIN 69 kommt es dagegen zu einem Anstieg des prozentualen Anteils der B-Zellen. Bei der Darstellung der absoluten Zellzahl zeigen WT, IL-15KO und KIN 71 eine vergleichbare Präsenz an B-Zellen. Bei KIN 65 ist die Zellzahl der B-Zellen weiterhin reduziert. Ebenfalls ist auch die absolute Zellzahl von B-Zellen in KIN 64 und KIN 69 weiterhin leicht erhöht. Keiner der durch IL-15 beschriebenen Effekte auf B-Zellen ist signifikant.

4.7.2. Auswirkungen der Abwesenheit von IL-15R α auf die lymphoiden Zellen der Milz

In dem folgenden Kapitel sollten neben dem Effekt von IL-15 die Auswirkungen der Transpräsentation von IL-15 und IL15R α auf die lymphoiden Zellen der Milz an IL-15R α defizienten Mäusen untersucht werden. Zur Verdeutlichung des durch den fehlenden Rezeptor entstandenen Effektes wurden die bereits analysierten Daten von WT, IL-15KO und KIN 71 nochmals dargestellt.

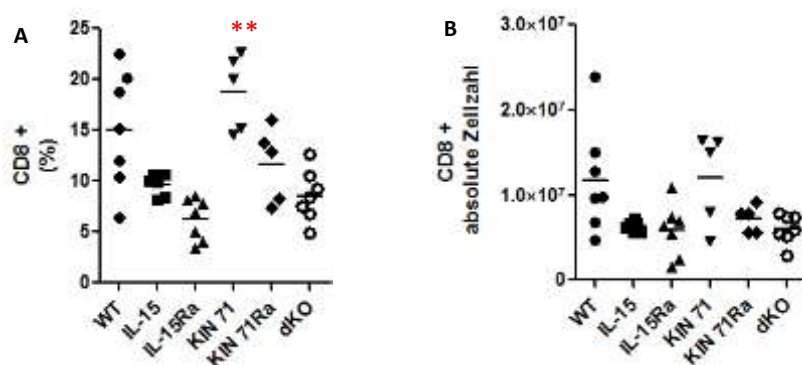


Abb. 49: Einfluss von IL-15R α auf CD8⁺ T-Zellen in der Milz. A: Prozentualer Anteil an CD8⁺ T-Zellen. **B:** IL-15R α abhängige absolute Zellzahl der CD8⁺ T-Zellen. Die entnommenen Milzen wurden filtriert, die Erythrozyten lysiert, mit Antikörpern gefärbt und mittels LSRII analysiert. Die Ermittlung der absoluten Zellzahl erfolgte anhand der Berechnung der prozentualen Anteile auf die nach der Aufarbeitung ermittelte Gesamtzellzahl. Dargestellt sind die jeweils gemessenen Werte sowie die Mittelwerte der Messungen. Die Berechnung der Signifikanzen erfolgte mittels one way ANOVA mit anschließendem Tukey-Test. Signifikanzen wurden zu IL-15KO (rot) berechnet (** = $p \leq 0,01$). $n = 5-7$

Das Fehlen des IL-15R α bewirkt bei IL-15R α und dKO eine, verglichen zu IL-15KO, Reduktion der prozentualen Anteile der CD8 $^+$ T-Zellen. Bei KIN 71R α ist dieser Anteil vergleichbar mit IL-15KO, was zeigt, dass neben IL-15 die gleichzeitige Expression des IL-15R α für die Rekonstitution von CD8 $^+$ T-Zellen benötigt wird. Die absoluten Zellzahlen der CD8 $^+$ T-Zellen sind in allen IL-15R α defizienten Stämmen vergleichbar mit IL-15KO.

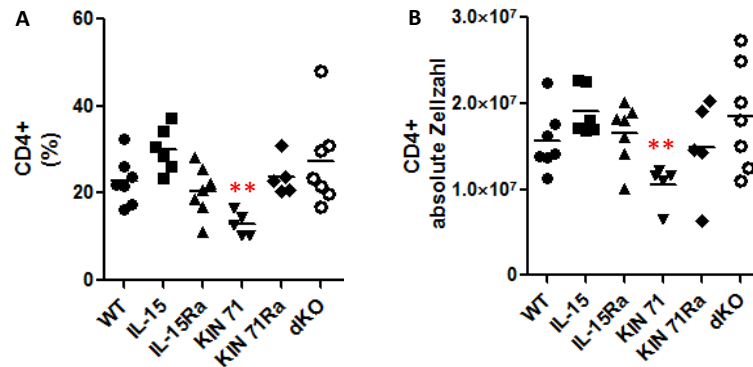


Abb. 50: Einfluss von IL-15R α auf CD4 $^+$ T-Zellen in der Milz. **A:** Prozentualer Anteil an CD4 $^+$ T-Zellen. **B:** IL-15R α abhängige absolute Zellzahl der CD4 $^+$ T-Zellen. Die entnommenen Milzen wurden filtriert, die Erythrozyten lysiert, mit Antikörpern gefärbt und mit dem LSR11 analysiert. Die Ermittlung der absoluten Zellzahl erfolgte anhand der Berechnung der prozentualen Anteile auf die nach der Aufarbeitung ermittelte Gesamtzellzahl. Dargestellt sind die jeweils gemessenen Werte sowie die Mittelwerte der Messungen. Die Berechnung der Signifikanzen erfolgte mittels one way ANOVA mit anschließendem Tukey-Test. Signifikanzen wurden zu IL-15KO (rot) berechnet (** = $p \leq 0,01$). $n = 5-7$

Sowohl die erhaltenen prozentualen Anteile als auch die berechneten absoluten Zellzahlen der CD4 $^+$ T-Zellen sind in den IL-15R α defizienten Stämmen (IL-15R α KO, KIN71R α , dKO) vergleichbar mit den Anteilen des WT. Die Reduktion der CD4 $^+$ T-Zellen in KIN 71 geht durch das Fehlen des IL-15R α verloren.

Als nächstes wurden die IL-15R α abhängigen Effekte auf die Anzahl der NK-Zellen in der Milz untersucht (Abb. 51).

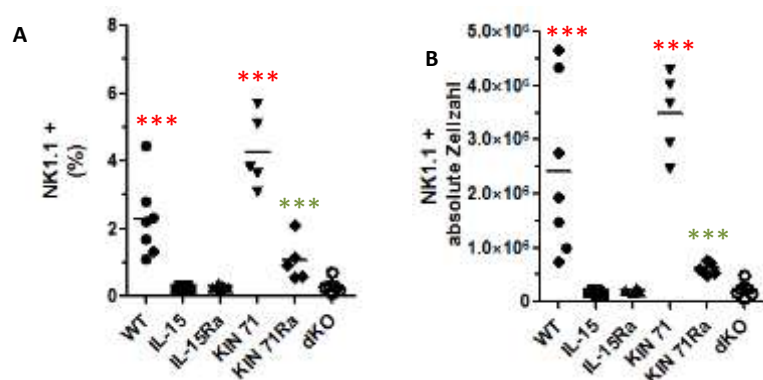


Abb. 51: Einfluss von IL-15R α auf die NK-Zellen der Milz. **A:** Prozentualer Anteil der NK-Zellen. **B:** IL-15R α abhängige absolute Zellzahl der NK-Zellen. Die entnommenen Milzen wurden filtriert, die Erythrozyten lysiert, mit Antikörpern gefärbt und mit dem LSR11 analysiert. Die Ermittlung der absoluten Zellzahl erfolgte anhand der Berechnung der prozentualen Anteile auf die nach der Aufarbeitung ermittelte Gesamtzellzahl. Dargestellt sind die jeweils gemessenen Werte sowie die Mittelwerte der Messungen. Die Berechnung der Signifikanzen erfolgte mittels one way ANOVA mit anschließendem Tukey-Test. Signifikanzen wurden zu IL-15KO (rot) sowie bei den IL-15R α defizienten Mäusen zu KIN 71 (grün) berechnet (***) = $p \leq 0,001$). $n = 5-7$

Die Abwesenheit von IL-15R α hat bei IL-15R α KO und dKO eine mit IL-15KO vergleichbare Reduktion der NK-Zellen zur Folge. Bei KIN 71R α ist die Reduktion der NK-Zellen schwächer ausgeprägt, zeigt aber durch die signifikante Differenz zu KIN 71 (***) , dass IL-15R α essentiell für die Rekonstitution von NK-Zellen ist. Gleichzeitig ist der Unterschied zu IL-15R α , dass hohe Mengen von IL-15 in KIN 71R α ohne die Trans-Präsentation in der Lage sind, NK-Zellen in der Milz partiell rekonstituieren zu können.

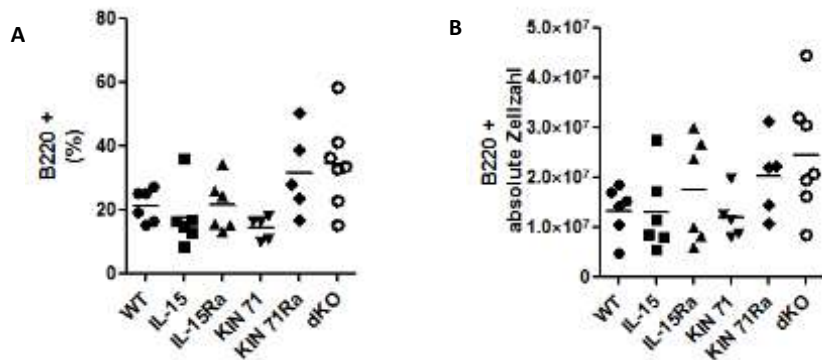


Abb. 52: Einfluss von IL-15R α auf die B-Zellen in der Milz. A: Prozentualer Anteil der B-Zellen. **B:** IL-15R α abhängige absolute Zellzahl der B-Zellen. Die entnommenen Milzen wurden filtriert, die Erythrozyten lysiert, mit Antikörpern gefärbt und mit dem LSRII analysiert. Die Ermittlung der absoluten Zellzahl erfolgte anhand der Berechnung der prozentualen Anteile auf die nach der Aufarbeitung ermittelte Gesamtzellzahl. Dargestellt sind die jeweils gemessenen Werte sowie die Mittelwerte der Messungen. Die Berechnung der Signifikanzen erfolgte mittels one way ANOVA mit anschließendem Tukey-Test. $n = 5-7$

Das Fehlen des IL-15R α hat in KIN71R α und dKO verglichen zu dem WT einen leichten Anstieg der B-Zell-Population zur Folge. In IL-15R α KO ist, verglichen zu WT und IL-15KO, kein durch den fehlenden Rezeptor α hervorgerufener Effekt erkennbar.

Die dargestellten Resultate zeigen, dass IL-15 abhängige CD8⁺ T-Zellen und NK-Zellen mit einer zelltypspezifischen Überexpression an IL-15 rekonstituiert werden können. Die Reduktion der CD4⁺ T-Zellen in KIN 71 ist IL-15R α spezifisch. Ansonsten werden die CD4⁺ T-Zellen sowie die B-Zellen in ihrer Quantität nicht von der Präsenz von IL-15/IL-15R α beeinflusst.

4.8. Einfluss von IL-15/IL-15R α auf die residenten Lymphozyten im Gehirn

Einerseits ist IL-15 in der Lage, die Blut-Hirn-Schranke zu überqueren. Zudem kann es lokal im Gehirn produziert werden. Deshalb wurden in dieser Arbeit die Effekte von IL-15/IL-15R α auf die Immunzellen des zentralen Nervensystems analysiert. Ziel dieser Versuchsreihe war es zu untersuchen, ob die unterschiedlichen Mengen von IL-15 in den KIN-Stämmen bereits in naiven Tieren zu einer Modulation der lymphoiden Zellen im Gehirn führen. Hierfür wurden die Gehirne erst enzymatisch verdaut und anschließend mit Hilfe eines Percoll-Gradienten die Granulozyten und größeren Interneurone entfernt. Die FACS-Analyse der Zellen erfolgte mit Hilfe des LSRII. In Abbildung 53 ist die repräsentative Gating-Strategie für die FACS-Analyse an einem WT dargestellt.

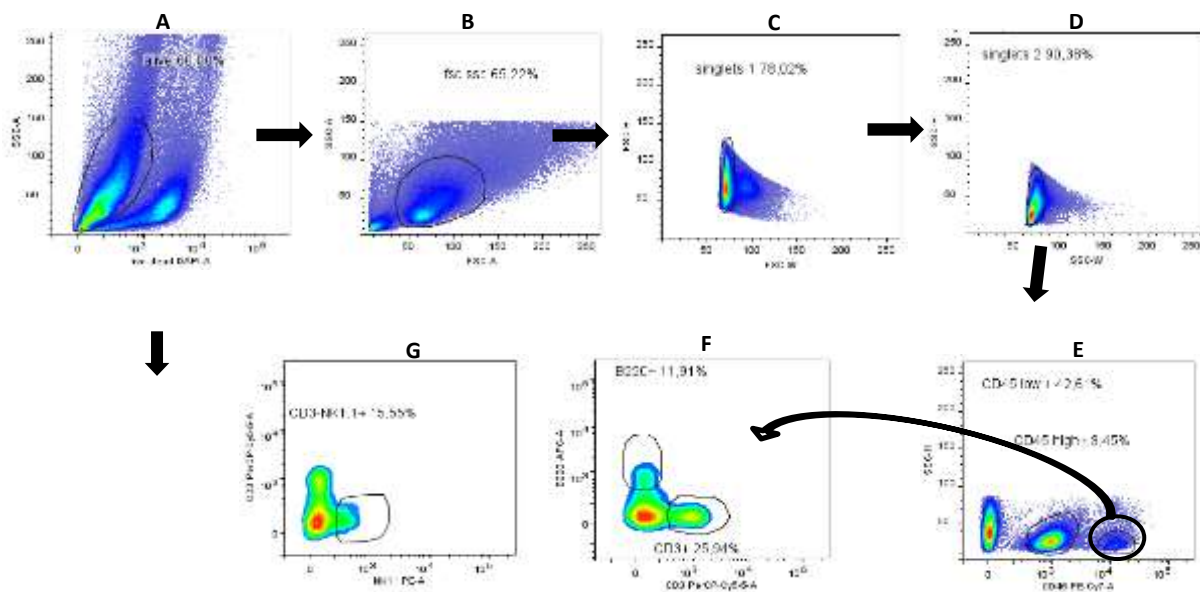


Abb. 53: Repräsentative Gating-Strategie der Analyse der Zellen des Gehirns. A: Färbung mit einem Lebend-Tot-Farbstoff. B: Festlegung der Lymphozyten mittels fsc-ssc Gate. C/D: Ausschluss von Artefakten und Doubletten. E: Bestimmung der CD45low⁺ und CD45high⁺ Populationen. F/G: Identifikation der CD3⁺, B220⁺ und der CD3⁺ NK1.1⁺ -Population aus dem CD45high⁺ Gate.

Bei der Analyse der residenten Lymphozyten im Gehirn werden mit Hilfe eines Lebend-Tot-Farbstoffs die toten Zellen aus der Analyse ausgeschlossen und im Anschluss die Lymphozyten Population anhand des fsc-ssc Gates bestimmt. Ausgehend von der „singlets2“-Population, die zum Ausschluss von Doubletten und Artefakten dient, werden die CD45low⁺ und CD45high⁺-Populationen bestimmt. Hierbei ist zu erwähnen, dass die CD45low⁺-Population die Mikrogliazellen und die CD45high⁺-Population die Lymphozyten darstellt [271]. Die Zusammensetzung der als Lymphozyten definierten Zellepopulation wird des Weiteren auf den prozentualen Anteil von CD3⁺, CD3⁻NK⁺ sowie B-Zellen untersucht.

Da die weitere Auflösung in CD8⁺ und CD4⁺ T-Zellen nach der verwendeten Aufreinigungsmethode nicht möglich war, konnten diese Zellen im Gehirn nicht analysiert werden.

4.8.1. Auswirkungen der Rekonstitution von IL-15 auf die residenten Lymphozyten im Gehirn

Um zu analysieren, ob die Rekonstitution von IL-15 in den IL-15 transgenen Stämmen die Lymphozyten im Gehirn quantitativ beeinflusst, erfolgt in Abbildung 55 die Darstellung der prozentualen Anteile sowie der absoluten Zellzahl aller im Gehirn residenten Lymphozyten (CD45^{high+}) in Abhängigkeit zu IL-15.

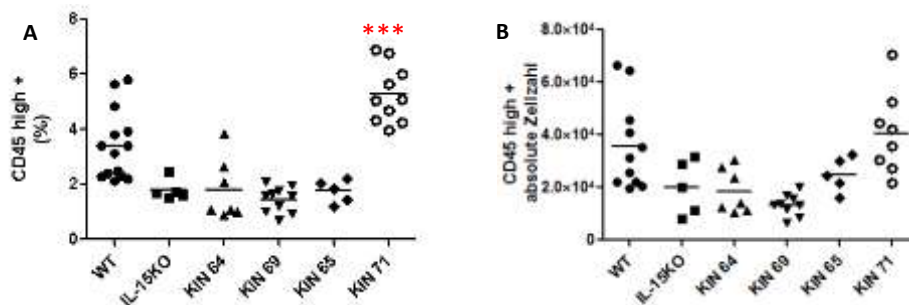


Abb. 54: Einfluss von IL-15 auf die Lymphozyten im Gehirn. A: Prozentualer Anteil der lymphoiden Zellen **B:** Ermittelte, absolute Zellzahl der lymphoiden Zellen. Die isolierten Gehirne wurden mit einem Skalpell zerkleinert und enzymatisch verdaut. Mittels eines Percoll-Gradienten wurden Granulozyten und größere Interneurone entfernt. Nach der Lyse der Erythrozyten wurden die Zellen mit Antikörpern gefärbt und mittels LSRII analysiert. Die Ermittlung der absoluten Zellzahl erfolgte anhand der Berechnung der prozentualen Anteile auf die nach der Aufarbeitung ermittelte Gesamtzellzahl. Dargestellt sind die jeweils gemessenen Werte sowie die Mittelwerte der Messungen. Die Berechnung der Signifikanzen erfolgte mittels one way ANOVA mit anschließendem Tukey-Test. Signifikanzen wurden zu IL-15KO (rot) berechnet (***) = $p \leq 0,001$. $n = 5-11$

Der prozentuale Anteil sowie die absolute Zellzahl der Lymphozyten im Gehirn sind bei IL-15KO, KIN 64, KIN 69 und KIN 65 vergleichbar und in Relation zu dem WT reduziert. Bei KIN 71 ist der prozentuale Anteil der Lymphozyten verglichen zu IL-15KO signifikant erhöht (***). Bei der Darstellung der absoluten Zellzahlen geht diese Signifikanz durch die größere Streuung der Werte verloren.

NK-Zellen spielen unter anderem aufgrund ihrer Produktion von Zytokinen eine wichtige Rolle bei der angeborenen Immunantwort. B-Zellen können in den unterschiedlichen Autoimmunerkrankungen unterschiedliche Rollen haben. Im Fall von MS wird vermutet, dass unter anderem B-Zellen für das Zustandekommen der Autoimmunität verantwortlich sind.

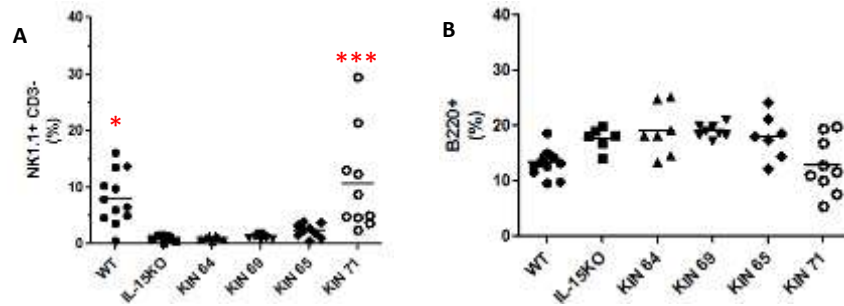


Abb. 55: Effekt der IL-15 Rekonstitution auf NK- und B-Zellen im Gehirn. A: Prozentualer Anteil der NK-Zellen. B: Prozentualer Anteil der B-Zellen. Die isolierten Gehirne wurden mit einem Skalpell zerkleinert und enzymatisch verdaut. Mittels eines Percoll-Gradienten wurden Granulozyten und größere Interneurone entfernt. Nach der Lyse der Erythrozyten wurden die Zellen mit Antikörpern gefärbt und mittels LSRII analysiert. Dargestellt sind die jeweils gemessenen Werte sowie die Mittelwerte der Messungen. Die Berechnung der Signifikanzen erfolgte mittels one way ANOVA mit anschließendem Tukey-Test. Signifikanzen wurden zu IL-15KO (rot) berechnet (* = $p \leq 0,05$, *** = $p \leq 0,001$). $n = 5-11$

Die Abwesenheit von IL-15 in IL-15KO führt verglichen mit dem WT zu einer signifikanten Reduktion des prozentualen Anteils der NK-Zellen (*). In KIN 71 ist der Anteil der NK-Zellen höher als bei den WT, was zu einer verstärkten signifikanten Differenz zu IL-15KO führt (***). Der Anteil der B-Zellen ist in KIN 64, KIN 69 und KIN 65 vergleichbar wie bei IL-15KO. In diesen Stämmen ist der prozentuale Anteil von B-Zellen im Gehirn verglichen zu dem WT geringfügig erhöht. Der Anteil der B-Zellen in KIN 71 ist vergleichbar mit denen des WT.

Das CD3-Antigen wird von T-Lymphozyten exprimiert und bildet mit den TCRs einen Komplex. Da es sich bei T-Lymphozyten um wichtige Mediatoren sowohl des angeborenen als auch des adaptiven Immunsystems handelt, wurden diese auch im Gehirn der IL-15 rekonstituierenden Tiere untersucht.

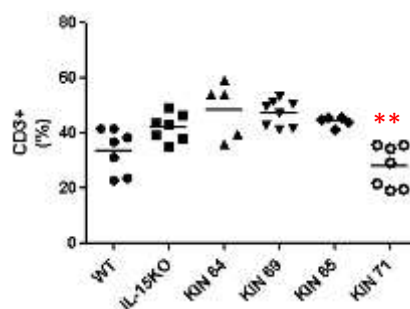


Abb. 56: Effekt von IL-15 auf T-Lymphozyten im Gehirn. Prozentualer Anteil der CD3⁺ Lymphozyten im Gehirn. Die isolierten Gehirne werden mit einem Skalpell zerkleinert und enzymatisch verdaut. Mittels eines Percoll-Gradienten werden Granulozyten und größere Interneurone entfernt. Nach der Lyse der Erythrozyten wurden die Zellen mit Antikörpern gefärbt und mittels LSRII analysiert. Dargestellt sind die jeweils gemessenen Werte sowie die Mittelwerte der Messungen. Die Berechnung der Signifikanzen erfolgte mittels one way ANOVA mit anschließendem Tukey-Test. Signifikanzen wurden zu IL-15KO (rot) berechnet. (** = $p \leq 0,01$) $n = 5-11$

Verglichen zu dem WT sind in IL-15KO, KIN 64, KIN 69 und KIN 65 die T-Lymphozyten geringfügig, jedoch nicht signifikant erhöht. Bei den KIN 71 Tieren kommt es verglichen zu IL-15KO zu einer signifikanten Reduktion des Anteils der T-Lymphozyten im Gehirn (**).

4.8.2. Einfluss von IL-15R α auf die residenten Lymphozyten im Gehirn

IL-15 passiert die Blut-Hirn-Schranke um im Gehirn mit dem IL-15R α zu binden. Ziel der folgenden Experimente war es, den Effekt auf die Lymphozyten im Gehirn zu analysieren, wenn die beschriebene Transpräsentation durch das Fehlen des IL-15R α nicht mehr möglich ist. Hierfür wird zuerst der Effekt auf die gesamte residente Lymphozyten Population im Gehirn untersucht. Zur Visualisierung des Effektes von IL-15R α werden die bereits analysierten Stämme WT, IL-15KO und KIN 71 nochmals dargestellt.

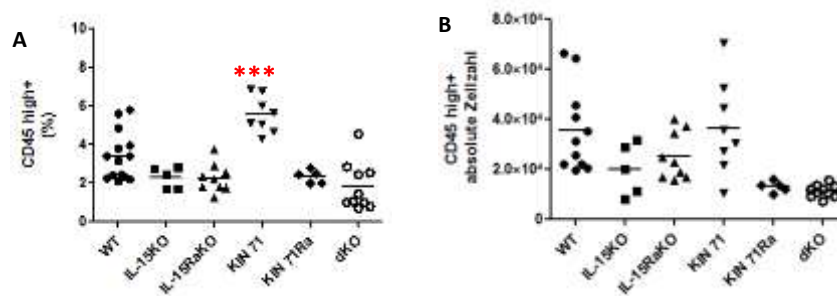


Abb. 57: Einfluss von IL-15R α auf die Lymphozyten im Gehirn. A: Prozentualer Anteil der Lymphozyten. **B:** Ermittelte absolute Zellzahl der Lymphozyten. Die isolierten Gehirne werden mit einem Skalpell zerkleinert und enzymatisch verdaut. Mittels eines Percoll-Gradienten werden Granulozyten und größere Interneurone entfernt. Nach der Lyse der Erythrozyten werden die Zellen mit Antikörpern gefärbt und mittels LSRII analysiert. Die Ermittlung der absoluten Zellzahl erfolgt anhand der Berechnung der prozentualen Anteile auf die nach der Aufarbeitung ermittelte Gesamtzellzahl. Dargestellt sind die jeweils gemessenen Werte sowie die Mittelwerte der Messungen. Die Berechnung der Signifikanzen erfolgte mittels one way ANOVA mit anschließendem Tukey-Test. Signifikanzen wurden zu IL-15KO (rot) berechnet (***) = $p \leq 0,001$). $n = 5-11$

Bei der prozentualen Darstellung sind die Anteile der residenten Lymphozyten in den IL-15R α defizienten Stämmen vergleichbar mit denen von IL-15KO. In IL-15R α KO ist die absolute Zellzahl zu IL-15KO leicht erhöht. Bei KIN 71R α und dKO sind diese verglichen zu IL-15KO nicht signifikant reduziert.

Die Transpräsentation ist ein essentieller Mechanismus für die Aktivierung lymphoider Zellen, weshalb auch die NK- und B-Zellen sowie die T-Lymphozyten auf ihre Modifizierbarkeit durch die nicht mehr mögliche Transpräsentation untersucht werden.

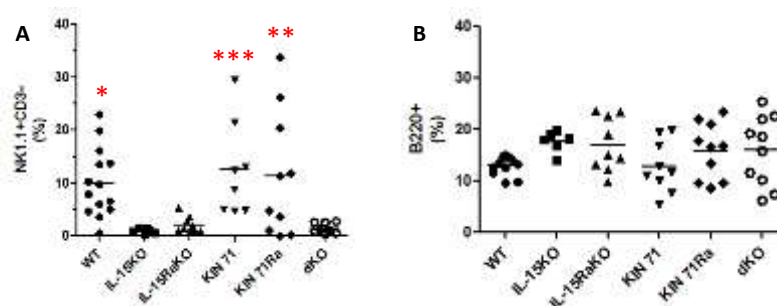


Abb. 58: Einfluss von IL-15R α auf NK- und B-Zellen im Gehirn. A: Prozentualer Anteil der NK-Zellen. **B:** Anteil der B-Zellen. Die isolierten Gehirne werden mit einem Skalpell zerkleinert und enzymatisch verdaut. Mittels eines Percoll-Gradienten werden Granulozyten und größere Interneurone entfernt. Nach der Lyse der Erythrozyten wurden die Zellen mit Antikörpern gefärbt und mittels LSRII analysiert. Dargestellt sind die jeweils gemessenen Werte sowie die Mittelwerte der Messungen. Die Berechnung der Signifikanzen erfolgte mittels one way ANOVA mit anschließendem Tukey-Test. Signifikanzen wurden zu IL-15KO (rot) berechnet (* = $p \leq 0,05$, ** = $p \leq 0,01$, *** = $p \leq 0,001$). $n = 5-11$

Der Anteil der NK-Zellen im Gehirn ist in IL-15R α KO und dKO ähnlich wie in IL-15KO. In KIN 71R α ist der NK-Anteil verglichen zu KIN 71 leicht reduziert, zu IL-15KO dennoch signifikant erhöht (**), was darauf schließen lässt, dass zur vollständigen Rekonstitution von NK-Zellen sowohl IL-15 als auch IL-15R α benötigt werden. Die Anteile der B-Zellen sind in den IL-15R α defizienten Stämmen (IL-15R α KO, KIN 71R α , dKO) vergleichbar mit IL-15KO.

Der Einfluss des fehlenden IL-15R α auf die T-Lymphozyten ist in Abbildung 59 dargestellt.

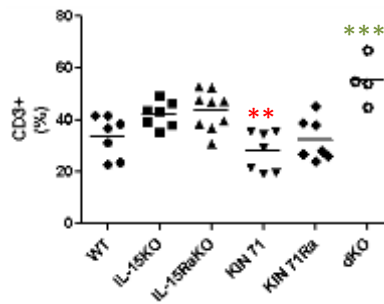


Abb. 59: Einfluss von IL-15R α auf T-Lymphozyten im Gehirn. Quantitative Analyse der CD3⁺ T-Lymphozyten. Die isolierten Gehirne werden mit einem Skalpell zerkleinert und enzymatisch verdaut. Mittels eines Percoll-Gradienten werden Granulozyten und größere Interneurone entfernt. Nach der Lyse der Erythrozyten wurden die Zellen mit Antikörpern gefärbt und mittels LSRII analysiert. Dargestellt sind die jeweils gemessenen Werte sowie die Mittelwerte der Messungen. Die Berechnung der Signifikanzen erfolgte mittels one way ANOVA mit anschließendem Tukey-Test. Signifikanzen wurden zu IL-15KO (rot) sowie bei den IL-15R α defizienten Mäusen zu KIN 71 (grün) berechnet (** = $p \leq 0,01$, *** = $p \leq 0,001$). $n = 5-11$

Der Anteil der T-Lymphozyten im Gehirn ist in IL-15KO und IL-15R α KO vergleichbar. Das Fehlen des Rezeptors hat bei KIN 71R α eine Aufhebung des signifikanten Effektes in KIN 71 zur Folge, was darauf schließen lässt, dass CD3⁺ T-Lymphozyten sowohl von IL-15 als auch von IL-15R α gleichermaßen beeinflusst werden. Wird in den Tieren weder IL-15, noch IL-15R α (dKO) produziert, führt dies verglichen zu IL-15KO zu einer schwachen, nicht signifikanten Erhöhung des Anteils der T-Lymphozyten. Verglichen zu KIN 71 ist der Anteil der T-Lymphozyten hingegen stark signifikant erhöht (***).

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Lymphozyten im Gehirn sowohl von IL-15 als auch von IL-15R α beeinflusst werden. Zudem hat die Anwesenheit von IL-15 auf NK-Zellen einen stärkeren Einfluss als IL-15R α . Sowohl IL-15 als auch IL-15R α beeinflussen die Expression von CD3⁺ T-Lymphozyten quantitativ. B-Zellen werden weder von IL-15 noch von IL-15R α direkt beeinflusst.

4.8.3. Einfluss der Rekonstitution von IL-15/IL-15R α auf die Mikroglia

Mikroglia kommen in allen Regionen des Gehirns vor. Die genaue Funktion dieser Zellen ist nicht in allen Details bekannt, jedoch weiß man, dass Mikroglia unter anderem die Immunzellen des zentralen Nervensystems darstellen und in dieser Position unter anderem als APCs fungieren können. Als APCs können Mikroglia eine wichtige Rolle bei der Aktivierung von Lymphozyten im Gehirn spielen, was der Grund für die Analyse des Einflusses von IL-15 und IL-15R α auf diese Zellen war.

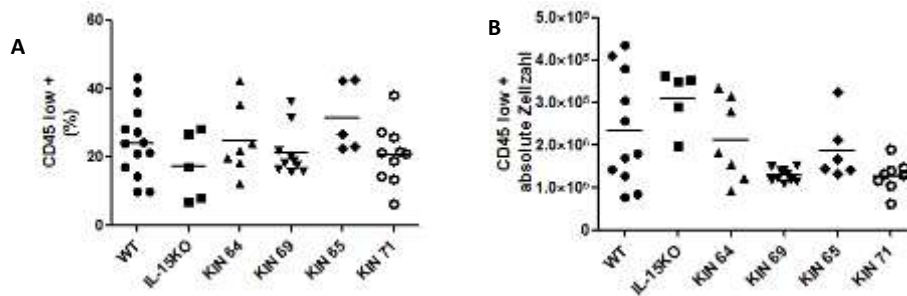


Abb. 60: Einfluss der Rekonstitution von IL-15 auf die Mikroglia im Gehirn. A: Prozentualer Anteil der Mikroglia-Zellen. **B:** Ermittelte absolute Zellzahl der Mikroglia. Die isolierten Gehirne werden mit einem Skalpell zerkleinert und enzymatisch verdaut. Mittels eines Percoll-Gradienten werden Granulozyten und größere Interneurone entfernt. Nach der Lyse der Erythrozyten wurden die Zellen mit Antikörpern gefärbt und mittels LSRII analysiert. Die Ermittlung der absoluten Zellzahl erfolgte anhand der Berechnung der prozentualen Anteile auf die nach der Aufarbeitung ermittelte Gesamtzellzahl. *Dargestellt sind die jeweils gemessenen Werte sowie die Mittelwerte der Messungen. Die Berechnung der Signifikanzen erfolgte mittels one way ANOVA mit anschließendem Tukey-Test. n = 5-11*

Die prozentualen Anteile der Mikroglia in WT, KIN 64, KIN 69 und KIN 71 sind untereinander vergleichbar. In IL-15KO ist der Anteil der Mikroglia am geringsten, in KIN 65 am höchsten. Die absolute Zellzahl ist bei dem WT, KIN 64 und KIN 65 vergleichbar. In KIN 69 und KIN 71 können die geringsten und in IL-15KO die höchsten Gesamtzahlen von Mikroglia-Zellen detektiert werden.

Zur Analyse des quantitativen Effekts der Transpräsentation auf Mikroglia ist in Abbildung 61 der Anteil der Mikroglia in Abwesenheit von IL-15R α dargestellt. Um diesen Effekt besser visualisieren zu können werden die bereits analysierten Daten von WT, IL-15KO und KIN 71 nochmals gezeigt.

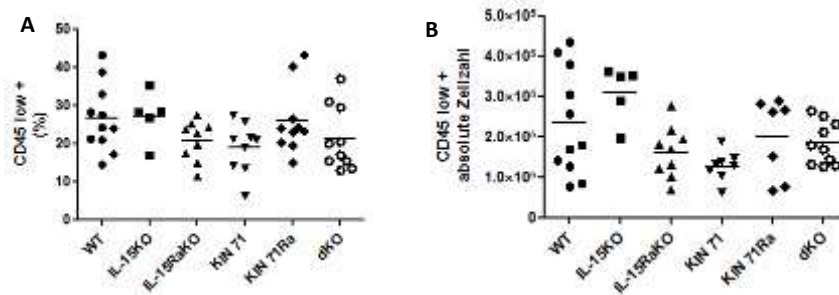


Abb. 61: Einfluss der Präsenz von IL-15R α auf die Mikroglia im Gehirn. A: Prozentualer Anteil der Mikroglia. **B:** Absolute Zellzahl der Mikroglia. Die isolierten Gehirne werden mit einem Skalpell zerkleinert und enzymatisch verdaut. Mittels eines Percoll-Gradienten werden Granulozyten und größere Interneurone entfernt. Nach der Lyse der Erythrozyten wurden die Zellen mit Antikörpern gefärbt und mittels LSRII analysiert. Die Ermittlung der absoluten Zellzahl erfolgte anhand der Berechnung der prozentualen Anteile auf die nach der Aufarbeitung ermittelte Gesamtzellzahl. Dargestellt sind die jeweils gemessenen Werte sowie die Mittelwerte der Messungen. Die Berechnung der Signifikanzen erfolgte mittels one way ANOVA mit anschließendem Tukey-Test. $n=5-11$

Der prozentuale Anteil der Mikroglia ist in den IL-15R α defizienten Stämmen (IL-15R α , KIN 71R α und dKO) vergleichbar zu WT und IL-15KO. Bei der Analyse der absoluten Zellzahl ist der Anteil der Mikroglia in den IL-15R α defizienten Stämmen vergleichbar mit KIN 71.

Es konnten keine durch die Rekonstitution von IL-15 entstandenen Effekte auf die Mikroglia detektiert werden. Ebenso hat auch die Abwesenheit von IL-15R α in den gezeigten Experimenten keinen quantitativen Effekt auf die Mikroglia im Gehirn.

4.9. Untersuchung der IL-15/IL-15R α abhängigen Effekte in der Experimentellen Autoimmunen Enzephalomyelitis

4.9.1. Einfluss der Rekonstitution von IL-15 auf den Krankheitsverlauf der Experimentellen Autoimmunen Enzephalomyelitis

Die Tiere wurden vom Tag der Immunisierung an für 50 Tage beobachtet. In den Stämmen IL-15KO, IL-15R α KO und KIN 71 kam es durch die Schwere der Erkrankung häufig zu Ausfällen. Es wurden nur Tiere mit in die Grafik genommen, die bis zu Tag 26 nach der Immunisierung nicht abgetötet werden mussten. Nach Tag 26 häuften sich die Ausfälle, weshalb der Krankheitsverlauf nur bis zu diesem Tag dargestellt wird. In der folgenden Grafik ist der Einfluss von IL-15 auf den Krankheitsverlauf der EAE zu sehen.

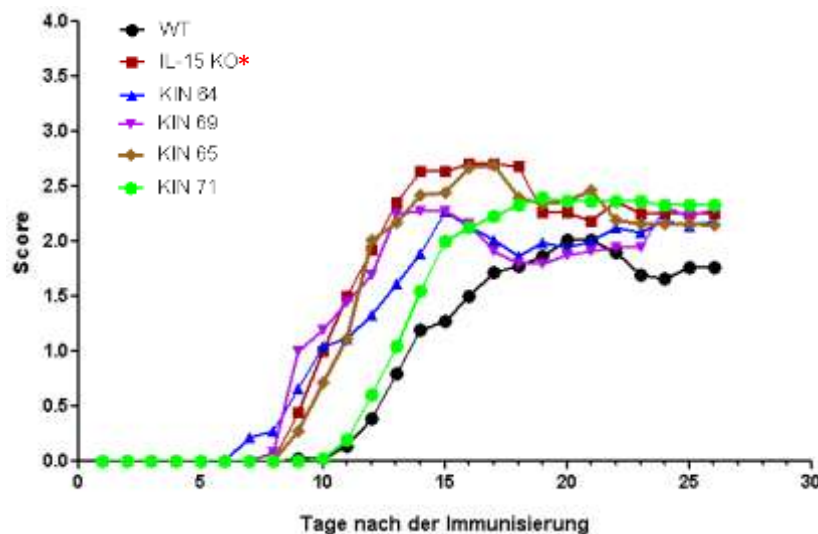


Abb. 62: Effekt von IL-15 auf den Krankheitsverlauf der EAE. Klinischer Score in Abhängigkeit von IL-15 bis Tag 26 nach der Immunisierung. Gezeigt sind die Mittelwerte der Gruppen. An Tag 0 wurde den Mäusen eine MOG5-35-55-Peptid-Freunds-Adjuvans-Emulsion subcutan injiziert. 2-4 Stunden nach dieser Injektion wurde den Mäusen intravenös Pertussis-Toxin in die Schwanzvene injiziert. An Tag 2 erfolgte eine Wiederholung dieser intravenösen Injektion. Es folgte die Analyse des Krankheitsverlaufs der Tiere für 50 Tage. Dargestellt sind die Mittelwerte der ermittelten Scorings. Die Berechnung der Signifikanzen erfolgte anhand des Kruskal-Wallis-Tests. Signifikanzen wurden zu dem WT (rot) berechnet (* = $p \leq 0,05$). $n = 6-12$

Verglichen an dem Krankheitsverlauf des WT ist der Verlauf der Krankheit in allen untersuchten genetisch modifizierten Tieren stärker. Bei KIN 64 bricht die Erkrankung zuerst aus, im Vergleich zu IL-15KO, KIN 69 und KIN 65 verläuft sie hier allerdings abgeschwächt. KIN 69 erkrankt als nächstes, hier ist der klinische Score zu Beginn der Erkrankung verglichen zu KIN 64 verschlechtert, ist aber ab Tag 17 auf einem vergleichbaren Niveau. Bei IL-15KO und KIN 65 treten am gleichen Tag die ersten Symptome der Erkrankung auf, welche bis Tag 17 in beiden Stämmen vergleichbar ansteigen, sich anschließend verbessern und dann konstant auf dem gleichen Niveau bleiben. Bei IL-15KO verläuft die Erkrankung etwas stärker, was dazu führt, dass nur der Krankheitsverlauf dieser Tiere sich von dem der WT signifikant unterscheidet(*). KIN 71 ist der einzige Stamm, bei dem die ersten Symptome später als bei den WT-Tieren auftreten. Bis Tag 14 nach der Immunisierung ist der Krankheitsverlauf von WT und KIN 71 ähnlich. Während sich der Grad der Erkrankung ab Tag 15 bei KIN 71 weiterhin verschlechtert flacht dieser bei dem WT ab. Lediglich in KIN 71 sind die Tiere nicht in der Lage, sich bis Tag 26 von dem Peak der Erkrankung zu erholen.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass die Rekonstitution von IL-15, verglichen zu dem WT, keinen positiven Effekt auf den Krankheitsverlauf hat. In keinem der genetisch modifizierten Stämme war es möglich, einen schwächeren Verlauf der Erkrankung als bei den WT-Tieren zu erlangen.

4.9.2. Änderung des Krankheitsverlaufes bedingt durch die Absenz von IL-15R α

Um die Rolle der Transpräsentation in dem verwendeten Tiermodell EAE zu analysieren, wurden ebenfalls IL-15R α defiziente Tiere (IL-15R α KO, KIN 71R α und dKO) immunisiert und deren Krankheitsverlauf 50 Tage lang beobachtet. Um den Einfluss des Rezeptors zu verdeutlichen, werden in folgender Grafik der bereits analysierte Krankheitsverlauf der Stämme WT, IL-15KO und KIN 71 nochmals dargestellt.

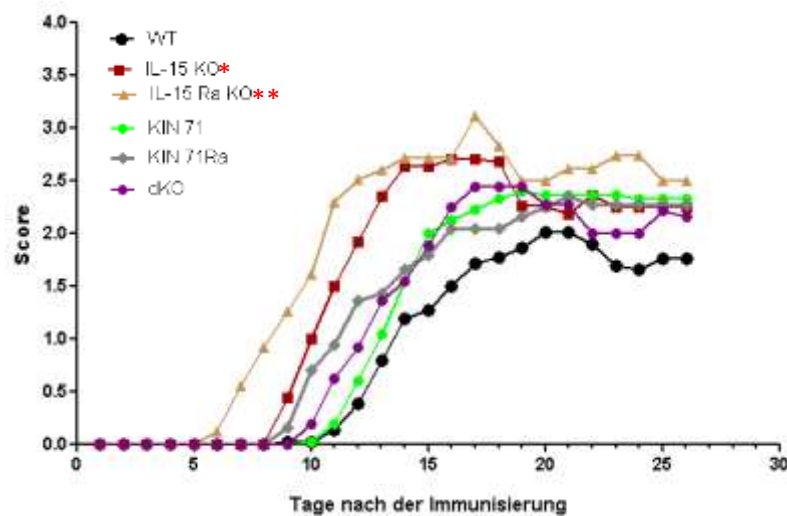


Abb. 63: Einfluss von IL-15R α auf den Krankheitsverlauf der EAE. Von IL-15R α abhängiger klinischer Score bis Tag 26 nach der Immunisierung. Dargestellt sind die Mittelwerte der Gruppen. An Tag 0 wurde den Mäusen eine MOG5-³⁵⁻⁵⁵-Peptid-Freunds-Adjuvans-Emulsion subcutan injiziert. 2-4 Stunden nach dieser Injektion wurde den Mäusen intravenös Pertussis-Toxin in die Schwanzvene injiziert. An Tag 2 erfolgte eine Wiederholung dieser intravenösen Injektion. Es folgte die Analyse des Krankheitsverlaufs der Tiere für 50 Tage. Dargestellt sind die Mittelwerte der ermittelten Scorings. Die Berechnung der Signifikanzen erfolgte anhand des Kruskal-Wallis-Tests. Signifikanzen wurden zu dem WT (rot) berechnet (* = $p \leq 0,05$, ** = $p \leq 0,01$). $n = 6-12$

Die ersten Krankheitssymptome treten, mit deutlichem Abstand zu allen anderen Stämmen, bei IL-15R α KO auf, was auch zu einer signifikanten Differenz zu den WT Tieren führt (**). Darüber hinaus zeigt sich bei diesen Tieren der stärkste Krankheitsverlauf mit dem höchsten Score, der an Tag 17 nach der Immunisierung erreicht wird. Ab Tag 17 erholen sich die Tiere geringfügig. Abgesehen davon, dass sich bei den KIN 71R α schon zu einem früheren Zeitpunkt die ersten Krankheitssymptome zeigen, verläuft die Erkrankung in KIN 71 und KIN 71R α mit vergleichbaren Symptomen, wobei beide Stämme nicht in der Lage sind, sich von dem Peak der Erkrankung zu erholen. Der Verlauf der Erkrankung ist bei dKO mit KIN 71 und KIN 71R α vergleichbar, allerdings sind hier die Tiere in der Lage, sich nach dem Peak von der Erkrankung zu erholen.

Abschließend kann man sagen, dass sowohl die Modulation der IL-15 Expression als auch der fehlende IL-15R α sich negativ auf die Symptomatik der Erkrankung auswirken, wobei IL-15R α einen stärkeren Einfluss hat.

4.9.3. IL-15 abhängige Überlebensrate der Tiere

Neben dem Krankheitsverlauf ist die Anzahl der überlebenden Tiere ein wichtiger Parameter um die Schwere der EAE zu bestimmen. Zur Bestimmung der Überlebensrate wurden die Tiere nach der Immunisierung 50 Tage lang beobachtet. Tiere, die aufgrund ihrer hohen Erkrankung oder starken Gewichtsverlustes (über 20%) abgetötet werden mussten, fließen in diese Darstellung mit ein. Abbildung 64 zeigt das Überleben der Tiere in Abhängigkeit zu IL-15.

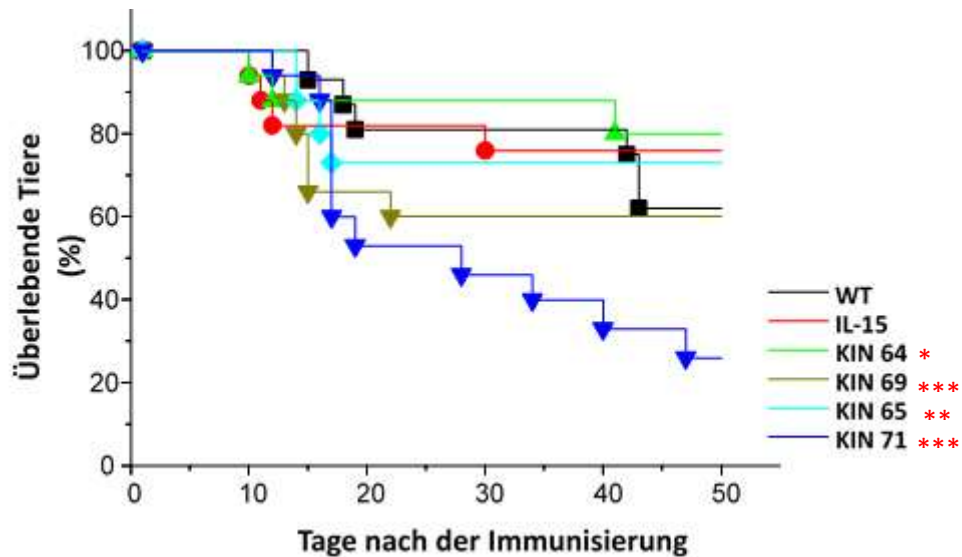


Abb. 64: Einfluss von IL-15 auf das Überleben der immunisierten Tiere. Prozentualer Anteil der lebenden Tiere pro Tag nach der Immunisierung. An Tag 0 wurde den Mäusen eine MOG³⁵⁻⁵⁵-Peptid-Freunds-Adjuvans-Emulsion subcutan injiziert. 2-4 Stunden nach dieser Injektion wurde den Mäusen intravenös Pertussis-Toxin in die Schwanzvene injiziert. An Tag 2 erfolgte eine Wiederholung dieser intravenösen Injektion. Es folgte die Analyse des Krankheitsverlaufs der Tiere für 50 Tage. Dargestellt sind die Mittelwerte der ermittelten Scorings. Die Berechnung der Signifikanzen erfolgte anhand des Kruskal-Wallis-Tests. Signifikanzen wurden zu dem WT (rot) berechnet (* = $p \leq 0,05$, ** = $p \leq 0,01$, *** = $p \leq 0,001$). $n = 12$

Zu Beginn der Erkrankung müssen nur wenige WT Tiere abgetötet werden. Dies ändert sich ab Tag 42, sodass nur 62% den Versuch überleben. Bei den IL-15KO und den KIN 64 Tieren müssen verglichen zu dem WT schon früher Tiere abgetötet werden, jedoch überleben verglichen zu dem WT mehr Tiere bis zu dem Versuchsende (ca. 80%). Bei den KIN 65 Tieren müssen bis zu Tag 19 Tiere abgetötet werden, danach verläuft die Erkrankung schwächer, sodass keine Tiere mehr getötet werden müssen. Bei den KIN 69 Tieren müssen bis Tag 20 40% der Tiere abgetötet werden. Nach Tag 20 verläuft die Krankheit in diesem Stamm nicht mehr so stark, sodass keine Tiere mehr getötet werden müssen. Bei KIN 71 müssen im Laufe des Versuchs aufgrund der Schwere der Erkrankung die meisten Tiere abgetötet werden. Hier Überleben nur 23% bis zum Versuchsende.

4.9.4. Überleben der immunisierten Tiere in Abhängigkeit zu IL-15R α

Um den Effekt der Trans-Präsentation auch auf das Überleben während der Versuchsdauer analysieren zu können wurden auch bei den IL-15R α defizienten Tieren das Überleben dokumentiert. Um diesen Effekt zu verdeutlichen, werden in Abbildung 65 die bereits analysierten Daten von WT, IL-15KO und KIN 71 nochmals dargestellt.

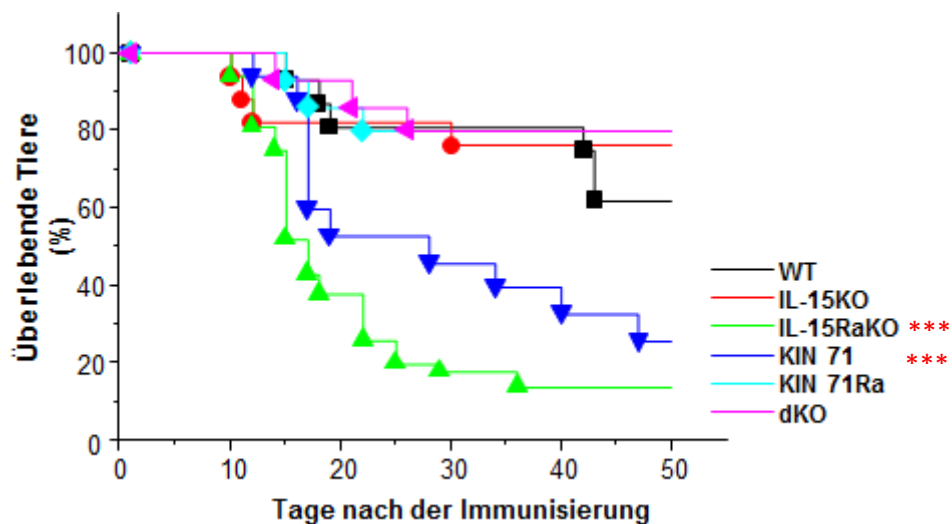


Abb. 65: Einfluss von IL-15R α auf das Überleben der immunisierten Tiere. Prozentualer Anteil der lebenden Tiere pro Tag nach der Immunisierung. An Tag 0 wurde den Mäusen eine MOG⁵³⁵⁻⁵⁵-Peptid-Freunds-Adjuvans-Emulsion subcutan injiziert. 2-4 Stunden nach dieser Injektion wurde den Mäusen intravenös Pertussis-Toxin in die Schwanzvene injiziert. An Tag 2 erfolgte eine Wiederholung dieser intravenösen Injektion. Es folgte die Analyse des Krankheitsverlaufs der Tiere für 50 Tage. Dargestellt sind die Mittelwerte der ermittelten Scorings. Die Berechnung der Signifikanzen erfolgte anhand des Kruskal-Wallis-Tests. Signifikanzen wurden zu dem WT (rot) berechnet (***) = $p \leq 0,001$. $n = 12$

Die Menge der überlebenden Tiere ist bei den dKO Tieren vergleichbar mit den IL-15KO Tieren. Die IL-15R α KO Tiere müssen ab Tag 10 der Erkrankung abgetötet werden. Ab Tag 36 sind nur noch 16% der IL-15R α KO Tiere am Leben. Bei diesen Tieren ist die Überlebensrate am geringsten.

Zusammenfassend kann man sagen, dass kein dosisabhängiger Effekt von IL-15 auf das Überleben der Tiere besteht. Die Abwesenheit von IL-15R α beeinflusst das Überleben der Tiere hingegen negativ.

4.9.5. Beeinflussung wichtiger klinischer Parameter durch IL-15/IL-15R α

Um den Einfluss von IL-15 und IL-15R α besser beurteilen zu können, sind in folgender Tabelle die wichtigsten Parameter für die Bestimmung der Schwere der EAE-Erkrankung für die verwendeten Stämme für die kompletten 50 Tage der Versuche zusammengefasst.

Stamm	erkrankte Tiere (%)	Mortalität (%)	Ausbruch der Krankheit (Tag)	höchster klinischer Score (Peak)	Tag des Peaks
WT	80	34	9 (\pm 1)	2,01	20 (\pm 2)
IL-15	84	34	9 (\pm 2)	2,71*	14 (\pm 3)
IL-15R α	100	65	6* (\pm 1)	3,11**	17 (\pm 4)
KIN 64	84	28	7 (\pm 2)	2,28	15 (\pm 1)
KIN 69	100	37	8 (\pm 1)	2,31	15 (\pm 3)
KIN 65	100	32	9 (\pm 3)	2,69	17 (\pm 1)
KIN 71	98	73	10 (\pm 2)	2,36	19 (\pm 2)
KIN 71R α	94	24	9 (\pm 2)	2,35	21 (\pm 2)
dKO	94	17	10(\pm 2)	2,45	17 (\pm 1)

Tab. 11: Wichtige Parameter zur Analyse des Effekts von IL-15 und IL-15R α auf den Krankheitsverlauf von EAE. An Tag 0 wurde den Mäusen eine MOG³⁵⁻⁵⁵-Peptid-Freunds-Adjuvans-Emulsion subcutan injiziert. 2-4 Stunden nach dieser Injektion wurde den Mäusen intravenös Pertussis-Toxin in die Schwanzvene injiziert. An Tag 2 erfolgte eine Wiederholung dieser intravenösen Injektion. Es folgte die Analyse des Krankheitsverlaufs der Tiere für 50 Tage. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte. Die Berechnung der Signifikanzen erfolgte anhand des Kruskal-Wallis-Tests. Signifikanzen wurden zu dem WT (rot) berechnet (* = $p \leq 0,05$, ** = $p \leq 0,01$). $n = 12$

In der Spalte „erkrankte Tiere“ ist dargestellt, wie viele von den immunisierten Tieren tatsächlich Krankheitssymptome entwickelt haben. Lediglich bei den Stämmen IL-15R α KO, KIN 69 und KIN 65 zeigten alle behandelten Tiere nach der Immunisierung tatsächlich Krankheitssymptome. Die behandelten WT-Tiere zeigten die geringste Inzidenz nach der Immunisierung. Die Mortalität beschreibt, wie viele Tiere während des Versuchs aufgrund von zu starker Entwicklung der Erkrankungssymptome oder zu starkem Gewichtsverlust abgetötet werden mussten. Hierbei musste jeweils am häufigsten bei Tieren der Stämme IL-15R α KO und KIN 71 der Versuch frühzeitig durch die Erlösung der Tiere abgebrochen werden. Die Stämme dKO, KIN 71R α , KIN 64 und KIN 65 weisen verglichen zu dem WT und IL-15KO eine reduzierte Mortalität während des Versuchs auf. In den Stämmen IL-15R α KO, KIN 64 und KIN 69 zeigen sich die ersten Krankheitssymptome verglichen zum WT schon früher. Lediglich bei KIN 71 und dKO treten die ersten Erkrankungssymptome erst später als bei dem WT auf, was zu einer signifikanten Differenz zu IL-15R α KO führt(*). Auch der Peak der Erkrankung tritt in den untersuchten Stämmen zu unterschiedlichen Zeitpunkten auf. Bei IL-15R α KO zeigen sich die stärksten Krankheitssymptome. Darauf folgen IL-15KO, KIN 65 und dKO. Ebenso war auch der Peak der Erkrankung in fast allen Stämmen zu einem früheren Zeitpunkt erreicht als bei den WT. Lediglich in KIN 71R α wurde dieser Peak erst einen Tag später als bei den WT-Tieren erreicht.

Zusammenfassend kann man sagen, dass IL-15R α als negativer Regulator fungiert, da es bei defizienten Tieren zu einem früheren Auftreten von Krankheitssymptomen kommt und der Krankheitsverlauf stärker ist. IL-15 fungiert ebenfalls als negativer Regulator, welcher aber einen geringeren Einfluss auf die Erkrankung hat als IL-15R α . Sind große Mengen an IL-15 vorhanden (KIN 71) dann ist die protektive Wirkung zu Beginn der Erkrankung abhängig von IL-15R α , da dieser Effekt in KIN 71R α nicht mehr zu sehen ist. Sind weder IL-15, noch IL-15R α (dKO) vorhanden, ähnelt der Verlauf der Symptomatik der erkrankten Tiere am nächsten dem der WT-Tiere.

4.10. Charakterisierung von Lymphozyten im Blut der Mäuse nach der Induktion der Experimentellen Autoimmunen Enzephalomyelitis

Die Analyse des Parameters Blut erfolgte bereits zu einem früheren Zeitpunkt der vorliegenden Dissertation an gesunden Tieren. Um den Einfluss der Immunisierung der Tiere auf die Zusammensetzung der Lymphozyten im Blut zu analysieren, wurde dies an Tag 15 nach der Immunisierung untersucht. Der Zeitpunkt der Analyse des Blutes wurde kurz nach dem erwarteten Peak der Erkrankung gewählt, da die im Blut lokalisierten Lymphozyten durch die Überquerung der Blut-Hirn-Schranke Einfluss auf die Lymphozyten im Gehirn haben könnten. Für die Analyse wurden die wie bereits für die naiven Tiere ausführlich beschrieben aufgearbeiteten Zellen mit Antikörpern gefärbt und unter Verwendung des LSRII gemessen sowie die Größe der entsprechenden Populationen analog zu den naiven Tieren bestimmt.

4.10.1. IL-15-bedingte Änderungen der lymphoiden Zellen im Blut immunisierter Tiere

In der folgenden Abbildung ist der Einfluss von IL-15 auf die lymphoiden Zellen im Blut bei immunisierten Tieren dargestellt.

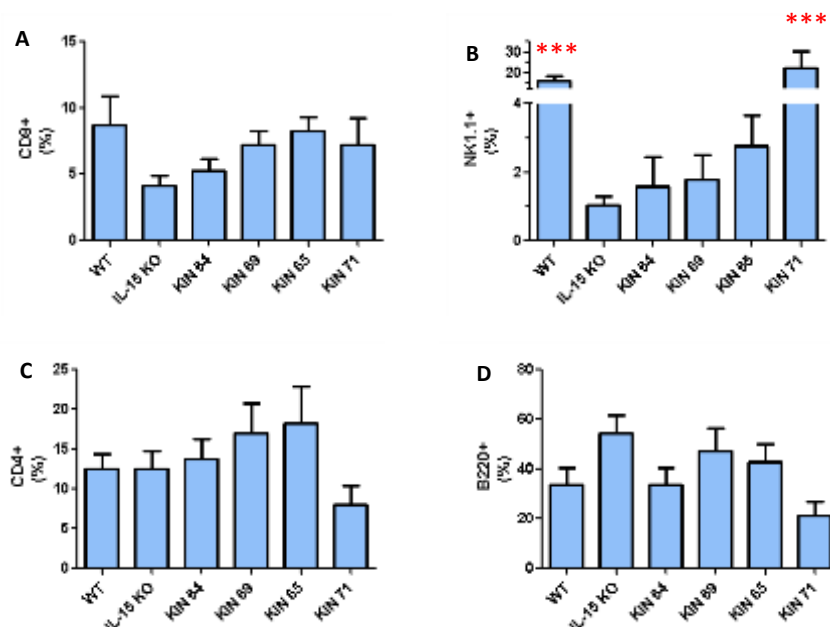


Abb. 66: Einfluss von IL-15 auf die Lymphozyten im Blut immunisierter Tiere. A: Einfluss auf CD8⁺ T-Zellen. **B:** Anteil der NK-Zellen. **C:** CD4⁺ T-Zellen. **D:** B-Zellen. Nach der Entnahme wurden die Erythrozyten aus dem Blut lysiert und die Zellen mit Antikörpern gefärbt. Die Messung erfolgte mittels LSRII. Dargestellt sind die Mittelwerte sowie die Standardabweichungen der gemessenen Daten. Die Berechnung der Signifikanzen erfolgte mittels one way ANOVA mit anschließendem Tukey-Test. Signifikanzen wurden zu IL-15KO (rot) berechnet (***) = $p \leq 0,001$, $n = 4-11$

Nach der Immunisierung führt die Abwesenheit von IL-15 (IL-15KO) weiterhin zur Reduktion der CD8⁺ T-Zellen im Blut. Von KIN 64 über KIN 69 zu KIN 65 kommt es zu einer Erhöhung des Anteils der CD8⁺ T-Zellen. In KIN 71 ist der Anteil der CD8⁺ T-Zellen vergleichbar mit KIN 69. In den immunisierten Tieren. Der Anteil der NK-Zellen ist in IL-15KO verglichen zu dem WT signifikant reduziert (***) und kann durch die Erhöhung der Menge an IL-15 in den KIN-Stämmen (KIN 64, KIN 69, KIN 65 und KIN 71) in KIN 71 vollständig rekonstituiert werden (**). Die CD4⁺ T-Lymphozyten sind bei den immunisierten KIN 71 Tieren nicht signifikant reduziert, was durch die vergrößerte Population der NK-Zellen entstanden sein kann. Hierauf wird in der Diskussion genauer eingegangen. Die prozentualen Anteile der B-Zellen sind in IL-15KO, KIN 69 und KIN 65 verglichen zu dem WT geringfügig, jedoch nicht signifikant erhöht. Die Anteile in KIN 64 und KIN 71 sind vergleichbar mit denen in dem WT.

4.10.2. Effekt von IL-15R α auf die Lymphozyten im Blut immunisierter Tiere

Abbildung 67 stellt den Einfluss der Transpräsentation durch den fehlenden IL-15R α auf die untersuchten Lymphozyten Populationen dar. Zur Verdeutlichung des durch die Transpräsentation entstandenen Effektes werden die bereits analysierten Daten von WT, IL-15KO und KIN 71 nochmals aufgeführt.

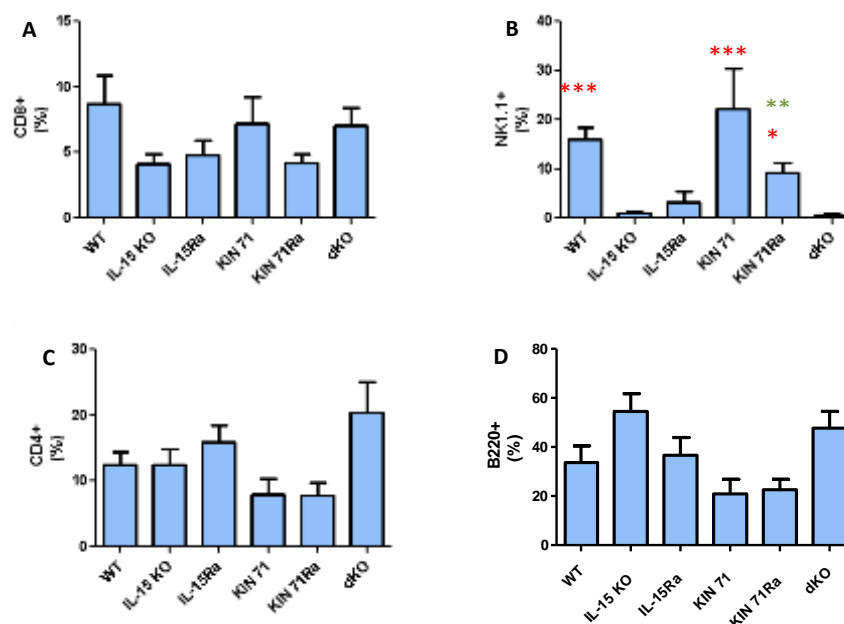


Abb. 67: Einfluss von IL-15R α auf Lymphozyten im Blut immunisierter Tiere. **A:** Einfluss auf CD8⁺ T-Zellen. **B:** IL-15R α bedingte Änderungen der NK-Population. **C:** Effekt auf CD4⁺ T-Zellen. **D:** Einfluss auf B-Zellen. Nach der Entnahme wurden die Erythrozyten aus dem Blut lysiert und die Zellen mit Antikörpern gefärbt. Die Messung erfolgte mittels LSRII. Dargestellt sind die Mittelwerte sowie die Standardabweichungen der gemessenen Daten. Die Berechnung der Signifikanzen erfolgte mittels one way ANOVA mit anschließendem Tukey-Test. Signifikanzen wurden zu IL-15KO (rot) sowie zu KIN 71 (grün) berechnet (* = $p \leq 0,05$, ** = $p \leq 0,01$, *** = $p \leq 0,001$). $n = 4-11$

Die Abwesenheit von IL-15R α in IL-15R α KO und KIN 71R α hat eine mit IL-15KO vergleichbare nicht signifikante Reduktion der CD8⁺ T-Lymphozyten zur Folge. Fehlt neben IL-15R α auch IL-15 (dKO) ist der Anteil der CD8⁺ T-Zellen vergleichbar mit dem bei den KIN 71-Tieren. In IL-15R α KO und dKO ist die Menge der NK-Zellen bei immunisierten Tieren vergleichbar niedrig mit der von IL-15KO. Bei KIN 71R α hat der fehlende Rezeptor eine signifikante Reduktion des Anteils der NK-Zellen verglichen zu KIN 71 zur Folge (**), dennoch sind hier die NK-Zellen verglichen zu IL-15KO noch signifikant erhöht (*). Der Anteil der CD4⁺ T-Zellen ist in KIN 71 und KIN 71R α in Relation zu den WT-Tieren vergleichbar reduziert.

In IL-15R α KO und dKO ist der Anteil der CD4⁺ T-Zellen ähnlich dem in WT und IL-15KO. Der Anteil der B-Zellen ist ebenfalls in KIN 71 und KIN 71R α vergleichbar nicht signifikant zu dem WT reduziert. Darüber hinaus zeigen IL-15R α KO und der WT, sowie IL-15KO und dKO vergleichbare Mengen an B-Zellen.

Abschließend kann man sagen, dass nach der Immunisierung IL-15 und IL-15R α lediglich die NK-Zellen quantitativ beeinflussen, wobei die Mengen der CD8⁺ und CD4⁺ T-Lymphozyten sowie der B-Zellen von der Präsenz von IL-15 oder IL-15R α nicht beeinflusst werden.

4.10.2. Krankheitsbedingte quantitative Änderungen der Lymphozyten im Blut

In dem folgenden Kapitel wurde untersucht, ob die Immunisierung der Tiere eine Veränderung des Einflusses von IL-15 und IL-15R α auf die Lymphozyten im Blut zur Folge hat. Hierfür wurden die Mittelwerte der bereits ausführlich analysierten Anteile der Lymphozyten im Blut sowohl von naiven als auch von immunisierten Tieren in Relation gesetzt, wobei der Mittelwert der naiven Tiere gleich eins gesetzt wurde.

4.10.3. Durch die autoimmune Erkrankung hervorgerufene quantitative Änderungen der Blutlymphozyten in Abhängigkeit von IL-15

Abbildung 68 stellt die durch die Immunisierung der Tiere hervorgerufenen quantitativen Veränderungen in ausgewählten Lymphozyten Populationen des Blutes in Abhängigkeit zu IL-15 dar.

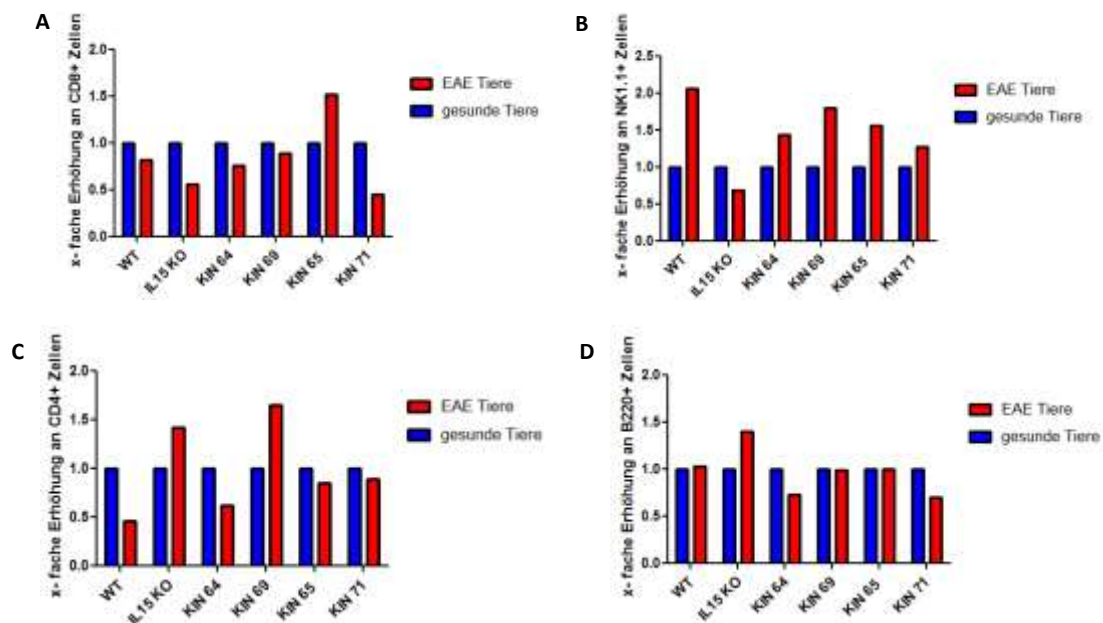


Abb. 68: EAE bedingte quantitative Änderungen der Lymphozyten im Blut in Abhängigkeit von IL-15. A: Änderungen bei CD8⁺ T-Zellen. B: Effekt auf NK-Zellen. C: CD4⁺ T-Zellen. D: B-Zellen. Nach der Entnahme wurden die Erythrozyten aus dem Blut lysiert und die Zellen mit Antikörpern gefärbt. Die Messung erfolgte mittels LSRII. Dargestellt ist durch die Immunisierung bedingt emittlere Veränderung der absoluten Zellzahl. n = 4-12

Die Immunisierung der Tiere bewirkt bei dem WT, IL-15KO, KIN 64 und KIN 69 eine vergleichbare Reduktion des Anteils der CD8⁺ T-Zellen. In KIN 71 sind die CD8⁺ T-Zellen verglichen zu den naiven Tieren auf ungefähr die Hälfte reduziert. Bei den KIN 65 Tieren bewirkt die Immunisierung einen Anstieg der CD8⁺ T-Zellen auf das 1,5 fache von naiven Tieren dieses Stammes. In den immunisierten WT-Tieren ist der Anteil der NK-Zellen auf die doppelte Menge von naiven Tieren angestiegen. Bei

KIN 64, KIN 69, KIN 65 und KIN 71 sind die NK-Zellen ebenfalls stärker exprimiert, was allerdings schwächer ausgeprägt als bei WT Tieren ist. Nur bei den IL-15 defizienten Tieren (IL-15KO) ist durch die Erkrankung der Tiere der Anteil der NK-Zellen reduziert. Die Anteile der CD4⁺ T-Zellen sind durch die Immunisierung der Tiere in WT, KIN 64, KIN 65 und KIN 71 um bis auf die Hälfte von naiven Tieren reduziert. Bei den IL-15KO und KIN 69 ist die Bildung der CD4⁺ T-Zellen nach der Immunisierung um bis zu dem 1,7fachen der naiven Tiere verstärkt. Der Anteil der B-Zellen im Blut wird bei WT, KIN 69 und KIN 65 von der Immunisierung nicht beeinflusst. In KIN 64 und KIN 71 hat die Immunisierung eine Reduktion der B-Zellen auf das 0,75 fache von naiven Tieren zu Folge. Bei den IL-15KO Tieren sind in den immunisierten Tieren die B-Zellen auf das 1,5 fache von naiven Tieren angestiegen.

4.10.4. Durch die Immunisierung hervorgerufene Änderungen im Blut in Abhängigkeit von IL-15R α

Neben dem Effekt von IL-15 sollte auch der Einfluss der Transpräsentation während der Erkrankung von IL-15R α defizienten Tieren im Blut untersucht werden. In Abbildung 69 sind die durch die Immunisierung entstandenen Effekte auf die Blutlymphozyten in Abhängigkeit von IL-15R α dargestellt. Zur Verdeutlichung der Effekte des Rezeptors werden die bereits analysierten Daten der Stämme WT, IL-15KO und KIN 71 nochmals gezeigt.

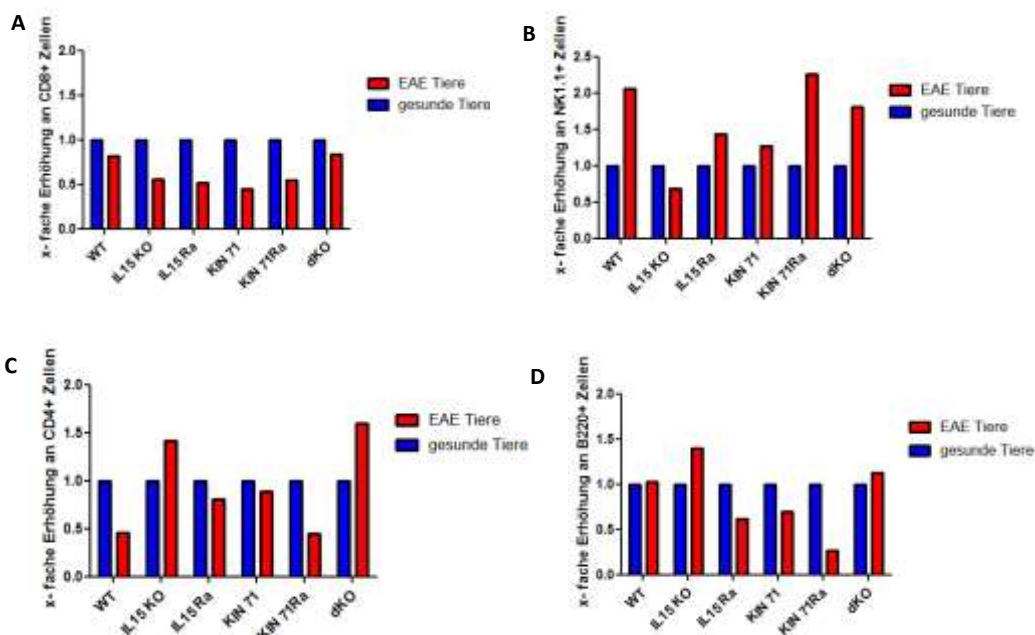


Abb. 69: EAE bedingte Änderungen der Lymphozyten Populationen im Blut in Abhängigkeit von IL-15R α . A: Effekt auf CD8⁺ T-Zellen. B: Effekt auf NK-Zellen. C: Beeinflussung der CD4⁺ T-Zellen. D: Änderungen der B-Zell Population. Nach der Entnahme wurden die Erythrozyten aus dem Blut lysiert und die Zellen mit Antikörpern gefärbt. Die Messung erfolgte mittels LSRII. Dargestellt ist die mittlere Erhöhung der absoluten Zellzahl. n = 4-12

Die Immunisierung bewirkt bei IL-15R α KO und KIN 71R α eine Reduktion der CD8⁺ T-Zellen, welche mit der bei den in den IL-15KO Tieren beobachteten vergleichbar ist. Bei den dKO Tieren ist die Reduktion der CD8⁺ T-Zellen vergleichbar mit dem WT. Das Fehlen des Rezeptors bewirkt bei IL-15R α KO einen nicht signifikanten Anstieg der NK Population, welche mit KIN 71 vergleichbar ist. In KIN 71R α hat sich der Anteil der NK-Zellen nach der Immunisierung mehr als verdoppelt. Bei den dKO Tieren bewirkt die Immunisierung zwar auch einen Anstieg des Anteils der NK-Zellen, jedoch ist in diesen Tieren der Anteil der NK-Zellen so stark reduziert, dass dieser scheinbar durch die Immunisierung entstandene Anstieg

der NK-Zellen durch die Varianz der Messtechnik entstanden sein kann. In KIN 71R α Tieren bewirkt die Immunisierung, ähnlich wie bei den WT, eine Halbierung des Anteils der CD4⁺ T-Zellen. Bei IL-15R α KO führt die Immunisierung zu einer schwachen Reduktion der CD4⁺ T-Zellen, die mit der in KIN 71 beschriebenen Reduktion verglichen werden kann. Ausschließlich in den dKO Tieren kommt es zu einem krankheitsbedingten, nicht signifikanten Anstieg der CD4⁺ T-Zellen auf das 1,6 fache von naiven Tieren. Die durch die Immunisierung hervorgerufene Reduktion der B-Zellen in IL-15R α KO ist vergleichbar mit der in KIN 71 beschriebenen. Bei KIN 71R α ist der Anteil der B-Zellen im Blut bedingt durch die Immunisierung reduziert. Bei Tieren, die weder IL-15 noch IL-15R α (dKO) exprimieren, werden die B-Zellen durch die Immunisierung quantitativ nicht beeinflusst.

Die dargestellten Resultate lassen darauf schließen, dass sowohl IL-15 als auch IL-15R α eine entscheidende Rolle bei der Regulation von NK- und B-Zellen in immunisierten Tieren haben.

4.10.5. Charakterisierung der Zusammensetzung der Lymphozytenpopulationen in der Milz immunisierter Mäuse

Die Untersuchung der Zusammensetzung der Lymphozytenpopulation in der Milz erfolgte vorerst an naiven Tieren (4.7.1.). Um den Einfluss der Immunisierung mit MOG₃₅₋₅₅ und der somit verbundenen EAE-Induktion auf die Zusammensetzung der Lymphozyten in der Milz zu analysieren, wurden die Milzen an Tag 50 nach der Immunisierung entnommen, wie beschrieben aufgearbeitet, mit Antikörpern gefärbt und abschließend die durchflusszytometrische Messung anhand des LSRII vollzogen. Für die Auswertung der hierdurch erhaltenen FACS-Daten wurde die bereits in 3.5. für die naiven Tiere ausführlich beschriebene *Gating*-Strategie verwendet.

4.10.6. IL-15-bedingte Änderungen der lymphoiden Zellen in der Milz immunisierter Mäuse

Die Zusammensetzung der Lymphozyten in der Milz naiver Tiere wurde analysiert um herauszufinden, in wie fern das durch die CD11c⁺-Zellen gebildete IL-15 die Lymphozyten beeinflusst und ob eine Rekonstitution der einzelnen Populationen in den KIN-Stämmen möglich ist. Jetzt soll untersucht werden, ob die Erkrankung der Tiere Einfluss auf die Rekonstitution der Zellen hat und ob die rekonstituierten Zellen wiederum die Erkrankung der Tiere beeinflussen. Da CD8⁺- und CD4⁺ T-Lymphozyten eine tragende Rolle in der MS/EAE und weiteren autoimmunen Erkrankungen spielen und die Differenzierung der CD8⁺ T-Zellen zudem stark abhängig von IL-15 ist, wurden in Abbildung 70 die prozentualen Anteile sowie die absolute Zellzahl dieser T-Lymphozyten in immunisierten Tieren in Abhängigkeit zu IL-15 genauer betrachtet.

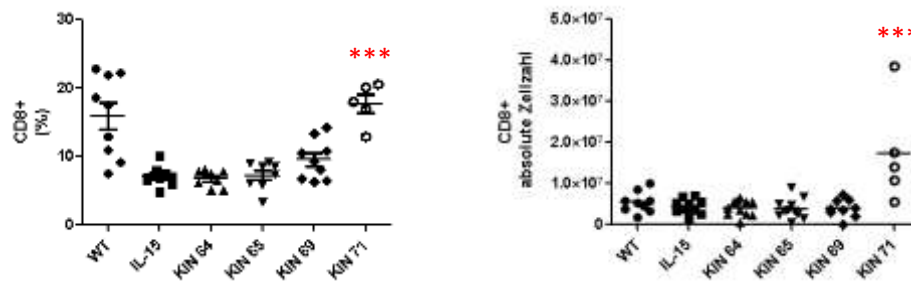


Abb. 70: Effekt von IL-15 auf CD8⁺ T-Lymphozyten in der Milz immunisierter Tiere. Prozentualer Anteil sowie absolute Zellzahl der CD8⁺ T-Zellen. Die entnommenen Milzen wurden filtriert, die Erythrozyten lysiert, mit Antikörpern gefärbt und mit dem LSR II analysiert. Die Ermittlung der absoluten Zellzahl erfolgte anhand der Berechnung der prozentualen Anteile auf die nach der Aufarbeitung ermittelte Gesamtzellzahl. Die Berechnung der Signifikanzen erfolgte mittels one way ANOVA mit anschließendem Tukey-Test. Signifikanzen wurden zu IL-15KO (rot) berechnet (***) = $p \leq 0,001$. $n = 5-11$

Wie auch schon bei den naiven Tieren beobachtet, ist bei den immunisierten Tieren der prozentuale Anteil der CD8⁺ T-Lymphozyten in KIN 71 verglichen zu IL-15KO signifikant erhöht (***). Auch bei der Betrachtung der absoluten Zellzahl bleibt dieser Effekt bestehen (***). Die Menge der CD8⁺ T-Lymphozyten ist in WT, KIN 64, KIN 69 und KIN 65 sowohl in der prozentualen Darstellung als auch in der Darstellung der absoluten Zellzahlen vergleichbar zu IL-15KO.

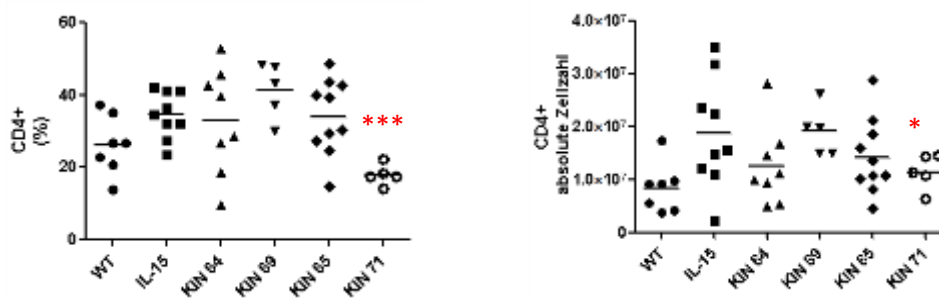


Abb. 71: Effekt von IL-15 auf CD4⁺ T-Lymphozyten in der Milz immunisierter Tiere. Prozentualer Anteil sowie absolute Zellzahl der CD4⁺ T-Zellen. Die entnommenen Milzen wurden filtriert, die Erythrozyten lysiert, mit Antikörpern gefärbt und mit dem LSR II analysiert. Die Ermittlung der absoluten Zellzahl erfolgte anhand der Berechnung der prozentualen Anteile auf die nach der Aufarbeitung ermittelte Gesamtzellzahl. Die Berechnung der Signifikanzen erfolgte mittels one way ANOVA mit anschließendem Tukey-Test. Signifikanzen wurden zu IL-15KO (rot) berechnet (* = $p \leq 0,05$, *** = $p \leq 0,001$) $n = 5-11$

Die Population der CD4⁺ T-Lymphozyten wird bei den immunisierten Tieren der Stämme WT, IL-15KO, KIN 64, KIN 69 und KIN 65 nicht von der Menge des vorhandene IL-15 beeinflusst. Lediglich die in KIN 71 vorkommende verstärkte Expression von IL-15 hat die signifikante Reduktion der CD4⁺ T-Zellen (***) zur Folge, welche auch bei der Auftragung der absoluten Zellzahl bestehen bleibt (*). Dieser Effekt wurde bereits in den naiven Tieren beobachtet.

Da neben den CD8⁺ T-Zellen NK-Zellen auch sehr stark abhängig von IL-15 sind und eine wichtige Rolle in der Regulation der Autoimmunität haben, wurden diese bereits in naiven Tieren untersucht. Um herauszufinden, ob die Immunisierung der Tiere NK-Zellen oder deren Abhängigkeit zu IL-15 quantitativ beeinflusst, sind in Abbildung 72 die prozentualen Anteile sowie die absoluten Zellzahlen der NK-Zellen 50 Tage nach der Immunisierung der Tiere dargestellt.

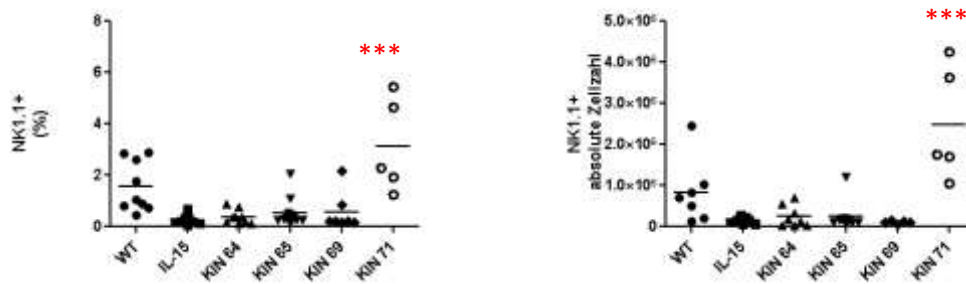


Abb. 72: Einfluss von IL-15 auf NK-Zellen der Milz immunisierter Tiere. Prozentualer Anteil sowie absolute Zellzahl der NK-Zellen. Die entnommenen Milzen wurden filtriert, die Erythrozyten lysiert, mit Antikörpern gefärbt und mit dem LSRII analysiert. Die Ermittlung der absoluten Zellzahl erfolgte anhand der Berechnung der prozentualen Anteile auf die nach der Aufarbeitung ermittelte Gesamtzellzahl. Die Berechnung der Signifikanzen erfolgte mittels one way ANOVA mit anschließendem Tukey-Test. Signifikanzen wurden zu IL-15KO (rot) berechnet. $n = 5-11$

Sowohl die prozentualen Anteile als auch die absolute Zellzahl der NK-Zellen sind in IL-15KO verglichen zu dem WT nicht signifikant reduziert. Die Mengen der NK-Zellen sind in KIN 64, KIN 69 und KIN 65 vergleichbar gering mit denen der IL-15KO-Tiere. Nur bei KIN 71 ist, verglichen zu IL-15KO, die Anzahl der NK-Zellen stark signifikant erhöht, was auch schon bei der Analyse der naiven Tiere festgestellt werden konnte.

B-Zellen sind durch ihre Fähigkeit Autoantigene zu präsentieren in der Lage, kostimulatorische Signale für die Aktivierung von T-Lymphozyten zu generieren. Eine Fehlfunktion in der durch B-Zellen induzierten Antigenpräsentation kann bei Patienten, die an MS erkrankt sind eine übermäßige Antwort der T-Lymphozyten zur Folge haben. Bei der Analyse der naiven Tiere wurde bereits herausgefunden, dass von IL-15 und IL-15R α keine direkten oder indirekten Effekte auf die Mengen der B-Zellen in der Milz haben. Ziel der folgenden Untersuchung war es zu analysieren, ob in immunisierten Tieren ein direkter oder indirekter Einfluss von IL-15 auf die B-Zellen ausgeht.

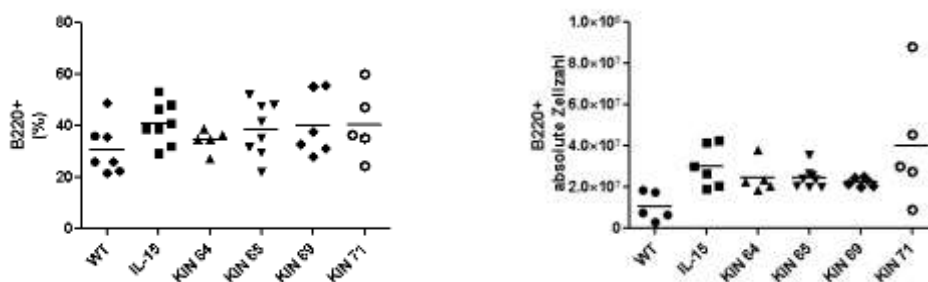


Abb. 73: Effekt von IL-15 auf B-Lymphozyten der Milz immunisierter Tiere. Prozentualer Anteil sowie absolute Zellzahl der B-Zellen. Die entnommenen Milzen wurden filtriert, die Erythrozyten lysiert, mit Antikörpern gefärbt und mit dem LSRII analysiert. Die Ermittlung der absoluten Zellzahl erfolgte anhand der Berechnung der prozentualen Anteile auf die nach der Aufarbeitung ermittelte Gesamtzellzahl. Die Berechnung der Signifikanzen erfolgte mittels one way ANOVA mit anschließendem Tukey-Test. $n = 5-11$

Auch nach der Immunisierung der Tiere ist die Expression der B-Zellen in WT, IL-15KO und den KIN-Stämmen vergleichbar. Lediglich bei der Auftragung der absoluten Zellzahl ist die Menge der B-Zellen bei den WT-Tieren leicht reduziert und bei KIN 71 leicht angestiegen, was jedoch nicht zu einer signifikanten Differenz zu IL-15KO führt.

4.10.7. Beeinflussung des IL-15 Effektes in der Milz durch die Immunisierung

Neben der Analyse des Effektes von IL-15 auf die Lymphozyten der Milz immunisierter Tiere wurden die durch die Immunisierung bedingten Änderungen auf die IL-15 spezifische Rekonstitution in $CD8^+$ T-Lymphozyten und NK-Zellen untersucht. In Abbildung 74 wird die Größe der untersuchten Lymphozyten Populationen von naiven und immunisierten Tieren verglichen. Hierbei wird die absolute Zellzahl der Lymphozyten der naiven Tiere als Ausgangswert verwendet und gleich eins gesetzt. Die Anteile der Zellen in den immunisierten Tieren werden zu denen der naiven berechnet.

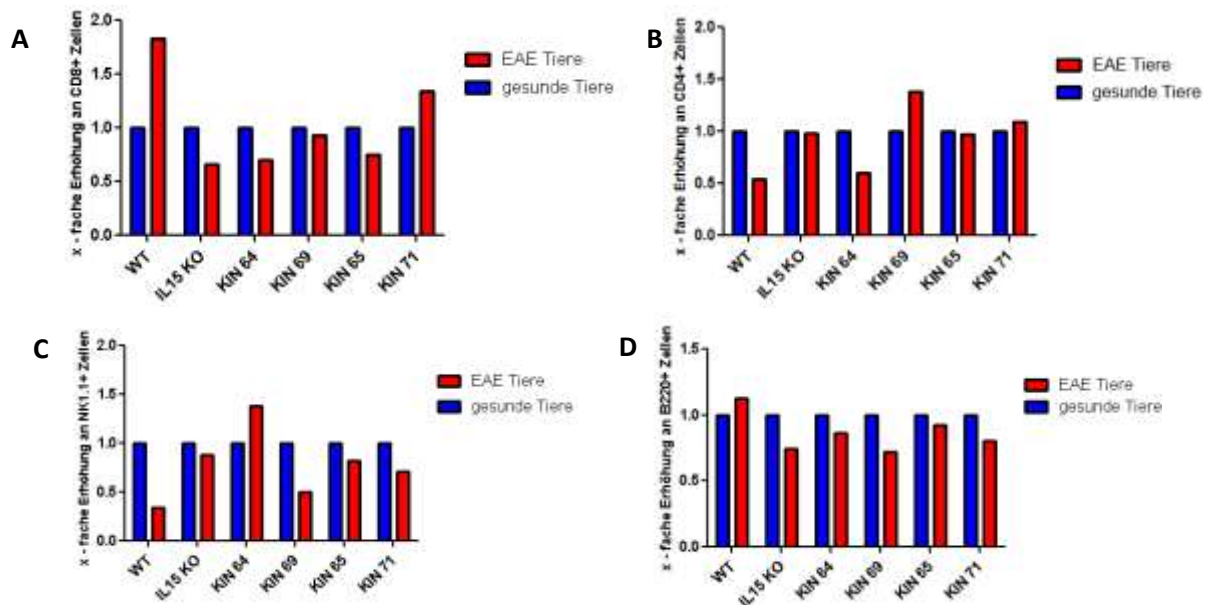


Abb. 74: Einfluss der Immunisierung auf die IL-15-spezifische Rekonstitution der lymphoiden Zellen der Milz.
A: Absolute Zellzahlen der $CD8^+$ T-Zellen. **B:** Absolute Zellzahlen der $CD4^+$ T-Zellen. **C:** Absolute Werte der NK-Zellen. **D:** Absolute Anzahl der B-Zellen. Die entnommenen Milzen wurden filtriert, die Erythrozyten lysiert, mit Antikörpern gefärbt und mit dem LSR II analysiert. Die Ermittlung der absoluten Zellzahl erfolgte anhand der Berechnung der prozentualen Anteile auf die nach der Aufarbeitung ermittelte Gesamtzellzahl. $n = 5-11$

Die Immunisierung hat bei den WT Tieren einen Anstieg der $CD8^+$ T-Lymphozyten zur Folge. In IL-15KO, KIN 64 und KIN 65 sind die $CD8^+$ T-Lymphozyten in den immunisierten Tieren reduziert. Bei KIN 69 hat die Immunisierung keinen Einfluss auf die Menge der $CD8^+$ T-Lymphozyten. In KIN 71 ist die Menge der $CD8$ T-Lymphozyten in den immunisierten Tieren ebenfalls erhöht. Die $CD4^+$ T-Lymphozyten sind bei den WT und KIN 64 durch die Immunisierung gleichermaßen reduziert. Lediglich bei den KIN 69 Tieren hat die Immunisierung einen Anstieg der $CD4^+$ T-Lymphozyten zur Folge. In IL-15KO, KIN 69, KIN 65 und KIN 71 hat die Immunisierung keine Auswirkungen auf die Menge der $CD4^+$ T-Lymphozyten in der Milz. Die Menge der NK-Zellen ist in den immunisierten WT verglichen zu den naiven Tieren reduziert. In KIN 65, KIN 69 und KIN 71 führt die Induktion von EAE ebenfalls zu einer Reduktion der NK-Zellen, die in diesem Fall aber nicht signifikant ist. Lediglich in KIN 64 führt die Immunisierung zu einem nicht signifikanten Anstieg der Menge der NK-Zellen in der Milz. In IL-15KO bleiben die NK-Zellen quantitativ von der Immunisierung unbeeinflusst. Bei der Darstellung der prozentualen Anteile der NK-Zellen (3.5.1. und 3.9.1.), fällt auf, dass diese in IL-15KO, KIN 64, KIN 69 und KIN 65 sowohl in den naiven Tieren als auch nach der Immunisierung sehr gering sind. Auf die Auswirkungen dieser Beobachtung wird in der Diskussion genauer eingegangen. Die Immunisierung der Tiere hat bei den WT eine minimale Erhöhung der B-Zellen zur Folge. In IL-15KO, KIN 64, KIN 69, KIN 65 und KIN 71 zeigen die Tiere eine leichte Reduktion der B-Zellen, welche jedoch nicht signifikant ist.

4.10.8. IL-15R α bedingter Einfluss auf die Lymphozyten in der Milz immunisierter Mäuse

Im Folgenden wird der Einfluss der Transpräsentation auf die Lymphozyten Population in der Milz immunisierter Tiere anhand der IL-15R α defizienten Tiere analysiert. Um den Effekt von IL-15R α zu verdeutlichen, werden auch hier die bereits analysierten Stämme WT, IL-15KO und KIN 71 nochmals mit aufgeführt. In Abbildung 75 ist die Menge der CD8 $^+$ T-Lymphozyten in immunisierten Tieren dargestellt.

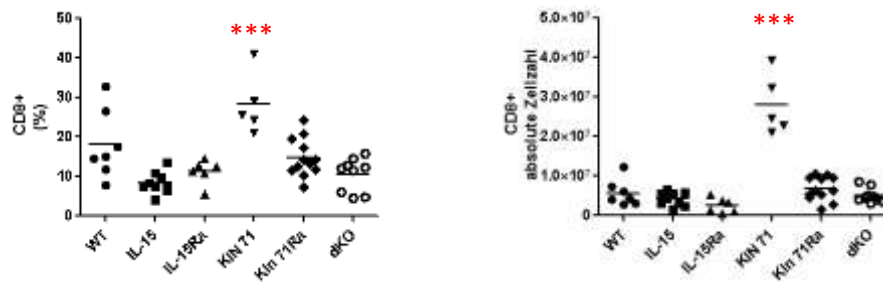


Abb. 75: Einfluss der Abwesenheit von IL-15R α auf die CD8 $^+$ T-Lymphozyten der Milz immunisierter Tiere. Prozentualer Anteil sowie absolute Zellzahl der CD8 $^+$ T-Zellen. Die entnommenen Milzen wurden filtriert, die Erythrozyten lysiert, mit Antikörpern gefärbt und mit dem LSRII analysiert. Die Ermittlung der absoluten Zellzahl erfolgte anhand der Berechnung der prozentualen Anteile auf die nach der Aufarbeitung ermittelte Gesamtzellzahl. Dargestellt sind die jeweils gemessenen Werte sowie die Mittelwerte der Messungen. Die Berechnung der Signifikanzen erfolgte mittels one way ANOVA mit anschließendem Tukey-Test. Signifikanzen wurden zu IL-15KO (rot) berechnet (***) ($p \leq 0,001$). $n = 5-11$

In allen IL-15R α defizienten Stämmen (IL-15R α KO, KIN71R α und dKO) sind die CD8 $^+$ T-Zellen quantitativ auf das Niveau von IL-15KO Tieren reduziert. Diese Beobachtung konnte bereits bei den naiven Tieren gemacht werden.

Abbildung 76 stellt den Effekt der Immunisierung der IL-15R α defizienten Tiere auf die CD4 $^+$ T-Zellen dar.

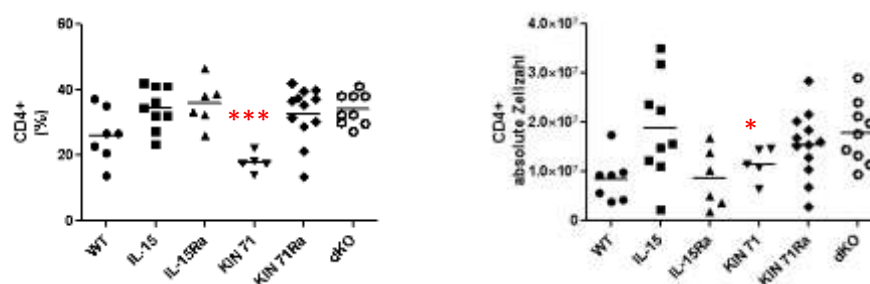


Abb. 76: Einfluss der Abwesenheit von IL-15R α auf die CD4 $^+$ T-Lymphozyten der Milz immunisierter Tiere. Prozentualer Anteil sowie absolute Zellzahl der CD4 $^+$ T-Zellen. Die entnommenen Milzen wurden filtriert, die Erythrozyten lysiert, mit Antikörpern gefärbt und mit dem LSRII analysiert. Die Ermittlung der absoluten Zellzahl erfolgte anhand der Berechnung der prozentualen Anteile auf die nach der Aufarbeitung ermittelte Gesamtzellzahl. Dargestellt sind die jeweils gemessenen Werte sowie die Mittelwerte der Messungen. Die Berechnung der Signifikanzen erfolgte mittels one way ANOVA mit anschließendem Tukey-Test. Signifikanzen wurden zu IL-15KO (rot) berechnet (* = $p \leq 0,05$, *** = $p \leq 0,001$). $n = 5-11$

Die prozentualen Anteile der CD4 $^+$ T-Lymphozyten der erkrankten Tiere sind in IL-15R α KO, KIN 71R α und dKO mit den Anteilen von IL-15KO vergleichbar. Bei der Betrachtung der absoluten Zellzahl haben KIN 71R α und dKO vergleichbare Mengen an CD4 $^+$ T-Zellen wie IL-15KO. Der in KIN 71 beschriebene

Effekt wird durch das Fehlen des IL-15R α (KIN 71R α) aufgehoben. In IL-15R α KO ist die Anzahl dieser Zellen verglichen zu IL-15KO schwach, jedoch nicht signifikant reduziert. Vergleichbare Resultate konnten bereits in den naiven Tieren beobachtet werden.

Die quantitative Analyse des Einflusses von IL-15R α auf die NK-Population ist in Abbildung 77 aufgeführt.

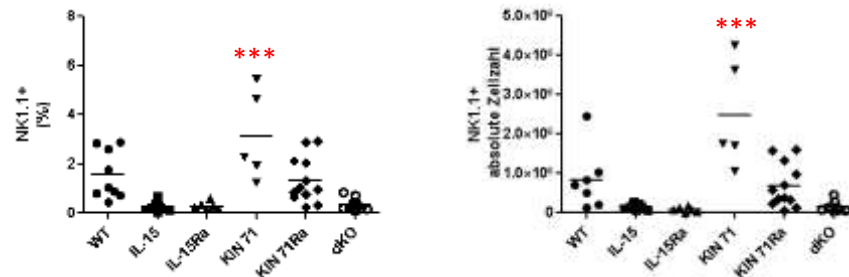


Abb. 77: Einfluss der Abwesenheit von IL-15R α auf die NK-Zellen der Milz immunisierter Tiere. Prozentualer Anteil sowie absolute Zellzahl der NK-Zellen. Die entnommenen Milzen wurden filtriert, die Erythrozyten lysiert, mit Antikörpern gefärbt und mit dem LSRII analysiert. Die Ermittlung der absoluten Zellzahl erfolgte anhand der Berechnung der prozentualen Anteile auf die nach der Aufarbeitung ermittelte Gesamtzellzahl. Dargestellt sind die jeweils gemessenen Werte sowie die Mittelwerte der Messungen. Die Berechnung der Signifikanzen erfolgte mittels one way ANOVA mit anschließendem Tukey-Test. Signifikanzen wurden zu IL-15KO (rot) berechnet (***) = $p \leq 0,001$). $n = 5-11$

Der bereits für die naiven Tiere beschriebene Effekt des IL-15R α zeigt sich auch in immunisierten IL-15R α KO und dKO Tieren. Hier ist die Menge der NK-Zellen vergleichbar mit der in IL-15KO Tieren. Auch nach der Immunisierung ist in KIN 71R α verglichen zu KIN 71 die Menge der NK-Zellen reduziert, allerdings ist diese Reduktion nach der Immunisierung nicht mehr signifikant. Die Menge der NK-Zellen ist vergleichbar mit der in WT-Tieren.

In Abbildung 78 ist der Einfluss des IL-15R α auf die B-Zellen der Milz von EAE-induzierten Tieren dargestellt.

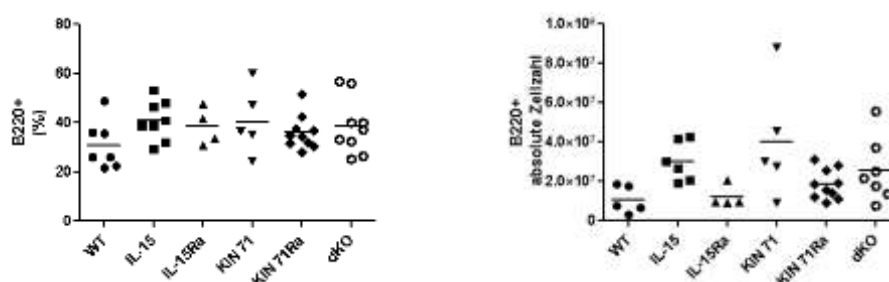


Abb. 78: Einfluss der Abwesenheit von IL-15R α auf B-Zellen der Milz immunisierter Tiere. Prozentualer Anteil sowie absolute Zellzahl der B-Zellen. Die entnommenen Milzen wurden filtriert, die Erythrozyten lysiert, mit Antikörpern gefärbt und mit dem LSRII analysiert. Die Ermittlung der absoluten Zellzahl erfolgte anhand der Berechnung der prozentualen Anteile auf die nach der Aufarbeitung ermittelte Gesamtzellzahl. Dargestellt sind die jeweils gemessenen Werte sowie die Mittelwerte der Messungen. Die Berechnung der Signifikanzen erfolgte mittels one way ANOVA mit anschließendem Tukey-Test. $n = 5-11$

Die prozentualen Anteile der B-Zellen werden in IL-15R α KO, KIN 71R α und dKO nicht durch den fehlenden Rezeptor beeinflusst. Die absolute Zellzahl ist in dKO vergleichbar mit der von IL-15KO. In

KIN 71R α ist die Menge der B-Zellen verglichen zu IL-15KO schwach reduziert, in IL-15R α KO ist diese vergleichbar mit der Menge in WT-Tieren.

4.10.9. Durch die Immunisierung bedingte Änderungen des Einflusses von IL-15R α in der Milz

Neben dem Einfluss der Transpräsentation auf die lymphoiden Zellpopulationen der Milz nach der EAE-Induktion werden im Folgenden die durch die Immunisierung bedingten Änderungen des dieses Einflusses in IL-15R α defizienten Tieren analysiert. Hierfür werden in Abbildung 79 die Populationen der untersuchten Lymphozyten von naiven und immunisierten Tieren verglichen. Die Menge der Lymphozyten der naiven Tiere dient hierbei als Ausgangswert und wird gleich eins gesetzt. Die absolute Zellzahl der Lymphozyten der immunisierten Tiere wird mit dem Wert der naiven Tiere in Relation gesetzt.

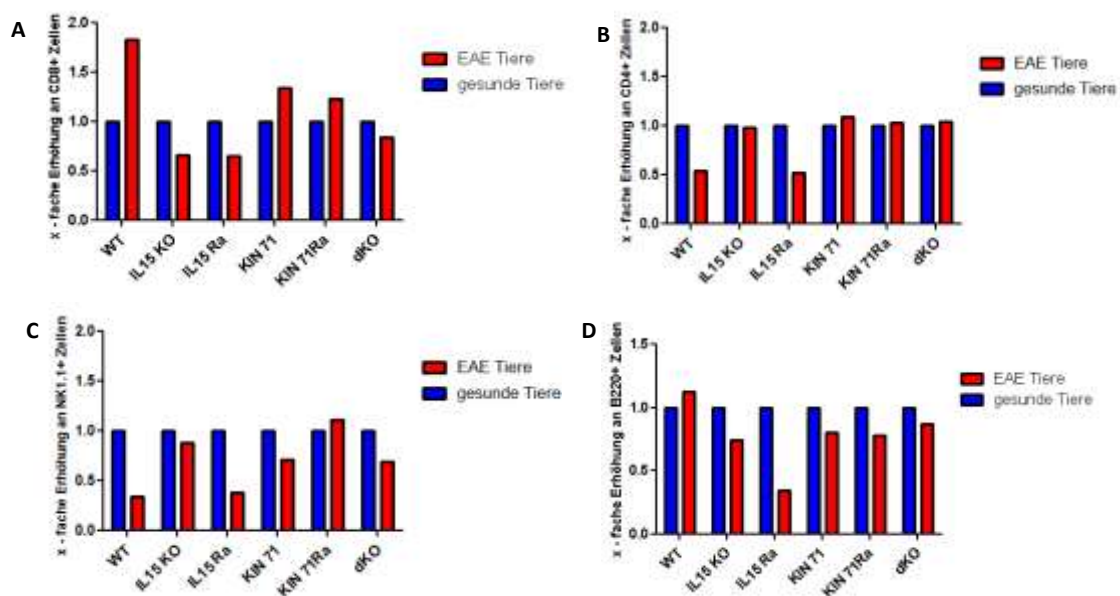


Abb. 79: Einfluss der Immunisierung auf IL-15R α -spezifische Effekte auf die absolute Zellzahl der lymphoiden Zellen der Milz. A: Absolute Zellzahlen der CD8⁺ T-Zellen. B: Absolute Zellzahlen der CD4⁺ T-Zellen. C: Absolute Werte der NK-Zellen. D: Absolute Anzahl der B-Zellen. Die entnommenen Milzen wurden filtriert, die Erythrozyten lysiert, mit Antikörpern gefärbt und mit dem LSRII analysiert. Die Ermittlung der absoluten Zellzahl erfolgte anhand der Berechnung der prozentualen Anteile auf die nach der Aufarbeitung ermittelte Gesamtzellzahl. n = 5-11

Durch die Immunisierung sind die CD8⁺ T-Zellen in IL-15R α KO ähnlich wie in IL-15KO reduziert. In den dKO Tieren bewirkt die Immunisierung ebenfalls eine leichte Reduktion der CD8⁺ T-Zellen. Die Menge dieser Lymphozyten ist in KIN 71R α ähnlich wie in KIN 71 erhöht. Bei den CD4⁺ T-Zellen hat die Immunisierung in IL-15R α KO eine wie in den WT vergleichbare Reduktion der Zellen zur Folge. Bei KIN 71R α und dKO hingegen bleibt die Anzahl der CD4⁺ T-Lymphozyten durch die Immunisierung unbeeinflusst. Die Immunisierung der Tiere bewirkt bei IL-15R α KO, KIN 71R α und dKO eine Reduktion der NK-Zellen, welche bei IL-15R α KO vergleichbar mit der bei dem WT beobachteten Reduktion ist. Auf die B-Zellen hat die Immunisierung der Tiere ebenfalls einen reduzierenden Effekt. In KIN 71R α und dKO erfolgt eine schwache Reduktion dieser Zellen, welche vergleichbar mit KIN 71 ist. In IL-15R α KO erfolgt durch die Immunisierung eine stärkere Reduktion der Menge der B-Zellen.

4.11. Einfluss von IL-15/IL-15R α auf die IFN- γ -Produktion der Lymphozyten in der Milz

IFN- γ ist ein für die Immunabwehr von intrazellulären Pathogenen essentielles Zytokin. Die mRNA dieses Zytokins ist unter anderem in Memory CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten und NK-Zellen lokalisiert, was im Falle der Aktivierung dieser Zellen eine schnelle Produktion von IFN- α ermöglicht [268-269]. Die Inkubation der wie in 3.6.3. ausführlich beschrieben aufgearbeiteten Lymphozyten der Milz mit PMA-Ionomycin bewirkt die Aktivierung der CD4⁺ und CD8⁺ Memory-Zellen sowie der NK-Zellen, was die Produktion von IFN- γ durch diese Zellen zur Folge hat. Ziel dieser Versuchsreihe war es, anhand der IFN- γ Produktion den Einfluss von IL-15/IL-15R α auf die Entwicklung der CD4 und CD8 Memory T-Zellen und der NK-Zellen zu analysieren. Hierfür wurden die Milzlymphozyten nach der Aufarbeitung mit Antikörpern gefärbt und mit Hilfe des LSRII gemessen. Die CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen sowie die NK-Zellen wurden wie bereits für die naiven Tiere ausführlich beschrieben identifiziert. Abbildung 80 zeigt exemplarisch die Gating-Strategie zur Identifikation der IFN- γ ⁺ NK⁺, CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen.

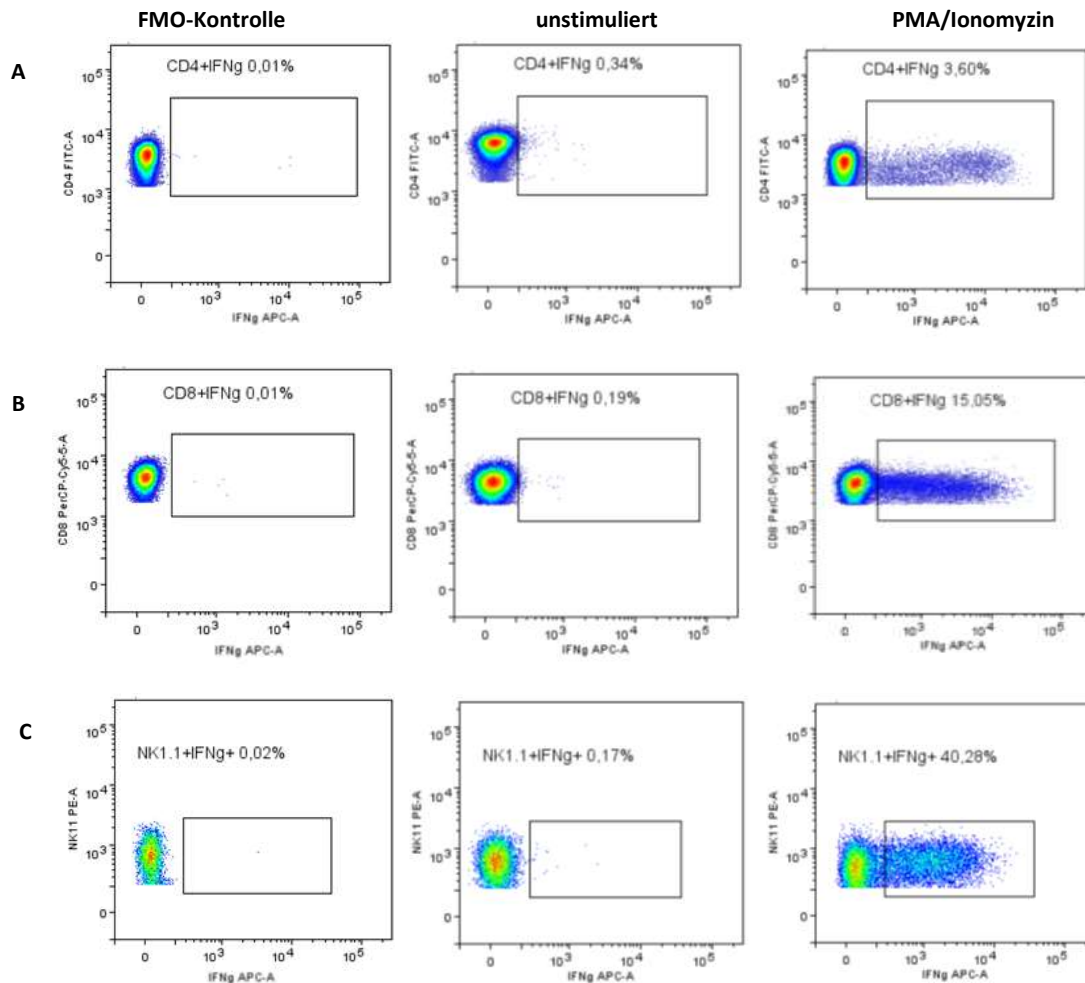


Abb. 80: Repräsentative Gating-Strategie zur Ermittlung der IFN- γ Produktion ausgewählter Lymphozyten der Milz. A: FMO-Kontrolle sowie IFN- γ Produktion der nicht stimulierten und stimulierten CD4⁺ Gedächtnis-Zellen. **B:** FMO-Kontrolle und IFN- γ Produktion der nicht stimulierten und stimulierten CD8⁺ Gedächtnis-Zellen. **C:** FMO- und Stimulationskontrolle sowie stimulationsbedingte IFN- γ Produktion der NK-Zellen.

Die FMO-Kontrollen wurden identisch zu den anderen Proben gefärbt. In diesen Kontrollen wurde ausschließlich der Antikörper für die Färbung von IFN- γ weggelassen, was die eindeutige Differenzierung von positiven und negativen Ereignissen ermöglicht. Die Produktion von IFN- γ bei nicht stimulierten Zellen wird als Negativ-Kontrolle betrachtet. Die Stimulation der Lymphozyten aus der Milz mit PMA/Ionomycin hat eine maximale Aktivierung der Zellen zur Folge, wodurch in den Zellen eine maximale Produktion an IFN- γ erreicht wird. Bei den nicht stimulierten Zellen liegt die Produktion von IFN- γ im niedrigen prozentualen Bereich nahe des Detektionslimits (> 1%), weshalb auf diese im Folgenden nicht weiter eingegangen wird.

4.11.1. IFN- γ Produktion in naiven Mäusen in Abhängigkeit von IL-15

Neben der bereits vollzogenen Analyse des Einflusses von IL-15 auf CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen sowie NK-Zellen ist in der folgenden Versuchsreihe das Ziel den Einfluss von IL-15 auf die IFN- γ produzierenden CD4⁺ und CD8⁺ Memory-Zellen sowie NK-Zellen zu untersuchen. In Abbildung 81 wird die Menge des durch CD8⁺ Memory-Zellen produzierten IFN- γ nach der Stimulation mit PMA/Ionomycin in Relation zu IL-15 gezeigt.

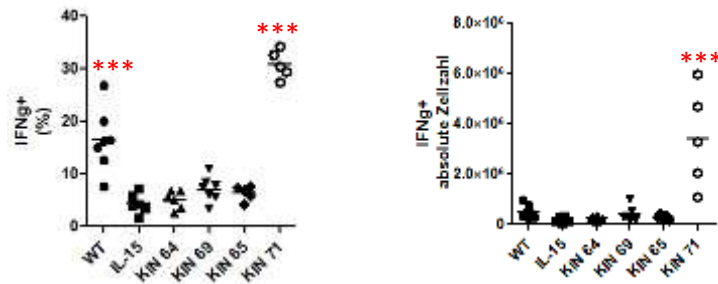


Abb. 81: IFN- γ Produktion von CD8⁺ Memory-Zellen in der Milz naiver Tiere in Abhängigkeit von IL-15. Prozentualer Anteil sowie absolute Zellzahl IFN- γ Produktion von mit PMA/Ionomycin stimulierten Zellen. Die entnommenen Milzen wurden filtriert, die Erythrozyten lysiert, und die Zellen für 6 Stunden mit Brefeldin A und mit/ohne PMA/Ionomycin stimuliert. Es folgte die Färbung mit Antikörpern sowie die Analyse mittels LSRII. Die Ermittlung der absoluten Zellzahl erfolgte anhand der Berechnung der prozentualen Anteile auf die nach der Aufarbeitung ermittelte Gesamtzellzahl. Dargestellt sind die jeweils gemessenen Werte sowie die Mittelwerte der Messungen. Die Berechnung der Signifikanzen erfolgte mittels one way ANOVA mit anschließendem Tukey-Test. Signifikanzen wurden zu IL-15KO (rot) berechnet (***) = $p \leq 0,001$. $n = 5-7$

Durch die Stimulation der CD8⁺ Memory-Zellen ist der prozentuale Anteil der IFN- γ Produktion bei WT und KIN 71 verglichen zu den IL-15KO signifikant erhöht (***) . Die prozentualen Anteile bei KIN 64, KIN 69 und KIN 65 sind vergleichbar mit denen von IL-15KO. Bei der Darstellung der absoluten Zellzahlen ist lediglich noch die IFN- γ Produktion der KIN 71 signifikant unterschiedlich von IL-15KO (***) . Die absoluten Werte von WT, KIN 64, KIN 69 und KIN 65 sind vergleichbar mit denen von IL-15KO. Dieses Resultat lässt vermuten, dass eine gewisse Menge an von CD11c⁺ Zellen produziertes IL-15 benötigt wird, damit die Funktionalität der CD8⁺ T-Lymphozyten beeinflusst werden kann.

Es ist nicht bekannt, dass von IL-15 ein direkter Effekt auf die CD4⁺ T-Lymphozyten ausgeht. Abbildung 82 zeigt die Resultate der Untersuchungen, ob IL-15 bei naiven Tieren in der Lage ist, die Funktionalität dieser Zellen zu beeinflussen.

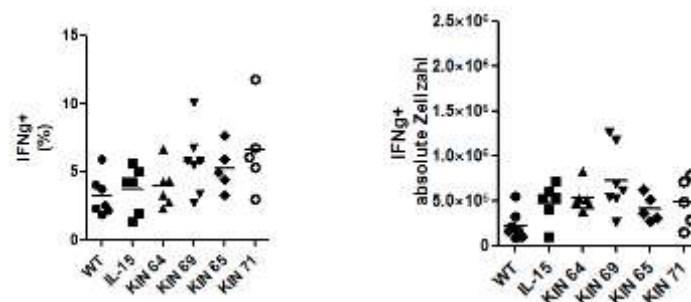


Abb. 82: IFN- γ Produktion von CD4⁺ Memory-Zellen in der Milz naiver Tiere unter dem Einfluss von IL-15. Prozentualer Anteil sowie absolute Zellzahl IFN- γ Produktion nach der Stimulation mit PMA/Ionomycin. Die entnommenen Milzen wurden filtriert, die Erythrozyten lysiert, und die Zellen für 6 Stunden mit Brefeldin A und mit/ohne PMA/Ionomycin stimuliert. Es folgte die Färbung mit Antikörpern sowie die Analyse mittels LSRII. Die Ermittlung der absoluten Zellzahl erfolgte anhand der Berechnung der prozentualen Anteile auf die nach der Aufarbeitung ermittelte Gesamtzellzahl. Dargestellt sind die jeweils gemessenen Werte sowie die Mittelwerte der Messungen. Die Berechnung der Signifikanzen erfolgte mittels one way ANOVA mit anschließendem Tukey-Test. $n = 5-7$

Die IFN- γ Produktion der stimulierten CD4⁺ Memory-Zellen in der Milz ist zwar, verglichen zu den nicht stimulierten Zellen unabhängig von IL-15 in allen untersuchten Stämmen verstärkt. Darüber hinaus zeigen sich weder bei der prozentualen Menge noch bei der absoluten Zellzahl durch IL-15

hervorgerufene Differenzen in der IFN- γ Produktion. Dies lässt darauf schließen, dass IL-15 keinen Effekt auf die Funktionalität der CD4⁺ T-Lymphozyten naiver Mäuse hat.

NK-Zellen werden von der Anwesenheit von IL-15 quantitativ beeinflusst. In wie fern IL-15 in der Lage ist die Funktionalität von stimulierten NK-Zellen naiver Mäuse zu beeinflussen ist in Abbildung 83 dargestellt.

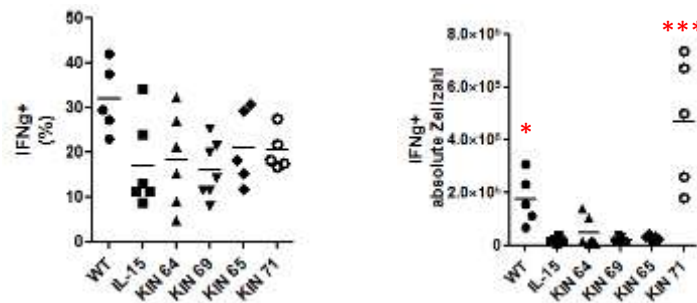


Abb. 83: Effekt von IL-15 auf die Funktionalität von NK-Zellen aus der Milz naiver Mäuse. Prozentualer Anteil sowie absolute Zellzahl IFN- γ Produktion von mit PMA/Ionomycin stimulierten Zellen. Die entnommenen Milzen wurden filtriert, die Erythrozyten lysiert, und die Zellen für 6 Stunden mit Brefeldin A und mit/ohne PMA/Ionomycin stimuliert. Es folgte die Färbung mit Antikörpern sowie die Analyse mittels LSRII. Die Ermittlung der absoluten Zellzahl erfolgte anhand der Berechnung der prozentualen Anteile auf die nach der Aufarbeitung ermittelte Gesamtzellzahl. Dargestellt sind die jeweils gemessenen Werte sowie die Mittelwerte der Messungen. Die Berechnung der Signifikanzen erfolgte mittels one way ANOVA mit anschließendem Tukey-Test. Signifikanzen wurden zu IL-15KO (rot) berechnet (* = $p \leq 0,05$, *** = $p \leq 0,001$). $n = 5-7$

In den stimulierten Zellen der WT-Tiere ist der prozentuale Anteil der IFN- γ produzierenden NK-Zellen verglichen zu IL-15KO nicht signifikant verstärkt. Die prozentualen Anteile von KIN 64, KIN 69, KIN 65 und KIN 71 sind mit denen von IL-15 vergleichbar. Die absolute Zellzahl der IFN- γ produzierenden NK-Zellen ist bei WT (*) und bei KIN 71 (***) signifikant zu denen der IL-15KO-Tiere angestiegen. Auch die absoluten Zellzahlen der IFN- γ produzierenden NK-Zellen sind in KIN 64, KIN 69 und KIN 65 ähnlich denen von IL-15KO. Um die Funktionalität der NK-Zellen beeinflussen zu können, ist eine bestimmte Menge von durch CD11c⁺ Zellen produziertem IL-15 nötig.

4.11.2. Einfluss von IL-15R α auf die IFN- γ Produktion stimulierter Lymphozyten der Milz naiver Tiere

Zur Analyse des Effektes der Transpräsentation auf die Funktionalität von Lymphozyten aus der Milz naiver Tiere wurde die stimulationsbedingte Produktion von IFN- γ der CD4 $^+$ und CD8 $^+$ Memory-Zellen sowie die NK-Zellen IL-15R α defizienter Mäuse untersucht. Zur Verdeutlichung dieses Effektes werden die bereits gezeigten Daten der Stämme WT, IL-15KO und KIN 71 nochmals gezeigt. In Abbildung 84 ist der Einfluss von IL-15R α auf die Funktionalität CD8 $^+$ Memory-Zellen zu sehen.

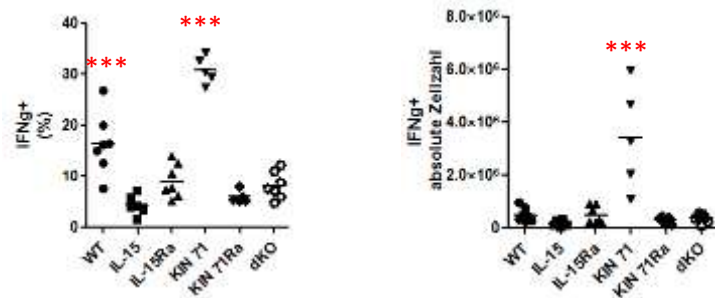


Abb. 84: IL-15R α abhängige IFN- γ Produktion von CD8 $^+$ T-Zellen in der Milz naiver Mäuse. Prozentualer Anteil sowie absolute Zellzahl der IFN- γ Produktion nach der Stimulation mit PMA/Ionomycin. Die entnommenen Milzen wurden filtriert, die Erythrozyten lysiert, und die Zellen für 6 Stunden mit Brefeldin A und mit/ohne PMA/Ionomycin stimuliert. Es folgte die Färbung mit Antikörpern sowie die Analyse mittels LSRII. Die Ermittlung der absoluten Zellzahl erfolgte anhand der Berechnung der prozentualen Anteile auf die nach der Aufarbeitung ermittelte Gesamtzellzahl. Dargestellt sind die jeweils gemessenen Werte sowie die Mittelwerte der Messungen. Die Berechnung der Signifikanzen erfolgte mittels one way ANOVA mit anschließendem Tukey-Test. Signifikanzen wurden zu IL-15KO (rot) berechnet (***) ($p \leq 0,001$). $n = 5-7$

Die Menge des durch NK-Zellen produzierte der IFN- γ ist in den IL-15R α defizienten Tieren (IL-15R α KO, KIN 71R α und dKO) vergleichbar mit der Menge bei den IL-15KO Tieren, was darauf schließen lässt, dass die Funktionalität der CD8 $^+$ T-Lymphozyten abhängig von IL-15R α ist.

In Abbildung 85 ist der quantitative Einfluss des IL-15R α auf die IFN- γ produzierenden CD4 $^+$ Memory-Zellen, und somit auf die Funktionalität der CD4 $^+$ T-Lymphozyten der Milz naiver Mäuse dargestellt.

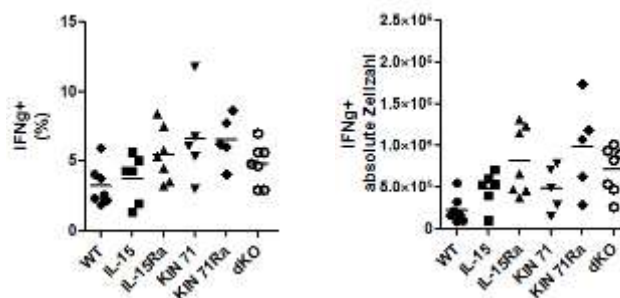


Abb. 85: IL-15R α abhängige IFN- γ Produktion von CD4 $^+$ T-Zellen der Milz naiver Mäuse. Prozentualer Anteil sowie absolute Zellzahl der IFN- γ Produktion von mit PMA/Ionomycin stimulierten CD4 $^+$ T-Zellen. Die entnommenen Milzen wurden filtriert, die Erythrozyten lysiert, und die Zellen für 6 Stunden mit Brefeldin A und mit/ohne PMA/Ionomycin stimuliert. Es folgte die Färbung mit Antikörpern sowie die Analyse mittels LSRII. Die Ermittlung der absoluten Zellzahl erfolgte anhand der Berechnung der prozentualen Anteile auf die nach der Aufarbeitung ermittelte Gesamtzellzahl. Dargestellt sind die jeweils gemessenen Werte sowie die Mittelwerte der Messungen. Die Berechnung der Signifikanzen erfolgte mittels one way ANOVA mit anschließendem Tukey-Test. $n = 5-7$

In den IL-15R α defizienten Stämmen (IL-15R α KO, KIN 71R α und dKO) ist der Anteil der IFN- γ produzierenden CD4 $^+$ T-Zellen verglichen zu IL-15KO schwach angestiegen. Aufgrund der Defizienz des IL-15R α Es entstehen zu IL-15KO zu keinen signifikanten Differenzen.

Der Einfluss des IL-15R α auf die IFN- γ Produktion durch die NK-Zellen in der Milz naiver Mäuse ist in Abbildung 86 gezeigt.

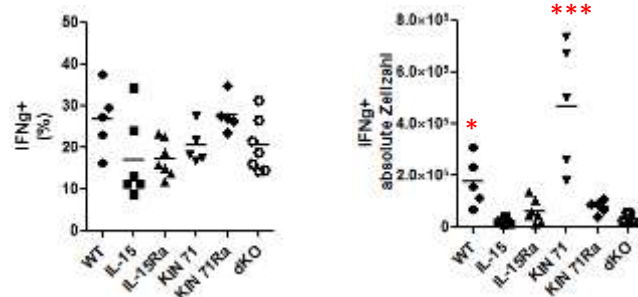


Abb. 86: Einfluss von IL-15R α auf die IFN- γ Produktion von NK-Zellen in der Milz naiver Mäuse. Prozentualer Anteil sowie absolute der Zellzahl IFN- γ Produktion durch mit PMA/Ionomycin stimulierte CD4 $^+$ T-Zellen. Die entnommenen Milzen wurden filtriert, die Erythrozyten lysiert, und die Zellen für 6 Stunden mit Brefeldin A und mit/ohne PMA/Ionomycin stimuliert. Es folgte die Färbung mit Antikörpern sowie die Analyse mittels LSRII. Die Ermittlung der absoluten Zellzahl erfolgte anhand der Berechnung der prozentualen Anteile auf die nach der Aufarbeitung ermittelte Gesamtzellzahl. Dargestellt sind die jeweils gemessenen Werte sowie die Mittelwerte der Messungen. Die Berechnung der Signifikanzen erfolgte mittels one way ANOVA mit anschließendem Tukey-Test. „Signifikanzen wurden zu IL-15KO (rot) berechnet (*= $p \leq 0,05$, ***= $p \leq 0,001$). $n = 5-7$

Bei den IL-15R α KO-Tieren ist der prozentuale Anteil der IFN- γ produzierenden NK-Zellen vergleichbar mit IL-15KO. Bei den dKO Tieren ist der Anteil der NK $^+$ IFN- γ $^+$ Zellen vergleichbar mit dem der KIN 71 Tiere. KIN 71R α zeigt einen mit dem WT vergleichbaren Anteil der NK $^+$ IFN- γ $^+$ Zellen. Bei dem Vergleich der Prozentualen Anteile entstehen keine signifikanten Differenzen in den IL-15R α defizienten Tieren. Die absolute Zellzahl der IFN- γ produzierenden NK-Zellen ist bei IL-15R α KO, KIN 71R α und dKO auf das Niveau der IL-15KO-Tiere reduziert.

Zusammenfassend kann man sagen, dass sowohl IL-15 als auch IL-15R α die Funktionalität von CD8 $^+$ Memory- und NK- Zellen beeinflussen. Die Funktionalität der CD4 $^+$ Memory Zellen wird hingegen nicht von IL-15 oder IL-15R α beeinflusst.

4.12. Einfluss von IL-15/IL-15R α auf die IFN- γ Produktion der Lymphozyten der Milz nach der EAE Induktion

Zusätzlich zu dem Effekt von IL-15/IL-15R α auf die Funktionalität der lymphoiden Zellen der Milz naiver Tiere wurde untersucht, ob die Induktion von EAE wiederum diesen Effekt auf die Funktionalität der Zellen beeinflusst. Für diese Experimente wurde den Tieren 50 Tage nach der Immunisierung die Milz entnommen und wie in 3.5.5. ausführlich beschrieben aufgearbeitet, mit PMA/Ionomycin stimuliert (3.6.3.), mit Antikörpern gefärbt und mit Hilfe des LSRII gemessen. Für die Bestimmung der Zellpopulationen wurde die bereits in 4.7. ausführlich beschriebene *Gating*-Strategie verwendet. Auch nach der Immunisierung der Tiere lag der prozentuale Anteil der IFN- γ produzierenden Zellen bei den nicht stimulierten Proben am Detektionslimit (< 1%), weshalb der Effekt von IL-15/IL-15R α nur bei den mit PMA/Ionomycin stimulierten Zellen untersucht wurde.

4.12.1. Einfluss von IL-15 auf die IFN- γ Produktion von Milzlymphozyten nach der EAE Induktion

Nach der Analyse des Einflusses von IL-15 auf die Funktionalität der CD4⁺- und CD8⁺ T-Lymphozyten sowie der NK-Zellen naiver Tiere sollte herausgefunden werden, ob die Induktion von EAE zu einer Veränderung des Einflusses durch IL-15 führt. Zudem wurden die absoluten Zellzahlen der IFN- γ produzierenden Lymphozyten von naiven und immunisierten Mäusen verglichen. Hierfür wurde die Zellzahl der naiven Tiere gleich eins gesetzt und die der immunisierten Tiere dazu berechnet. In Abbildung 87 sind die IFN- γ produzierenden CD8⁺ T-Zellen der Milz immunisierter Tiere in Abhängigkeit zu IL-15 dargestellt.

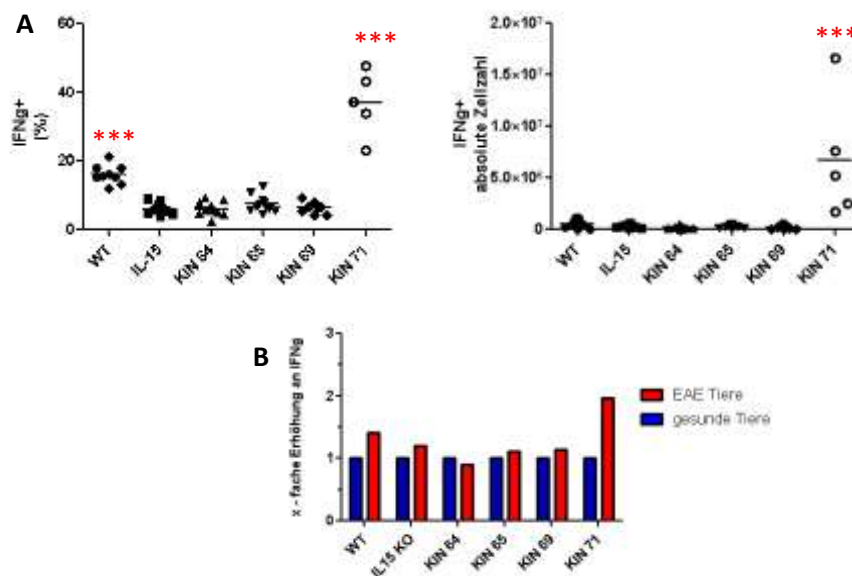


Abb. 87: IFN- γ Produktion von CD8⁺ Zellen in der Milz immunisierter Tiere in Abhängigkeit von IL-15.
A: Prozentualer Anteil sowie absolute Zellzahl IFN- γ Produktion nach der Stimulation mit PMA/Ionomycin.
B: Vergleich der absoluten Zellzahl der IFN- γ produzierenden CD8⁺ T-Zellen von naiven und immunisierten Tieren. Die Werte der nicht immunisierten Tiere werden gleich 1 gesetzt. Die entnommenen Milzen wurden filtriert, die Erythrozyten lysiert, und die Zellen für 6 Stunden mit Brefeldin A und mit/ohne PMA/Ionomycin stimuliert. Es folgte die Färbung mit Antikörpern sowie die Analyse mittels LSRII. Die Ermittlung der absoluten Zellzahl erfolgte anhand der Berechnung der prozentualen Anteile auf die nach der Aufarbeitung ermittelte Gesamtzellzahl. Dargestellt sind die jeweils gemessenen Werte sowie die Mittelwerte der Messungen. Die Berechnung der Signifikanzen erfolgte mittels one way ANOVA mit anschließendem Tukey-Test. Signifikanzen wurden zu IL-15KO (rot) berechnet (***) $p \leq 0,001$. $n = 5-11$

Der prozentuale Anteil der IFN- γ produzierenden CD8⁺-Zellen ist bei dem WT und in KIN 71 verglichen zu IL-15KO stark signifikant erhöht (***). Die prozentualen Anteile von KIN 64, KIN 69 sowie KIN 65 hingegen unterscheiden sich nicht von denen in IL-15KO. Bei der Betrachtung der absoluten Zellzahlen ist nur noch bei KIN 71 die Menge des von CD8⁺ T-Zellen produzierte IFN- γ verglichen zu IL-15KO deutlich signifikant angestiegen (***). Bei WT, KIN 64, KIN 69 und KIN 65 ist die Menge des durch CD8⁺ T-Zellen produzierten IFN- γ ähnlich mit der von IL-15KO-Tieren produzierten Menge. Die Immunisierung hat bei den WT-Tieren einen Anstieg auf das 1,5 fache der Menge des durch CD8⁺ T-Zellen produzierten IFN- γ zur Folge. Bei KIN 71 führt die Immunisierung zur Verdopplung dieser Zellen. In IL-15KO, KIN 69 und KIN 65 wird die Menge des CD8⁺ T-Zellen gebildeten IFN- γ durch die Induktion von EAE nicht beeinflusst.

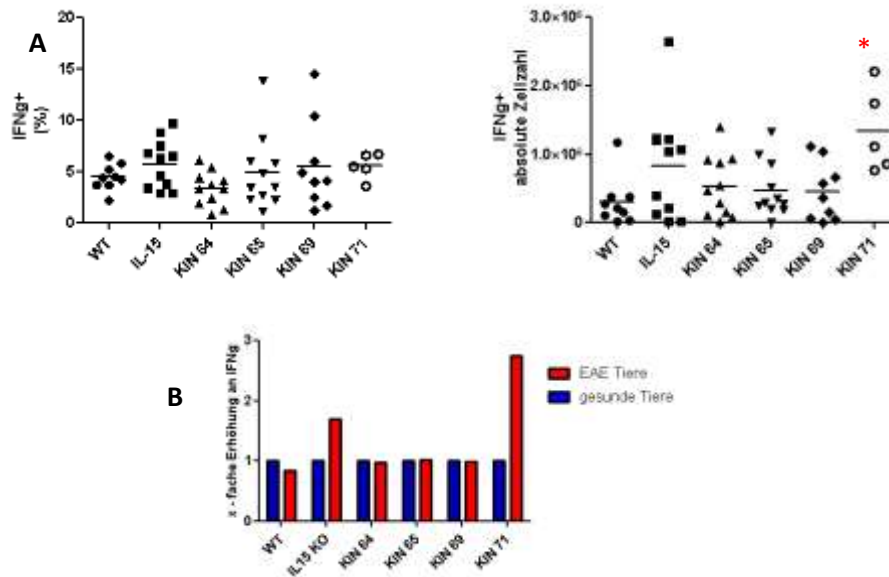


Abb. 88: IL-15 bedingte IFN- γ Produktion von CD4⁺ Zellen in der Milz von immunisierten Tieren. A: Prozentualer Anteil sowie absolute Zellzahl IFN- γ Produktion von mit PMA/Ionomycin stimulierten Zellen. **B:** Vergleich der absoluten Zellzahl der IFN γ ⁺ Zellen von immunisierten und nicht immunisierten Tieren. Die Werte der nicht immunisierten Tiere werden gleich 1 gesetzt. Die entnommenen Milzen wurden filtriert, die Erythrozyten lysiert, und die Zellen für 6 Stunden mit Brefeldin A und mit/ohne PMA/Ionomycin stimuliert. Es folgte die Färbung mit Antikörpern sowie die Analyse mittels LSRII. Die Ermittlung der absoluten Zellzahl erfolgte anhand der Berechnung der prozentualen Anteile auf die nach der Aufarbeitung ermittelte Gesamtzellzahl. Dargestellt sind die jeweils gemessenen Werte sowie die Mittelwerte der Messungen. Die Berechnung der Signifikanzen erfolgte mittels one way ANOVA mit anschließendem Tukey-Test. Signifikanzen wurden zu IL-15KO (rot) berechnet (* = $p \leq 0,05$). $n=5-11$

Nach der Immunisierung sind die absoluten Zellzahlen der CD4⁺IFN- γ ⁺ Zellen in KIN 71 zu IL-15 signifikant erhöht. Die absoluten Werte von WT, KIN 64, KIN 69 und KIN 65 unterscheiden sich nicht von IL-15KO. Bei der prozentualen Darstellung der CD4⁺IFN- γ ⁺ Zellen werden von keinem Stamm signifikanten Abhängigkeiten verglichen zu IL-15 erkennbar. Bei dem Vergleich der absoluten Werte der CD4⁺IFN- γ ⁺ Lymphozyten sind in den immunisierten IL-15KO Tieren um das 1,69 fache und in den KIN 71 um das 2,74 fache gestiegen. In den WT, KIN 64 und KIN 69 Tieren sind die Werte nach der Immunisierung vergleichbar zu denen davor. Lediglich in KIN 65 kommt es durch die Immunisierung zu einer starken Reduktion des durch CD4⁺ T-Zellen produzierten IFN- γ auf das 0,23 fache von gesunden Tieren.

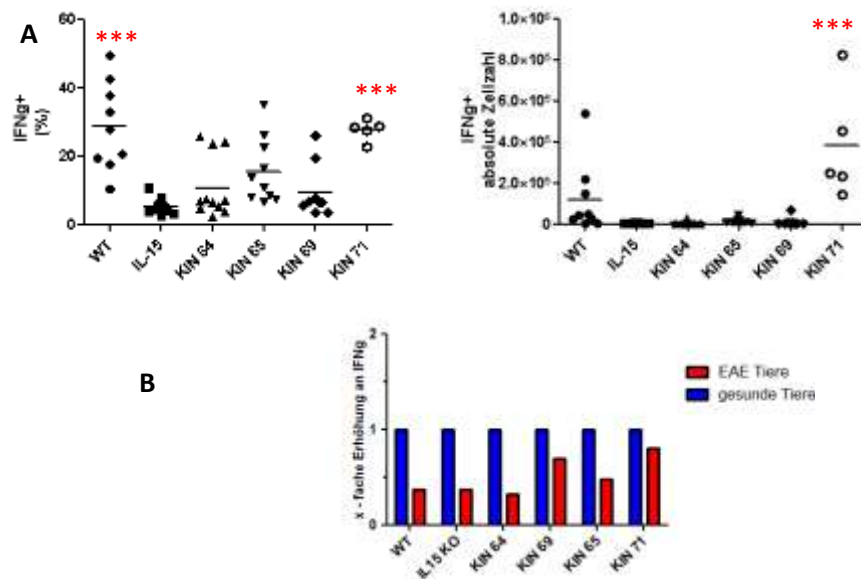


Abb.89 : IL-15 bedingte IFN- γ Produktion von NK-Zellen in der Milz von immunisierten Tieren. A: Prozentualer Anteil sowie absolute Zellzahl IFN- γ Produktion von mit PMA/Ionomycin stimulierten Zellen. **B:** Vergleich der absoluten Zellzahl der IFN γ^+ Zellen von immunisierten und nicht immunisierten Tieren. Die Werte der nicht immunisierten Tiere werden gleich 1 gesetzt. Die entnommenen Milzen wurden filtriert, die Erythrozyten lysiert, und die Zellen für 6 Stunden mit Brefeldin A und mit/ohne PMA/Ionomycin stimuliert. Es folgte die Färbung mit Antikörpern sowie die Analyse mittels LSRII. Die Ermittlung der absoluten Zellzahl erfolgte anhand der Berechnung der prozentualen Anteile auf die nach der Aufarbeitung ermittelte Gesamtzellzahl. Dargestellt sind die jeweils gemessenen Werte sowie die Mittelwerte der Messungen. Die Berechnung der Signifikanzen erfolgte mittels one way ANOVA mit anschließendem Tukey-Test. Signifikanzen wurden zu IL-15KO (rot) berechnet. (***) = $p \leq 0,001$) $n=5-11$

Der Anteil an NK⁺IFN- γ ⁺ Zellen verglichen zu IL-15 ist in den WT sowie in den KIN 71 eindeutig signifikant erhöht. Dieser signifikante Effekt geht bei WT in durch die Darstellung der absoluten Zellzahlen verloren, bleibt bei KIN 71 aber bestehen. KIN 64, KIN 69 sowie KIN 65 zeigen weder bei der Darstellung der Prozentualen Anteile noch bei der Auftragung der absoluten Zellzahl signifikante Differenzen zu IL-15. Bei dem Vergleich der absoluten Zellzahl der NK⁺-IFN- γ ⁺ Zellen vor und nach der Immunisierung fällt auf, dass bei den erkrankten WT, IL-15, KIN 64 und KIN 65 die Zellzahl um die Hälfte oder sogar noch mehr reduziert ist. Auch bei KIN 69 und KIN 71 hat die Immunisierung zu einer, allerdings abgeschwächten, Reduktion der NK⁺IFN- γ ⁺ Zellen geführt.

4.12.2. Auswirkungen der Absenz von IL-15R α auf die IFN- γ Produktion

In diesem Unterkapitel der vorliegenden Dissertation liegt der Fokus auf den Einfluss von IL-15R α auf die IFN- γ Produktion von CD8⁺, CD4⁺ und NK- Lymphozyten der Milz immunisierter Tiere. Zudem wird auch untersucht, ob IL-15R α vor und nach der Immunisierung den gleichen Effekt hat. Hierfür werden die Werte der nicht immunisierten Tiere gleich 1 gesetzt, um die x-fache Erhöhung der IFN- γ ⁺ Zellen in Abhängigkeit von IL-15R α zu zeigen. Um den Einfluss von IL-15R α zu verdeutlichen, werden in den folgenden Abbildungen die bereits gezeigten Ereignisse für WT, IL-15KO und KIN 71 nochmals dargestellt.

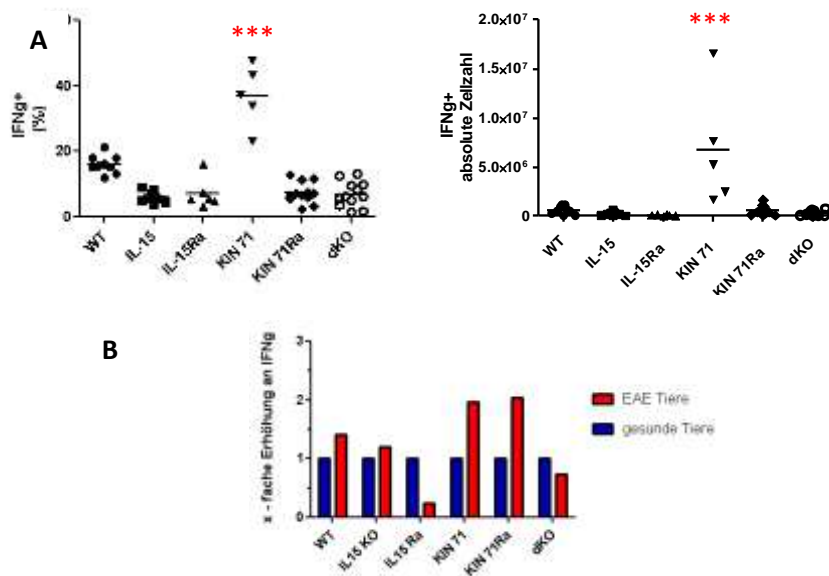


Abb. 89: IL-15Rα bestimmte IFN- γ Produktion von CD8⁺ Zellen in der Milz von immunisierten Tieren.
A: Prozentualer Anteil sowie absolute Zellzahl IFN- γ Produktion von mit PMA/Ionomycin stimulierten Zellen.
B: Vergleich der absoluten Zellzahl der IFN- γ ⁺ Zellen von immunisierten und nicht immunisierten Tieren. Die Werte der nicht immunisierten Tiere werden gleich 1 gesetzt. Die entnommenen Milzen wurden filtriert, die Erythrozyten lysiert, und die Zellen für 6 Stunden mit Brefeldin A und mit/ohne PMA/Ionomycin stimuliert. Es folgte die Färbung mit Antikörpern sowie die Analyse mittels LSRII. Die Ermittlung der absoluten Zellzahl erfolgte anhand der Berechnung der prozentualen Anteile auf die nach der Aufarbeitung ermittelte Gesamtzellzahl. Dargestellt sind die jeweils gemessenen Werte sowie die Mittelwerte der Messungen. Die Berechnung der Signifikanzen erfolgte mittels one way ANOVA mit anschließendem Tukey-Test. Signifikanzen wurden zu IL-15KO (rot) berechnet (***) = $p \leq 0,001$). $n = 5-11$

Sowohl die Werte der CD8⁺IFN- γ ⁺ Zellen von IL15RαKO, KIN 71Rα als auch von dKO liegen in prozentualen Darstellung als auch in der Aufzeichnung der absoluten Zellzahl auf der gleichen Ebene wie IL-15. Die durch die Immunisierung hervorgerufene Steigerung der IFN- γ produzierenden Zellen ist in KIN 71 und KIN 71Rα vergleichbar (1,97-2,04 faches). In den kranken WT sind CD8⁺IFN- γ ⁺ und das 1,5 fache erhöht, was vergleichbar mit den IL-15KO Tieren ist. Die Immunisierung bewirkt in dKO eine leichte Reduzierung der IFN- γ Produktion auf das 0,74 fache und bei IL-15 RαKO zu einer starken Minimierung auf das 0,24 von gesunden Tieren.

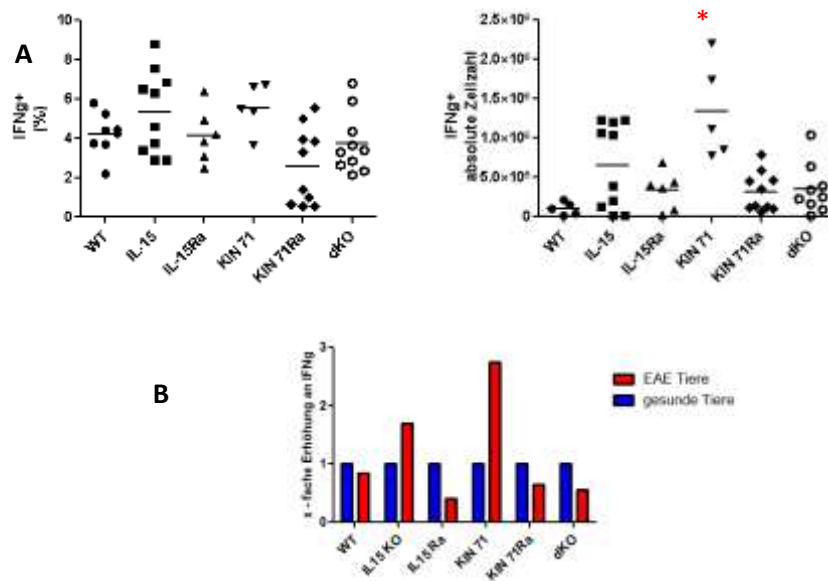


Abb. 90: IL-15R α bedingte IFN- γ Produktion von CD4⁺ T-Zellen in der Milz von immunisierter Tiere.
A: Prozentualer Anteil sowie absolute Zellzahl von IFN- γ von mit PMA/Ionomycin stimulierten Zellen. **B:** Vergleich der absoluten Zellzahl der IFN- γ ⁺ Zellen von immunisierten und nicht immunisierten Tieren. Die Werte der nicht immunisierten Tiere werden gleich 1 gesetzt. Die entnommenen Milzen wurden filtriert, die Erythrozyten lysiert, und die Zellen für 6 Stunden mit Brefeldin A und mit/ohne PMA/Ionomycin stimuliert. Es folgte die Färbung mit Antikörpern sowie die Analyse mittels LSRII. Die Ermittlung der absoluten Zellzahl erfolgte anhand der Berechnung der prozentualen Anteile auf die nach der Aufarbeitung ermittelte Gesamtzellzahl. Dargestellt sind die jeweils gemessenen Werte sowie die Mittelwerte der Messungen. Die Berechnung der Signifikanzen erfolgte mittels one way ANOVA mit anschließendem Tukey-Test. Signifikanzen wurden zu IL-15KO (rot) berechnet (* = $p \leq 0,05$). $n = 5-11$

Nach der Immunisierung tritt weder bei IL-15R α KO, noch bei KIN 71R α oder dKO bezogen zu IL-15 eine signifikante Veränderung der CD4⁺IFN- γ ⁺ Zellen auf. Durch den fehlenden Rezeptor in KIN 71R α geht zudem der vorher beschriebene Effekt in KIN 71 verloren. Durch die Immunisierung wird in den Stämmen ohne IL-15R α KO der Anteil der CD4⁺IFN- γ ⁺ Zellen um bis auf die Hälfte der Werte der gesunden Tiere reduziert. Dieser Effekt fällt in KIN 71R α und dKO vergleichbar und in IL-15R α KO am stärksten aus.

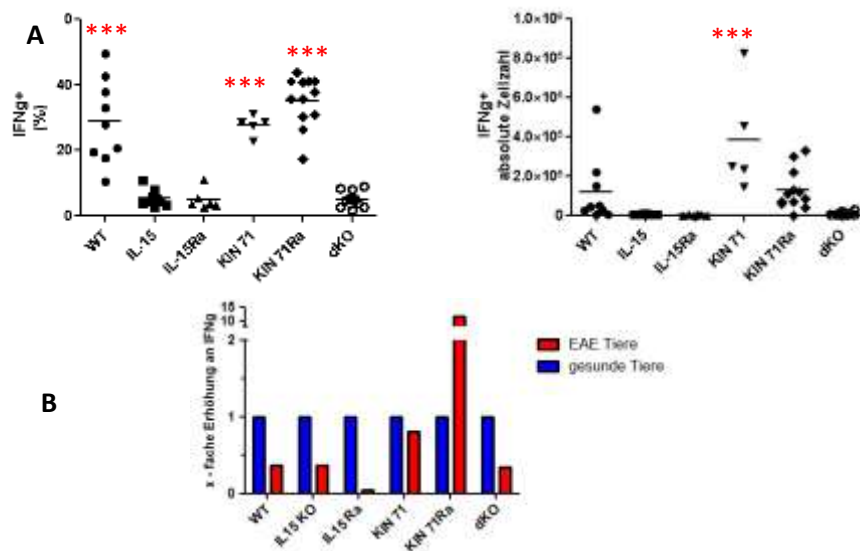


Abb. 91: IL-15R α bestimmte IFN- γ Produktion von NK-Zellen in der Milz von immunisierten Tieren
A: Prozentualer Anteil sowie absolute Zellzahl IFN- γ Produktion von mit PMA/Ionomycin stimulierten Zellen.
B: Vergleich der absoluten Zellzahl der IFN- γ ⁺-Zellen von immunisierten und nicht immunisierten Tieren. Die Werte der nicht immunisierten Tiere wurden gleich 1 gesetzt. Die entnommenen Milzen wurden filtriert, die Erythrozyten lysiert, und die Zellen für 6 Stunden mit Brefeldin A und mit/ohne PMA/Ionomycin stimuliert. Es folgte die Färbung mit Antikörpern sowie die Analyse mittels LSRII. Die Ermittlung der absoluten Zellzahl erfolgte anhand der Berechnung der prozentualen Anteile auf die nach der Aufarbeitung ermittelte Gesamtzellzahl. Dargestellt sind die jeweils gemessenen Werte sowie die Mittelwerte der Messungen. Die Berechnung der Signifikanzen erfolgte mittels one way ANOVA mit anschließendem Tukey-Test. Signifikanzen wurden zu IL-15KO (rot) berechnet (***) = $p \leq 0,001$. $n = 5-11$

Werden die erhaltenen Prozente der NK⁺IFN- γ ⁺ Zellen dargestellt, unterscheidet sich KIN 71R α stark signifikant zu IL-15KO, was in der Darstellung der absoluten Zellzahlen verloren geht. Die Werte von IL-15R α KO und dKO hingegen sind in beiden Darstellungsformen mit den Werten von IL-15 vergleichbar. Durch die Immunisierung steigt die absolute Zellzahl der NK⁺IFN- γ ⁺ Zellen in KIN 71R α auf das 11,56 fache von gesunden Tieren an. In dKO sind die absoluten Werte auf das 0,35 fache und bei IL-15R α KO sogar auf das 0,05 fache derer von gesunden Tieren reduziert.

4.13. Analyse der Lymphozyten und der Mikroglia im Gehirn von immunisierten Mäusen

Bei der Erkrankung an MS/EAE werden die Zellen des ZNS zerstört. Im Folgenden wird untersucht, ob IL-15/IL-15R α während der Erkrankung die Zusammensetzung der Zellen im Gehirn modulieren können. Zur Analyse des Effektes von IL-15/IL-15R α auf die lymphoiden Zellen und die Mikroglia des Gehirns immunisierter Mäuse erfolgte die Entnahme der Gehirne 15 Tage nach der Immunisierung. Hierfür wurden die Gehirne, wie auch bei den naiven Tieren, enzymatisch verdaut. Es folgte die Entfernung von Granulozyten und größeren Interneuronen mittels eines Percoll-Gradienten. Nach der Färbung mit Antikörpern erfolgte die Messung der Daten anhand des LSRII. Es wurde die gleiche Gating-Strategie wie auch schon bei den naiven Tieren angewandt. Auch nach der Immunisierung der Tiere war es nicht möglich die Populationen der CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten eindeutig zu bestimmen, da sich die Werte am Rand des Detektionslimits befanden.

4.13.1. Einfluss von IL-15 auf die residenten Lymphozyten im Gehirn nach der Immunisierung

Um zu analysieren, ob die Rekonstitution von IL-15 die Lymphozyten im Gehirn immunisierter Mäuse quantitativ beeinflusst, werden in Abb. 92 die prozentualen Anteile sowie die absolute Zellzahl der im Gehirn lokalisierten Lymphozyten ($CD45^{high+}$) in Abhängigkeit zu IL-15 dargestellt. Zusätzlich erfolgt der quantitative Vergleich der Lymphozyten von naiven und immunisierten Tieren um herauszufinden, ob sich der Einfluss von IL-15 durch die Erkrankung der Tiere ändert. Hierfür werden die absoluten Zellzahlen der naiven Tiere gleich 1 gesetzt und die der immunisierten Tiere darauf berechnet.

In diesem Abschnitt der vorliegenden Dissertation wird der Einfluss von IL-15 auf die identifizierten Populationen im Gehirn immunisierter Tiere dargestellt. Zusätzlich wird analysiert, ob sich der Einfluss von IL-15 durch die Immunisierung der Tiere ändert. Hierfür werden die absoluten Zellzahlen der naiven Tiere gleich 1 gesetzt und die der immunisierten Tiere im Verhältnis dazu berechnet.

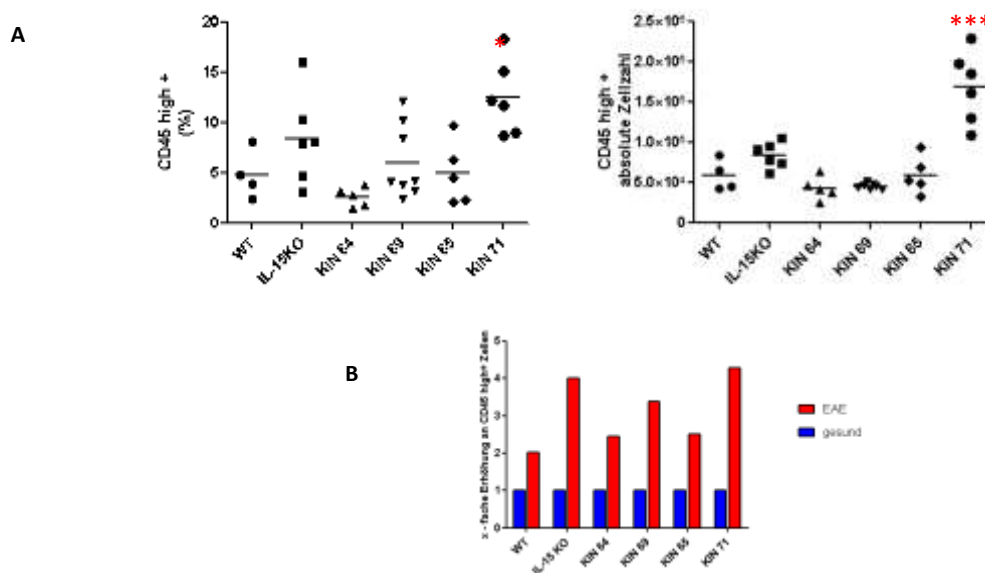


Abb. 92: Auswirkungen von IL-15 auf Lymphozyten im Gehirn immunisierter Tiere. A: Prozentualer Anteil und absolute Zellzahl der $CD45^{high+}$ Zellen. **B:** Vergleich der $CD45^{high+}$ Population in gesunden und an EAE erkrankten Tieren. Die Werte der nicht immunisierten Tiere wurden gleich 1 gesetzt. Die isolierten Gehirne wurden mit einem Skalpell zerkleinert und enzymatisch verdaut. Mittels eines Percoll-Gradienten wurden Granulozyten und größere Interneurone entfernt. Nach der Lyse der Erythrozyten wurden die Zellen mit Antikörpern gefärbt und mittels LSRII analysiert. Die Ermittlung der absoluten Zellzahl erfolgte anhand der Berechnung der prozentualen Anteile auf die nach der Aufarbeitung ermittelte Gesamtzellzahl. Dargestellt sind die jeweils gemessenen Werte sowie die Mittelwerte der Messungen. Die Berechnung der Signifikanzen erfolgte mittels one way ANOVA mit anschließendem Tukey-Test. Signifikanzen wurden zu IL-15KO (rot) berechnet (* = $p \leq 0,05$, *** = $p \leq 0,001$). $n = 5-7$

Die prozentualen Anteile sowie die absolute Zellzahl der gesamten Lymphozyten Population sind in den Gehirnen der KIN 71 Tiere verglichen zu den IL-15KO Tieren signifikant erhöht. Bei KIN 64, KIN 69, KIN 65 und WT ist die Anzahl der Lymphozyten vergleichbar mit den IL-15KO Tieren. Die Immunisierung hat in bei allen Stämmen eine Erhöhung der absoluten Zellzahl der Lymphozyten im Gehirn zur Folge. Diese Erhöhung ist in den IL-15KO, KIN 64 und KIN 71 Tieren am stärksten.

Nachdem der Einfluss der Rekonstitution von IL-15 nach der Immunisierung auf die gesamte Population der Lymphozyten untersucht wurde, folgte wie bereits schon bei den naiven Tieren die Analyse des Einflusses von IL-15 auf die lymphoiden NK-, B-Zellen sowie CD3⁺ T-Zellen.

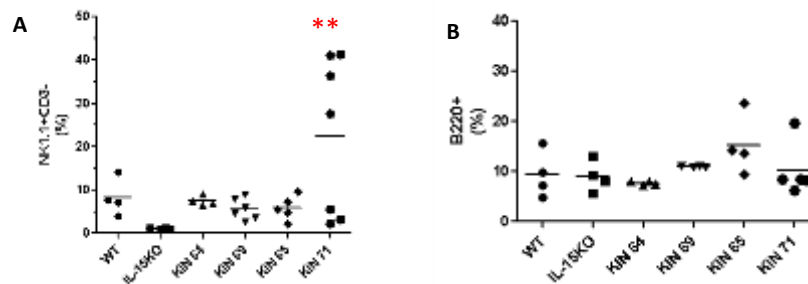


Abb. 93: IL-15 bedingte Effekte auf die NK- und B-Zellen im Gehirn nach der Immunisierung. Darstellung der prozentualen Anteile der NK-Zellen. B: Prozentuale Werte der B-Zellen. Die isolierten Gehirne werden mit einem Skalpell zerkleinert und enzymatisch verdaut. Mittels eines Percoll-Gradienten werden Granulozyten und größere Interneurone entfernt. Nach der Lyse der Erythrozyten wurden die Zellen mit Antikörpern gefärbt und mittels LSRII analysiert. Dargestellt sind die jeweils gemessenen Werte sowie die Mittelwerte der Messungen. Die Berechnung der Signifikanzen erfolgte mittels one way ANOVA mit anschließendem Tukey-Test. Signifikanzen wurden zu IL-15KO (rot) berechnet (** = $p \leq 0,01$). $n = 5-7$

Bei den KIN 71 Tieren ist der Anteil der NK-Zellen im Gehirn verglichen zu IL-15KO signifikant erhöht. Die Werte von WT, KIN 64, KIN 69 und KIN 65 sind vergleichbar. In den IL-15KO Tieren ist der Anteil der NK-Zellen verglichen zu dem WT nicht signifikant reduziert. Die Anteile der B-Zellen sind in allen untersuchten Stämmen unabhängig von IL-15 miteinander vergleichbar.

In Abbildung 94 sind die prozentualen Anteile der Expression von CD3⁺ T-Lymphozyten im Gehirn dargestellt.

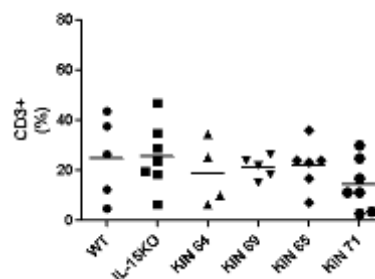


Abb. 94: Expression von CD3⁺ T-Lymphozyten in immunisierten Mäusen in Abhängigkeit von IL-15. Prozentualer Anteil der CD3⁺ Lymphozyten im Gehirn. Die isolierten Gehirne werden mit einem Skalpell zerkleinert und enzymatisch verdaut. Mittels eines Percoll-Gradienten werden Granulozyten und größere Interneurone entfernt. Nach der Lyse der Erythrozyten wurden die Zellen mit Antikörpern gefärbt und mittels LSRII analysiert. Dargestellt sind die jeweils gemessenen Werte sowie die Mittelwerte der Messungen. Die Berechnung der Signifikanzen erfolgte mittels one way ANOVA mit anschließendem Tukey-Test. $n = 5-7$

Die Expression der CD3⁺ T-Lymphozyten ist unabhängig von IL-15 in den Gehirnen von WT, IL-15 KO und den IL-15 transgenen Stämmen nach der Immunisierung vergleichbar.

4.13.2. Effekt von IL-15R α auf die residenten Lymphozyten im Gehirn nach der Immunisierung

Um den Effekt der Trans-Präsentation auf die Lymphozyten im Gehirn zu untersuchen, wird auch hier zuerst die komplette Population der Lymphozyten betrachtet. Zusätzlich wird analysiert, ob sich der Einfluss von IL-15R α durch die Immunisierung der Tiere ändert. Hierfür werden die absoluten Zellzahlen der naiven Tiere gleich 1 gesetzt und die der immunisierten Tiere im Verhältnis dazu berechnet. Zur Verdeutlichung des Effektes von IL-15R α werden die Daten der bereits analysierten Stämme WT, IL-15KO und KIN 71 in den folgenden Grafiken nochmals mit dargestellt.

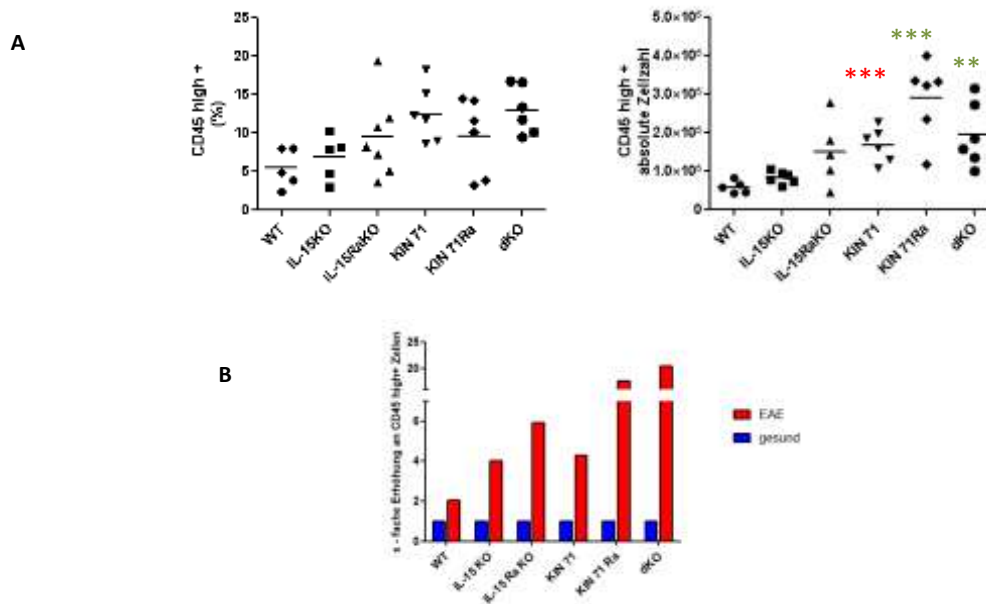


Abb. 95: Lymphozyten im Gehirn immunisierter Mäuse unter dem Einfluss von IL-15R α . **A:** Prozentualer Anteil sowie absolute Zellzahl der lymphoiden (CD45 $^{high+}$) Zellen. **B:** Vergleich der absoluten Zellzahl der lymphoiden (CD45 $^{high+}$) Zellen in gesunden und EAE-Tieren. Die Werte der naiven Tiere wurden gleich 1 gesetzt und die der immunisierten im Verhältnis dazu berechnet. Die isolierten Gehirne werden mit einem Skalpell zerkleinert und enzymatisch verdaut. Mittels eines Percoll-Gradienten werden Granulozyten und größere Interneurone entfernt. Nach der Lyse der Erythrozyten wurden die Zellen mit Antikörpern gefärbt und mittels LSRII analysiert. Die Ermittlung der absoluten Zellzahl erfolgte anhand der Berechnung der prozentualen Anteile auf die nach der Aufarbeitung ermittelte Gesamtzellzahl. Dargestellt sind die jeweils gemessenen Werte sowie die Mittelwerte der Messungen. Die Berechnung der Signifikanzen erfolgte mittels one way ANOVA mit anschließendem Tukey-Test. Signifikanzen wurden zu IL-15KO (rot) sowie zu KIN 71 (grün) berechnet (** = $p \leq 0,05$, *** = $p \leq 0,001$). $n = 5-7$

Die absolute Zellzahl der Lymphozyten ist in KIN 71R α und dKO verglichen zu IL-15 stark signifikant angestiegen. Bei IL-15R α KO ist diese Population ebenfalls erhöht, es besteht allerdings kein signifikanter Unterschied zu IL-15KO. Bei der Darstellung der prozentualen Anteile der Lymphozyten im Gehirn sind keine IL-15 abhängigen Einflüsse erkennbar. Durch die Immunisierung werden die Lymphozyten im Gehirn von IL-15R α KO, KIN 71R α und dKO verstärkt exprimiert.

Um herauszufinden, ob der stimulierende Effekt von IL-15R α auf eine bestimmte Population zurückzuführen ist werden im Folgenden die CD3 $^{+}$ T-Lymphozyten sowie die NK- und B-Zellen analysiert.

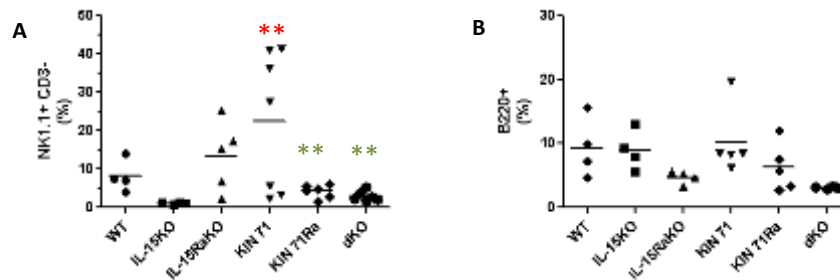


Abb. 96: Einfluss von IL-15R α auf NK und B-Zellen im Gehirn immunisierter Mäuse. **A:** Prozentuale Anteile der NK-Zellen. **B:** Anteil der B-Zellen. Die isolierten Gehirne werden mit einem Skalpell zerkleinert und enzymatisch verdaut. Mittels eines Percoll-Gradienten werden Granulozyten und größere Interneurone entfernt. Nach der Lyse der Erythrozyten wurden die Zellen mit Antikörpern gefärbt und mittels LSRII analysiert. Dargestellt sind die jeweils gemessenen Werte sowie die Mittelwerte der Messungen. Die Berechnung der Signifikanzen erfolgte mittels one way ANOVA mit anschließendem Tukey-Test. Signifikanzen wurden zu IL-15KO (rot) sowie zu KIN 71 (grün) berechnet (** = $p \leq 0,05$). $n = 5-7$

In den immunisierten Tieren ist der Anteil der NK-Zellen in KIN 71R α und dKO vergleichbar mit dem Anteil bei den IL-15KO Mäusen und unterscheidet sich somit Signifikant (**) von KIN 71. Bei IL-15R α KO ist die Menge der NK-Zellen vergleichbar mit dem WT. Die Menge der B-Zellen ist in den IL-15R α defizienten Tieren leicht reduziert.

Die Präsenz der CD3⁺T-Lymphozyten in Abwesenheit von IL-15R α ist in Abbildung 97 dargestellt.

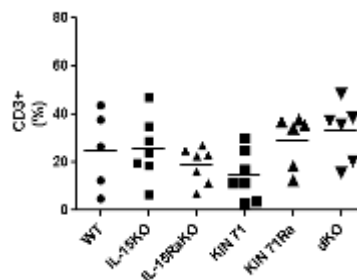


Abb. 97: Anteil der CD3⁺T-Lymphozyten im Gehirn immunisierter Mäuse in Abwesenheit von IL-15R α . Darstellung der prozentualen Anteile der CD3⁺ T-Lymphozyten. Die isolierten Gehirne werden mit einem Skalpell zerkleinert und enzymatisch verdaut. Mittels eines Percoll-Gradienten werden Granulozyten und größere Interneurone entfernt. Nach der Lyse der Erythrozyten wurden die Zellen mit Antikörpern gefärbt und mittels LSRII analysiert. Dargestellt sind die jeweils gemessenen Werte sowie die Mittelwerte der Messungen. Die Berechnung der Signifikanzen erfolgte mittels one way ANOVA mit anschließendem Tukey-Test. $n = 5-7$

Die prozentualen Anteile der CD3⁺-Zellen sind in IL-15R α KO, KIN71 R α und dKO mit denen des WT und IL-15KO vergleichbar. Die Abwesenheit von IL-15R α hat in den immunisierten Tieren keinen quantitativen Effekt auf die Population der CD3⁺ T-Lymphozyten.

Abschließend kann man sagen, dass IL-15 und IL-15R α die Bildung der gesamte Population der lymphoiden Zellen in dem Gehirn immunisierter Mäuse positiv beeinflussen. Bei der Betrachtung der Subpopulationen fällt auf, dass die Überexpression von IL-15 zu einer Erhöhung des Anteils der NK-Zellen in den Gehirnen immunisierter Mäuse führt. Dieser Effekt ist von IL-15R α abhängig. Die untersuchten B-Zellen und CD3⁺ T-Lymphozyten werden von IL-15/IL-15R α nicht beeinflusst.

4.13.3. Analyse der Mikrogliia im Gehirn immunisierter Mäuse in Abhängigkeit von IL-15/IL-15R α

Mikrogliia sind die APCs des Gehirns und können eine entscheidende Rolle bei der Aktivierung der Lymphozyten im Gehirn einnehmen. Aus diesem Grund erfolgte die Analyse dieser Zellen auf ihre Modulierbarkeit durch IL-15/IL-15R α . In Abbildung 98 ist der Einfluss der Rekonstitution von IL-15 auf die Gliazellen dargestellt. Zusätzlich wird analysiert, ob sich der Einfluss von IL-15 durch die Immunisierung der Tiere ändert. Hierfür werden die absoluten Zellzahlen der naiven Tiere gleich eins gesetzt und die der immunisierten Tiere im Verhältnis dazu gesetzt.

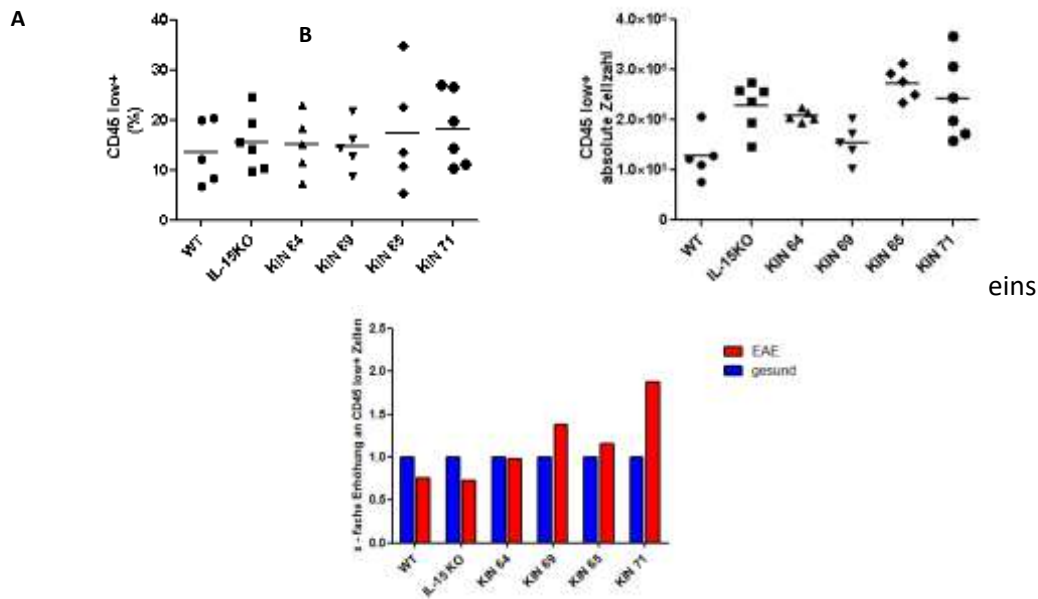


Abb. 98: Effekt von IL-15 auf die Mikrogliia im Gehirn nach der Immunisierung der Mäuse . A: Prozentualer Anteil und absolute Zellzahl der Mikrogliia. B: Vergleich der absoluten Zellzahl vor und nach der Immunisierung. Die Werte der naiven Tiere wurden gleich eins gesetzt und die der immunisierten im Verhältnis dazu berechnet. Die isolierten Gehirne werden mit einem Skalpell zerkleinert und enzymatisch verdaut. Mittels eines Percoll-Gradienten werden Granulozyten und größere Interneurone entfernt. Nach der Lyse der Erythrozyten wurden die Zellen mit Antikörpern gefärbt und mittels LSRII analysiert. Die Ermittlung der absoluten Zellzahl erfolgte anhand der Berechnung der prozentualen Anteile auf die nach der Aufarbeitung ermittelte Gesamtzellzahl. Dargestellt sind die jeweils gemessenen Werte sowie die Mittelwerte der Messungen. Die Berechnung der Signifikanzen erfolgte mittels one way ANOVA mit anschließendem Tukey-Test. $n = 5-7$

Sowohl bei der Darstellung der prozentualen Anteile, als auch bei der Auftragung der absoluten Zellzahl unterscheiden sich WT, IL-15KO und die IL-15 transgenen Stämme nicht signifikant voneinander. Die Rekonstitution von IL-15 hat keinen Einfluss auf die Menge der Mikrogliia. Durch die Immunisierung wird der absolute Wert der Mikrogliia in WT und IL-15 vergleichbar reduziert. In KIN 69, KIN 65 und KIN 71 sind die Mikrogliia durch die Immunisierung erhöht. In KIN 64 hat die Immunisierung der Tiere keinen Effekt auf die Menge der Mikrogliia im Gehirn.

Abbildung 99 zeigt den Einfluss des IL-15R α in den IL-15R α defizienten Tieren auf die Menge der Mikroglia im Gehirn immunisierter Tiere. Hierbei werden die bereits analysierten Daten der Stämme WT, IL-15KO und KIN 71 zu Visualisierung des IL-15R α Effektes nochmals gezeigt.

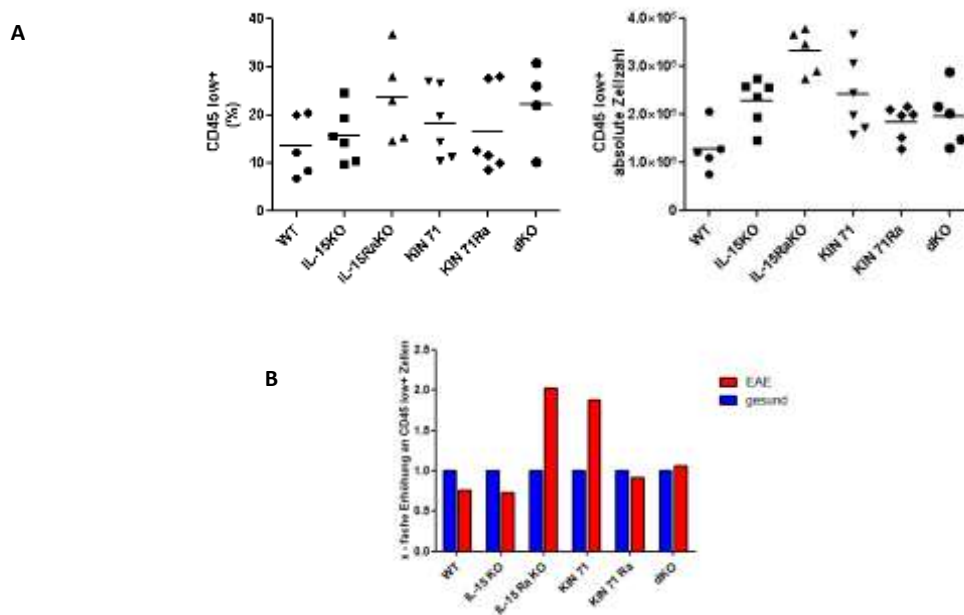


Abb. 99: Menge der Mikroglia im Gehirn immunisierter Tiere in Abwesenheit von IL-15R α . **A:** Prozentuale Anteile sowie absolute Zellzahl der Mikroglia. **B:** Vergleich der Menge der Mikroglia in gesunden und EAE-Tieren. Die Werte der naiven Tiere wurden gleich 1 gesetzt und die der immunisierten im Verhältnis dazu berechnet. Die isolierten Gehirne werden mit einem Skalpell zerleinert und enzymatisch verdaut. Mittels eines Percoll-Gradienten werden Granulozyten und größere Interneurone entfernt. Nach der Lyse der Erythrozyten wurden die Zellen mit Antikörpern gefärbt und mittels LSRII analysiert. Die Ermittlung der absoluten Zellzahl erfolgte anhand der Berechnung der prozentualen Anteile auf die nach der Aufarbeitung ermittelte Gesamtzellzahl. Dargestellt sind die jeweils gemessenen Werte sowie die Mittelwerte der Messungen. Die Berechnung der Signifikanzen erfolgte mittels one way ANOVA mit anschließendem Tukey-Test. $n = 5-7$

Die Abwesenheit von IL-15R α hat keinen Einfluss auf die prozentualen Anteile oder die absolute Zellzahl der Mikroglia im Gehirn der erkrankten Mäuse. Durch die Immunisierung wird die Menge der Mikroglia in den KIN 71R α und dKO Tieren nicht beeinflusst. In den IL-15R α KO Tieren hingegen hat die Immunisierung eine Erhöhung der Mikroglia im Gehirn zur Folge.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Rekonstitution von IL-15 in den KIN 71 Tieren und der fehlende IL-15R α in den IL-15R α KO Tieren eine signifikante Erhöhung der Mikroglia zur Folge haben.

5. Diskussion

5.1. Unterschiedliche Produktion von IL-15 in den IL-15 transgenen Stämmen

Die Grundlage dieser Arbeit bildet die unterschiedlich starke IL-15 Produktion durch die CD11c⁺-Zellen der IL-15 transgenen Stämme. Deshalb wurde zuerst die Analyse der relativen Expression von CD11c und IL-15 auf der RNA-Ebene mittels qRT-PCR durchgeführt. Die relative Expression von CD11c auf der RNA-Ebene ist in den WT, den IL-15 transgenen (IL-15KO, KIN 64, KIN 69, KIN 65, KIN 71), den IL-15R α defizienten Tieren (KIN 71R α), welche das IL-15 nicht trans-präsentieren können, und negativen Kontrollen (dKO, IL-15R α KO) vergleichbar. Deshalb ist davon auszugehen, dass die Expression des Transgens keinen Effekt auf die CD11c-Expression auf der RNA-Ebene hat. Andererseits wird damit indirekt überprüft, ob die IL-15/IL-15R α Interaktion zur Erhöhung der Proliferation oder zur Inhibition der Apoptose der CD11c⁺ Zellen führen könnte. Vergleichbare CD11c Expression auf der mRNA Ebene spricht jedoch gegen einen solchen Effekt. Diese vergleichbaren CD11c mRNA Daten stimmen überein mit der Quantifizierung der CD11c⁺-Zellen in der Milz [255]. Ob dies in allen anderen Organen des Immunsystems der Fall ist und ob die Unterschiede in der IL-15 Produktion eine Auswirkung auf die CD11c⁺ Zellen in anderen Organen hat, ist noch nicht bekannt.

Bei der Messung der relativen Expression von IL-15 auf der RNA-Ebene kommt es bei IL-15KO und dKO Tieren zu zwar geringen, aber dennoch falsch positiven Ergebnissen. In diesen Tieren dürfte aufgrund ihrer genetischen Modifikation keine RNA für IL-15 vorhanden sein. Grund für die falsch positiven Ergebnisse könnte eine Kontamination der Proben z.B. während der Entnahme sein. Um zu testen, ob in diesen Proben tatsächlich RNA für IL-15 enthalten ist, kann das qRT-PCR-Produkt auf ein Agarosegel aufgetragen werden. Hierbei könnte geprüft werden, ob ein PCR-Produkt von einer bestimmten Größe entstanden ist. Dies wurde allerdings im Rahmen dieser Arbeit nicht getestet. Die qRT-PCR Daten zeigen, dass die Expression von IL-15 auf der RNA-Ebene in allen IL-15 transgenen Stämmen stattfindet und in den Stämmen KIN 69, KIN 65, KIN 71 und KIN 71R α über dem WT Level liegt. Hierbei unterscheiden sich KIN 71 und KIN 71R α nicht in ihrer IL-15 Expression. Bei der Protein-Expression in *in vitro* generierten BMDCs ist lediglich bei den KIN 71 Tieren eine stärkere Expression von IL-15 als in dem WT vorhanden [255]. Da die posttranskriptionale Regulation von IL-15 sehr komplex ist, kann man nicht ausschließen, dass die Insertionsstelle des Transgens einen Effekt auf die Stabilität des Transkriptes hat.

Die in dieser Arbeit verwendeten IL-15 transgenen sowie die zusätzlich IL-15R α defizienten Mausstämme stellen ein einmaliges Werkzeug dar, um die Funktion von IL-15 zu untersuchen. Einerseits wird die IL-15 Produktion weitgehend auf einen Zelltyp reduziert - nur CD11c⁺ Zellen sind in der Lage das Zytokin zu produzieren. Andererseits, erlauben die unterschiedlichen Mengen des produzierten Zytokins eine graduelle Rekonstituierung der IL-15-abhängigen Zellpopulationen. Zusätzlich ermöglichen die Stämme KIN 71 und KIN 71R α die Differenzierung zwischen den Effekten von freiem, durch CD11c⁺-Zellen produziertem IL-15 und IL-15, das an IL-15R α gebundenen ist und trans-präsentiert wird. Bisher ist kein solches Mausmodell beschrieben worden, welches direkt die Effekte von unterschiedlichen Mengen von IL-15 und von trans-präsentiertem und freiem IL-15 vergleichen lässt.

5.2. Charakterisierung *in vitro* kultivierter Bone Marrow Dendritic Cells in Abhängigkeit zu IL-15/IL-15R α

Ziel der Charakterisierung der BMDCs war es, zu verstehen, ob das durch die DCs produzierte IL-15 einen intrinsischen Effekt auf diese hat. Von Zanoni et al. konnte bereits eine intrinsische Stimulation von IL-15 auf die NK-Zellen beschrieben werden [273]. Um den intrinsischen Effekt von IL-15 auf die DCs zu untersuchen, wurde die Expression ausgewählter kostimulatorischer Moleküle analysiert. Des Weiteren wurde untersucht, ob die LPS-Stimulation im Kontext von IL-15/IL-15R α einen Einfluss auf die Expression der kostimulatorischen Moleküle hat.

Um ausschließen zu können, dass die DCs in den IL-15 rekonstituierten Stämmen während ihrer Entwicklung von der unterschiedlichen Expression von IL-15 oder der Abwesenheit von IL-15R α beeinflusst werden, wurden die Versuche mit BMDCs durchgeführt. Die BMDCs wurden *in vitro* aus den Stammzellen des Knochenmarks generiert und als CD11c⁺CD11b⁺-Zellen mit hohem SSC charakterisiert.



Abb. 100: Effekte von IL-15/IL-15R α auf die BMDCs. Von den BMDCs sekretiertes IL-15/IL-15R α übt Einfluss auf unterschiedliche Zielzellen aus. Hat das von dem BMDCsproduzierte Zytokin oder sein Rezeptor auch einen intrinsischen Effekt auf die BMDCs selbst?

Die Stimulation der BMDCs mit LPS bewirkt unabhängig von IL-15/IL-15R α eine verstärkte Expression der MHC Klasse I und II Moleküle sowie der kostimulatorischen Moleküle CD80, CD86, CD40 und CD252. CD70, welches wichtig für das Überleben der T-Lymphozyten ist, wird durch die Stimulation mit LPS nicht verstärkt exprimiert [274]. Die Stimulation der BMDCs mit LPS induziert wie erwartet die Reifung dieser Zellen [275]. Obwohl in der Literatur der aktivierende Effekt von IL-15/IL-15R α auf DCs beschrieben ist [276], ist in den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten keine IL-15/IL-15R α abhängige Aktivierung und somit der Expression der MHC Klasse I und II oder der untersuchten kostimulatorischen Moleküle erkennbar. Um sicherzustellen, dass das durch die CD11c⁺-Zellen produzierte IL-15 keinen intrinsischen Effekt auf BMDCs hat, müsste die Expression weiterer kostimulatorischer Moleküle untersucht werden. Für die Charakterisierung des Effektes von IL-15/IL-15R α auf die *in vitro* kultivierten BMDCs wurden nur ausgewählte kostimulatorische Moleküle untersucht. Es könnte also dennoch sein, dass IL-15/IL-15R α die Expression anderer, im Rahmen dieser Arbeit nicht untersuchter, kostimulatorischer Moleküle, beeinflusst. Zudem könnte Zytokinproduktion der BMDCs in Abhängigkeit von IL-15/IL-15R α untersucht werden.

Nachdem dieser Teil der Experimente abgeschlossen war, wurde publiziert, dass die für die Generierung der BMDCs verwendete Methode von Lutz et al. [277] nicht, wie man bis jetzt davon ausging, zu einer homogenen Population von BMDCs führt. Stattdessen erhält man durch die

Kultivierung heterogene, aus CD11c⁺ und MHC Klasse II⁺ Makrophagen und DCs bestehende, Populationen [278]. Um auszuschließen, dass IL-15/IL-15R α abhängige Effekte nur in einer BMDC Population vorkommen, wurden die generierten Daten wiederholt analysiert. Die Aussage, dass BMDCs bezüglich der Expression von CD11b und CD11c heterogen sind, konnte mit den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten nicht bestätigt werden.

5.3. Antigenabhängige Stimulation von CD8⁺-Zellen unter Einfluss von IL-15/IL-15R α

Des Weiteren wurde untersucht, ob die BMDCs, in denen IL-15 rekonstituiert wurde, die Proliferation von CD8⁺ T-Zellen qualitativ unterschiedlich induzieren könnten. Dazu wurde ein Kross-Präsentationsmodell verwendet, bei dem BMDCs mit einem spezifischen Peptid beladen und mit transgenen, CFSE-markierten CD8⁺ T-Zellen inkubiert wurden. Dabei wurde gefragt, in wie fern das in den BMDCs präsente IL-15/IL-15R α die antigenabhängige Proliferation von CD8⁺ T-Zellen beeinflusst.

Die Beladung mit OVA²⁵⁷⁻²⁶⁴ ermöglichte die antigenspezifische Stimulation der transgenen TCR der CD8⁺ T-Zellen der OTI Mäuse, was durch die Messung der T-Zell Proliferation nachgewiesen wurde. Dabei konnten keine IL-15/IL-15R α -abhängigen Effekte beobachtet werden. Es kann aber nicht ausgeschlossen werden, dass die TCR-spezifischen Signale zu stark sind und die Zellen die maximale erreichbare Antwort zeigen. Deshalb wären hier weitere Experimente mit z.B. niedrigeren OVA²⁵⁷⁻²⁶⁴ Peptidkonzentrationen, oder einem abgewandeltem OVA²⁵⁷⁻²⁶⁴ G4 Peptid, bei dem ein Aminosäureaustausch von Asparagin zu Glycin eine deutlich niedrige Bindungsaffinität des TCR mit sich zieht [279], denkbar. Die Stimulation der BMDCs mit LPS hat keinen Einfluss auf die antigenspezifische Stimulation der CD8⁺ T-Zellen in Bezug auf deren Proliferation. In diesen experimentellen Settings konnten keine IL-15/IL-15R α spezifischen Einflüsse auf die Proliferation der CD8⁺ T-Zellen festgestellt werden. Dies spricht gegen den von IL-15 beschriebenen Effekt, welches für die Aktivierung und die Differenzierung von CD8⁺ T- und CD8 Gedächtnis-Zellen wichtig ist [280].

Die Stimulation von BMDCs mit LPS wirkt sich unabhängig von IL-15 positiv auf die Viabilität der CD8⁺ T-Zellen aus. Bei den CD8⁺ T-Zellen, die mit LPS stimulierten BMDCs aus IL-15R α oder KIN 71R α Mäusen kultiviert wurden, ist die Viabilität reduziert. Interessanterweise hat die Abwesenheit des Zytokins IL-15 keinen Effekt auf das Überleben von CD8⁺ T-Zellen. Dies lässt darauf schließen, dass IL-15R α die BMDCs in ihrer Sekretion von anderen Zytokinen, welche für das Überleben der CD8⁺ T-Zellen essentiell sind, beeinflusst. Die Beladung der BMDCs mit OVA²⁵⁷⁻²⁶⁴ Peptid erhöht die Viabilität der CD8⁺ T-Zellen unabhängig von IL-15/IL-15R α in allen Tieren gleichermaßen. Die gleichzeitige Stimulation mit LPS führt wahrscheinlich zu einer Überaktivierung der Zellen, was zu dem aktivierungsinduzierten Zelltod und der Reduktion der Viabilität der Zellen führt. Der beschriebene antiapoptotische Effekt von IL-15 war in den hier durchgeführten Experimenten nicht messbar [281]. Die Messung der Viabilität nach kürzeren Zeitpunkten (24 und 48 Stunden) könnte eventuell ein anderes Bild zeigen. Um den antiapoptotischen Effekt von IL-15/IL-15R α zu untersuchen, könnte man bei der Analyse der Zellen apoptosespezifische Marker (Annexin V) verwenden. T-Zell Stimulationsassays, in denen CD8⁺ T-Zellen aus OT I-Mäusen verwendet werden, benötigen die zusätzliche Kontrolle der eingesetzten T-Zellen. So zeigen kürzlich publizierte Ergebnisse, dass es zu spontanen Verlusten von Teilen des TCR der OTI-Tiere kommen kann [282]. Besitzen die Tiere keinen aktiven transgenen TCR, können die CD8⁺ T-Zellen durch die Anwesenheit von OVA²⁵⁷⁻²⁶⁴ nicht mehr antigenspezifisch stimuliert werden. In diesem Fall wird die unspezifische Aktivierung der CD8⁺ T-Lymphozyten gemessen. Die Typisierung der transgenen

OTI-Tiere erfolgte für die hier durchgeführten Experimente über die Detektion der transgenen β -Kette des TCR. Um sicherzustellen, dass die α und β -Kette des TCR nicht nur vorhanden sind, sondern auch funktionell den Peptid-MHC Klasse I Komplex erkennen, muss die Typisierung der Tiere anhand der Tetramere erfolgen.

5.4. Zytokinproduktion während der antigenabhängigen Stimulation von CD8⁺ T-Zellen und Effekt von IL-15/IL-15R α

Aktivierte T-Lymphozyten zeigen eine verstärkte Sekretion der Zytokine IFN- γ und IL-2. Wie bereits beschrieben, konnte kein Effekt von IL-15 oder IL-15R α auf die Proliferation der CD8⁺ T-Zellen detektiert werden. Die Messung der Menge der produzierten Zytokine IFN- γ und IL-2 im Überstand der Kulturen nach der 72 stündigen Inkubation wurde untersucht, um zu analysiert, ob die antigenspezifische Stimulation der CD8⁺ T-Zellen bezüglich der Zytokinproduktion von IL-15/IL-15R α beeinflusst wird. Die in KIN 69 reduzierte Menge des produzierten IFN- γ ist als IL-15 unabhängiges Ereignis zu deuten, da in den anderen Stämmen kein Effekt von IL-15 zu sehen ist. Die Stimulation mit LPS führt dazu, dass die Produktion von IL-15 durch die BMDCs verstärkt wird [276], was zur Folge hat, dass die Produktion von IFN- γ erhöht wird. Die gemessene Menge von IL-2 wird durch die LPS Stimulation der BMDCs deutlich reduziert und nicht durch das IL-15 Transgen rekonstituiert. Die aus der IL-15R α -Defizienz resultierende Reduktion der messbaren Menge von IL-2 in stimulierten und nicht stimulierten IL-15R α KO und dKO Kulturen, lässt darauf schließen, dass IL-15R α auf den BMDCs essentiell für die Produktion von IL-2 durch CD8⁺ T-Zellen ist. Die IL-2 Mengen in den KIN 71R α Zellkulturen hingegen sind vergleichbar mit dem WT, was vermuten lässt, dass von IL-15 doch ein Effekt auf die Sekretion der Zytokine von antigenspezifisch stimulierten CD8⁺ T-Zellen ausgehen könnte. Dieser wird allerdings erst in Abwesenheit von IL-15R α sichtbar. Es wurde schon mehrfach publiziert, dass IL-15 Einfluss auf die Stimulation und somit die Zytokinproduktion der CD8⁺T-Lymphozyten hat [283-284]. Dies konnte hier nicht eindeutig gezeigt werden. Eine Begründung hierfür könnte sein, dass die Menge von IFN- γ /IL-2 in den Überständen erst nach 72 stündiger Inkubationszeit gemessen wurde. Das von den CD8⁺ T-Zellen produzierte IFN- γ /IL-2 ist essentiell für die Immunantwort was sich darin zeigt, dass die beiden Zytokine auch von den BMDCs und den CD8⁺ T-Lymphozyten aufgenommen werden können. Gemessen werden kann dann nur noch die Menge IFN- γ /IL-2, die nach 72 Stunden nicht von den aktivierten Zellen aufgenommen wurde. Um die Produktion von IFN- γ /IL-2 verlässlicher analysieren zu können, müssten die Zytokinkonzentration nach kürzeren Inkubationszeiten gemessen werden. Ein weiterer Grund für die Streuung der Resultate innerhalb der Experimente könnte auch hier der bereits in 5.3. beschriebene spontane Verlust des transgenen TCRs der OTI Mäuse sein.

5.5. IL-15/IL-15 R α beeinflussen den Phänotyp von Dendritischen Zellen und Makrophagen in der Milz nicht

Die anhand des Kollagenase-Verdau aus der Milz isolierten reifen DCs unterscheiden sich deutlich von BMDCs und sind reif und terminal differenziert. In den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten ist kein Einfluss von IL-15/IL-15R α auf die Reifung der DCs erkennbar. Diese Erkenntnis stimmt mit den Resultaten der qRT-PCR (5.1.), welche besagen, dass die Expression der CD11c RNA nicht von IL-15/IL-15R α beeinflusst werden, überein. Zudem kann dies durch die in der vorliegenden Arbeit durchgeführter Analyse der *in vitro* kultivierten BMDCs (5.2.) bestätigt werden.

Die Analyse der kostimulatorischen Moleküle ergab auch bei den aus der Milz isolierten, *in vivo* gereiften DCs, dass weder IL-15 noch IL-15R α Einfluss auf die Reifung dieser Zellen haben. Die quantitative Analyse der Makrophagen ergab ebenfalls, dass die unterschiedliche Produktion von IL-15 und das Vorhandensein von IL-15R α die Präsenz dieser Zellen nicht beeinflusst. Nicht publizierte Daten unserer Gruppe zeigen eine von IL-15/IL-15R α abhängige Aktivierung der Alveolarmakrophagen in der Lunge.

5.6. Die Modulierbarkeit des Krankheitsverlaufs der Experimentellen Autoimmunen Enzephalomyelitis durch IL-15/IL-15R α

Die EAE stellt ein heterogenes, sehr komplexes Tiermodell dar, dessen Verlauf durch unterschiedliche experimentelle Faktoren wie Geschlecht, Alter, Gewicht, Stress und unterschiedliche Mikrobiome stark beeinflusst werden kann [287]. Um die Experimente möglichst homogen zu gestalten, wurden deshalb ausschließlich weibliche Tiere im Alter von 8-10 Wochen verwendet. Darüber hinaus wurden für jede Versuchsreihe Tiere mit ähnlichem Gewicht verwendet. Zudem wurden nach Möglichkeit Wurfgeschwister verwendet, da diese Tiere ähnliche Mikrobiome haben. Da das Zusammensetzen der Tiere aus unterschiedlichen Gruppen für diese einen großen Stressfaktor darstellt, erfolgte die Zusammenstellung der späteren Versuchsgruppen bereits eine Woche vor der Immunisierung der Tiere, um zusätzlichen Stress zu vermeiden. Ebenfalls um den Stress für die Tiere zu reduzieren, wurden diese während der Versuchsdauer immer von der gleichen Person gescored, gewogen und die Käfige gereinigt.

5.6.1. Die Rekonstitution von IL-15 ermöglicht keine Milderung des Krankheitsverlaufs

Die Rekonstitution von IL-15 führt dazu, dass die IL-15 transgenen Tiere einen milderen Krankheitsverlauf haben als die IL-15KO Tiere. Jedoch ist es nicht möglich einen mit den WT-Tieren ähnlichen oder abgeschwächten Krankheitsverlauf durch die Rekonstitution von IL-15 zu erreichen. Die Tatsache, dass die KIN 71 Tiere erst spät erkranken, lässt vermuten, dass IL-15 in der Inizierungsphase der Erkrankung wahrscheinlich eine eher protektive Rolle spielt. Nach dem Ausbruch der Erkrankung haben diese Tiere einen sehr starken Krankheitsverlauf. Auch müssen von den KIN 71 Tieren die meisten Tiere aufgrund der Schwere der Erkrankung und des starken Gewichtsverlusts getötet werden. Diese Erkenntnisse deuten darauf hin, dass IL-15 im weiteren Verlauf der EAE eine eher destruktive Funktion hat. Es konnte bereits mehrfach gezeigt werden, dass der Krankheitsverlauf in IL-15KO Tieren, verglichen zu WT-Tieren, viel stärker verläuft [288-290], was auch in den hier gezeigten Experimenten bestätigt werden kann. In den mit diesen Settings durchgeführten Experimenten konnte kein direkter Zusammenhang von der Dosis von IL-15 und der Schwere der Erkrankung erkannt werden.

5.6.2. IL-15R α beeinflusst den Krankheitsverlauf der Experimentellen Autoimmunen Enzephalomyelitis

Bei den IL-15R α KO Tieren bricht die Erkrankung als erstes aus. Diese Tiere zeigen zudem den schwersten Krankheitsverlauf, was darauf schließen lässt, dass IL-15R α eine tragende Rolle sowohl bei der Initiierung als auch bei dem Verlauf der Erkrankung der EAE hat [291]. Die Erkrankung verläuft bei den IL-15R α KO Tieren stärker als bei den IL-15KO Tieren, weshalb davon auszugehen ist, dass IL-15R α einen stärkeren Effekt auf die Erkrankung hat als IL-15 selbst. Der Einfluss von IL-15R α auf die Initiierung von EAE wird in KIN 71R α , welche in der Anfangsphase einen stärkeren Krankheitsverlauf wie die KIN 71 Tiere haben, nochmals deutlich. Im späteren Verlauf der Erkrankung zeigen KIN 71 und

KIN 71R α vergleichbar starke Symptome, was vermuten lässt, dass hier der Einfluss von IL-15R α nicht mehr so stark ist. Der Verlauf der Erkrankung ist sowohl von IL-15, als auch von seinem hoch affinen IL-15R α abhängig, wobei die Abhängigkeit zu IL-15R α stärker ist. Verglichen zu IL-15R α KO verläuft die Erkrankung in KIN 71R α Tieren viel schwächer, was vermuten lässt, dass IL-15 in der Abwesenheit von IL-15R α einen Effekt auf die Schwere der Erkrankung hat. Interessant wäre es hier einen dosisabhängigen Effekt von IL-15 in Tieren, die unterschiedliche Mengen an IL-15 produzieren, aber defizient für IL-15R α sind, zu untersuchen. Eine Begründung für den stärkeren Krankheitsverlauf in den IL-15R α Tieren könnte sein, dass in IL-15R α KO Tieren die Expression von IL-17 erhöht ist [292]. IL-17 ist darüber hinaus in der Lage IFN- γ zu produzieren, was zu einem erschwerten Verlauf der EAE führt [293].

5.6.3 IL-15/IL-15R α abhängige Präsenz der CD8⁺ T-Lymphozyten und NK-Zellen im Blut naiver und immunisierter Tiere

Die quantitative Analyse der CD8⁺ T-Zellen und NK-Zellen in der Milz naiver Tiere zeigt eine Abhängigkeit zu IL-15. In den naiven KIN 71 Tieren ist die Rekonstitution der CD8⁺ T- und NK-Zellen möglich und bestätigt die bereits publizierten Daten [255]. Die Entwicklung der CD8⁺ T-Zellen ist neben IL-15 auch stark abhängig von IL-15R α , was die Reduktion dieser Zellen in KIN 71R α Tieren zeigt. Der stimulierende Effekt von IL-15 auf CD8⁺ T-Zellen und NK Zellen wurde auch von anderen Gruppen analysiert [294-295]. Des Weiteren ist bekannt, dass durch die Transpräsentation von IL-15 die Entwicklung der NK-Zellen im Menschen in vitro stimuliert werden kann [296], was eine Erklärung der Reduktion der CD8⁺ T-Zellen in KIN 71R α darstellen könnte. Die CD4⁺ T-Lymphozyten und die B-Zellen werden von den unterschiedlichen Mengen des IL-15 in den IL-15 transgenen Stämmen oder dem defizienten IL-15R α nicht beeinflusst.

Die Immunisierung der Tiere hat zur Folge, dass die CD8⁺ T-Lymphozyten in den KIN 71 Tieren nicht mehr rekonstituiert werden können. Die NK-Zellen hingegen können in den KIN 71 Tieren auch noch nach der Immunisierung rekonstituiert werden. Durch die Immunisierung kommt es in den WT und den KIN 71R α Tieren zu einer signifikanten Erhöhung der NK-Zellen. Die Mengen der CD8⁺ und CD4⁺ T-Lymphozyten im Blut werden durch die Immunisierung der Tiere nicht signifikant beeinflusst. In den KIN 71R α Tieren sind die B-Zellen nach der Immunisierung signifikant reduziert. Da in IL-15R α und dKO Tieren keine ähnliche Beobachtung gemacht werden kann, ist hier von einem IL-15R α unabhängigen Effekt auszugehen. Bei der Erkrankung an RR-MS wird den NK-Zellen eine entscheidende Rolle zugesprochen [297,298]. Darüber hinaus ist bekannt, dass aktivierte NK-Zellen für die Zytolyse autologer Oligodendrozyten verantwortlich sind und unter anderem in inflammatorischen Läsionen gefunden werden können. Unterschiedliche Studien zeigen, dass im peripheren Blut von MS-Patienten die zytolytische Aktivität der NK-Zellen reduziert ist [299]. Shi et. al konnte zeigen, dass sich die Abwesenheit von NK-Zellen positiv auf den Verlauf der EAE auswirkt [300]. In anderen Studien wurde jedoch herausgefunden, dass die Depletion von NK-Zellen zu erschwerten Krankheitssymptomen führt [301]. In den hier dargestellten Daten konnte keine Übereinstimmung der IL-15/IL-15R α abhängigen Produktion der NK-Zellen im Blut und dem Krankheitsverlauf der Tiere festgestellt werden. Um einen krankheitsbedingten Effekt auf die NK-Zellen zu untersuchen, könnte die Messung des Blutes zu unterschiedlichen Zeitpunkten während der Erkrankung erfolgen. Beispielsweise könnte die Analyse des Blutes wenige Tage nach der Immunisierung, während des Peaks der Erkrankung und während der Erholungspause der Tiere erfolgen. Nach 50 Tagen ist die akute Erkrankung der Tiere bereits vorüber.

Ziel dieses Experiments war es herauszufinden, ob die Immunisierung der Tiere langfristige Veränderungen in den lymphoiden Zellen des Blutes zur Folge hat. Der Vergleich der lymphoiden Populationen im Blut vor und nach der Immunisierung zeigt, dass die Menge NK-Zellen in den WT und den KIN 71R α Tieren durch die Immunisierung dauerhaft signifikant erhöht ist. Zudem führt die Immunisierung der Tiere bei KIN 71R α zu einer längerfristigen signifikanten Reduktion der B-Zellen. In MS-Patienten hingegen konnte eine erhöhte Anzahl von B-Zellen im Blut festgestellt werden [302]. Andere Studien haben gezeigt, dass die Depletion von B-Zellen eine Verbesserung des Krankheitsverlaufs im Tiermodell (EAE) zur Folge hat [303].

5.6.4. Modulation der CD4⁺ T-Zellen, CD8⁺ T-Zellen sowie der NK-Zellen in der Milz durch IL-15/IL-15R α in naiven und immunisierten Tieren

Die Überexpression von IL-15 in naiven KIN 71 Tieren ermöglicht die Rekonstitution der CD8⁺ T-Lymphozyten in der Milz. Die Signifikanz dieses Effektes geht bei der Darstellung der absoluten Zellzahlen aufgrund der verstärkten Streuung der Ereignisse verloren. Ergänzend hierzu konnte bereits publiziert werden, dass in den KIN 71 Tieren die CD8⁺ T-Zellen in der Milz und ebenfalls in der Lunge rekonstituiert werden können [255]. Unter anderem unter Verwendung von IL-15KO und IL-15R α KO Tieren konnte bereits ein stimulierender Effekt von IL-15/IL-15R α für die Zellteilung und das Überleben der CD8⁺ T-Zellen beschrieben werden [304,305]. Die Präsenz der NK-Zellen zeigt eine stärkere Abhängigkeit zu IL-15 als die CD8⁺ T-Lymphozyten, da sich hier auch die NK-Population der WT-Tiere von der der IL-15KO Tiere unterscheidet. Der stimulierende Einfluss von IL-15 auf die Differenzierung der NK-Zellen konnte bereits von verschiedenen Laboren publiziert werden [306,307]. Es ist bekannt dass IL-15/IL-15R α keinen Effekt auf CD4⁺ T-Zellen hat [308]. In den hier gezeigten Daten wurde bei den KIN 71 Tieren allerdings eine Reduktion der CD4⁺ T-Zellen in der Milz festgestellt werden. Da NK-Zellen unter anderem für das abtöten von CD4⁺ T-Zellen verantwortlich sind [198,199] und diese, wie zuvor beschrieben, in den KIN 71 Tieren verstärkt exprimiert werden, könnte dies eine Begründung für die Reduktion der CD4⁺ T-Zellen sein. Die Rekonstitution der CD8⁺ T-Zellen wird von IL-15R α stärker beeinflusst als von IL-15, was sich daran zeigt, dass die Menge der CD8⁺ T-Lymphozyten in den KIN 71R α Tieren vergleichbar mit der in den IL-15KO Tieren ist. NK-Zellen zeigen ebenfalls eine Abhängigkeit zu IL-15R α , welche aber schwächer ausgeprägt ist als die der CD8⁺ T-Zellen. Die CD4⁺ T-Zellen der Milz werden von IL-15R α nicht beeinflusst. Durch den fehlenden IL-15R α sinkt der Anteil der NK-Zellen, was zur Folge haben könnte, dass weniger CD4⁺ T-Zellen zerstört werden. B-Zellen werden weder von IL-15 noch von IL-15R α beeinflusst, was durch die Forschungsergebnisse verschiedener Laborgruppen bestätigt wird [309].

In den immunisierten Tieren bleiben die für die naiven Tiere beschriebenen Effekte von IL-15/IL-15R α auf die CD4⁺, CD8⁺ T-Lymphozyten sowie die B- und die NK-Zellen bestehen. Durch die Immunisierung ist die Menge der CD8⁺ T-Zellen in der Milz der WT Tiere signifikant erhöht. Da dieser Effekt nur bei den WT-Tieren beobachtet werden kann und diese Tiere den schwächsten Krankheitsverlauf aufweisen, könnte dies auf eine regenerierende Rolle der CD8⁺ T-Zellen hindeuten. Um diese Vermutung bestätigen zu können, müssten weitere Zellanalysen zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Immunisierung durchgeführt werden. Bei den WT und den IL-15R α KO Tieren hat die Immunisierung eine signifikante Reduktion der NK-Zellen zur Folge. Bei dieser Reduktion der NK-Population besteht kein Zusammenhang mit dem Krankheitsverlauf der Tiere. Zudem sind in den IL-15R α Tieren nach der Immunisierung die B-Zellen signifikant reduziert. Da IL-15R α Tieren den

schwersten Krankheitsverlauf haben, könnte die krankheitsbedingte Reduktion der B-Zellen eine Erklärung hierfür sein. Es ist bekannt, dass regulatorische B-Zellen die Initiierung der EAE verhindern können [310]. Des Weiteren weiß man, dass das von den B-Zellen produzierte IL-10 die Entwicklung der Erkrankung an EAE negativ beeinflussen kann [311]. Patienten die an MS oder anderen autoimmunen Erkrankungen, erkrankt sind werden bereits erfolgreich durch die Depletion von B-Zellen (mit Rituximab) therapiert [312-315].

5.7. IL-15/-IL-15R α abhängige Zytokinproduktion der CD8⁺ T-Lymphozyten und der NK Zellen in der Milz

Das Zytokin IFN- γ hat antivirale, immunstimulierende Eigenschaften und wird von CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten und NK-Zellen als Reaktion auf Entzündungen sekretiert [316]. In den Milzen der naiven WT-Tiere unterscheidet sich die durch CD8⁺ T-Lymphozyten und NK-Zellen produzierte Menge an IFN- γ von der in den IL-15KO Tieren. Die IFN- γ Produktion dieser Zellen kann in den Milzen naiver KIN 71 Tiere durch die Überexpression von IL-15 rekonstituiert werden. In den IL-15R α defizienten Tieren (IL-15R α , KIN 71R α und dKO) ist die Menge der IFN- γ produzierenden CD8⁺ T-Lymphozyten und NK-Zellen vergleichbar mit der Menge dieser Zellen in den IL-15KO Tieren. Dies deutet darauf hin, dass die IFN- γ Produktion dieser Zellen stärker von IL-15R α als von IL-15 abhängig ist. In den naiven Tieren wird die IFN- γ Produktion der CD4⁺ T-Lymphozyten nicht von IL-15 oder IL-15R α beeinflusst.

In den immunisierten Tieren ist die IFN- γ Produktion in den CD4⁺, CD8⁺ und den NK-Zellen in den Milzen der KIN 71 Tieren erhöht, was auf einen stimulierenden Effekt von IL-15 auf diese Zellen hindeutet. Durch die Immunisierung kommt es in KIN 71 und KIN 71R α Tieren zu einer Erhöhung des durch CD8⁺ T-Lymphozyten produzierten IFN- γ . In den IL-15R α KO Tieren hingegen ist die IFN- γ Produktion durch CD8 T-Zellen reduziert. Durch die Immunisierung wird die Produktion von IFN- γ in den CD4⁺ T-Zellen in IL-15R α reduziert, in KIN 71 hingegen erhöht. Die Zytokinproduktion der NK-Zellen ist in WT, IL-15KO, KIN 64 und IL-15R α KO reduziert und in KIN 71Ra erhöht. Mäuse, die kein IFN- γ bilden oder bei denen der IFN- γ Signalweg gestört ist sind besonders empfänglich für die Erkrankung an EAE [317]. In den IL-15R α KO Tieren ist durch die Immunisierung die Produktion von IFN- γ reduziert, was somit eine Erklärung für die besonders starke Schwere der Erkrankung dieser Tiere wäre. Da nur die IFN- γ Produktion der NK-Zellen bei den IL-15KO Tieren reduziert ist, ist dies wiederum keine Erklärung für deren Krankheitsverlauf. Zudem leitet IFN- γ die Produktion von weiteren Zytokinen ein, die wichtig für die Bekämpfung der Entzündung sind [318]. Durch die Präsenz von IFN- γ wird die Produktion von Stickstoffoxiden und 2,3 Dioxygenaseindolaminen durch Makrophagen und Mikroglia aktiviert. Diese führen zur Inhibierung der T-Zell-Proliferation und unterstützen die Apoptose der T-Zellen, was zur Reduktion der Entzündungen in der EAE führt [319-320]. In für diese Arbeit durchgeführten Experimenten ist für die IL-15 transgenen Stämme sowie KIN 71Ra und dKO kein direkter Zusammenhang zwischen der IFN- γ Produktion und der Schwere der Erkrankung erkennbar. In diesen Experimenten wurde die IFN- γ Produktion der Zellen erst 50 Tage nach der Immunisierung gemessen. Ziel hiervon war es zu analysieren, ob die Immunisierung der Tiere eine dauerhafte Änderung der IFN- γ Produktion durch CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten sowie NK-Zellen hat. Um eine exaktere Korrelation der IFN- γ Produktion zu dem Krankheitsverlauf zu erhalten, müsste die Analyse der IFN- γ Produktion der Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten vollzogen werden. Da das Zytokin IL-17 ebenfalls eine

entscheidende Rolle bei der Entwicklung und dem Verlauf der EAE hat [321-322] könnte dies zusätzlich zu IFN- γ auf den Effekt von IL-15/IL-15R α untersucht werden.

5.8. T-Lymphozyten und NK-Zellen im Gehirn werden von IL-15/IL-15R α beeinflusst

Die Überexpression von IL-15 in KIN 71 hat auch in dem Gehirn der naiven Tiere einen stimulierenden Effekt auf die gesamte Lymphozyten Population (CD45^{high}) und die NK-Zellen. Dieser positive Effekt von IL-15 auf die lymphoiden Zellen im Gehirn wird durch bereits publizierte Daten, unter anderem in IL-15KO Mäusen, bestätigt [323]. Auch in KIN 71R α ist die Menge der NK-Zellen erhöht, was für einen IL-15R α unabhängigen Effekt spricht. Bei den NK-Zellen im Gehirn ist der Einfluss von der Überexpression von IL-15 größer als der von IL-15R α . Dies zeigt sich darin, dass KIN 71 und KIN 71R α quantitative vergleichbare NK-Populationen haben. Die CD3⁺ T-Lymphozyten sind im Gehirn der KIN 71 Tiere reduziert. Grund hierfür könnte der bereits für die im Blut analysierten Daten beschriebene Effekt sein, dass NK-Zellen CD4⁺T-Lymphozyten aktiv abtöten. Bei einer erhöhten Menge an NK-Zellen kann dies somit zu einer Reduktion der CD4⁺ oder CD3⁺T-Lymphozyten führen. Es ist jedoch bekannt, dass IL-15 im Gehirn zur verstärkten Bildung von CD8⁺ T-Zellen führt[324]. Da die gemessenen Werte der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen im Gehirn nach der verwendeten Aufarbeitungsmethode nahe des Detektionslimits waren, war eine quantitative Analyse dieser Zellen nicht möglich. Da T-Lymphozyten eine wichtige Rolle bei der adaptiven Immunantwort haben, erfolgte die Analyse dieser Populationen gemeinsam. Jedoch besteht bei der Festlegung der T-Lymphozyten anhand von CD3⁺ Zellen die Gefahr, dass nicht nur CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen, sondern unter anderem auch CD3⁺ $\gamma\delta$ T-Zellen gemessen werden, was eine Begründung für die Reduktion der T-Zellen in den Gehirnen der KIN 71 Mäuse sein könnte. In den IL-15R α defizienten Tieren geht der Effekt der Überexpression von IL-15 (KIN 71R α) auf die Lymphozyten komplett verloren, was darauf schließen lässt, dass die Lymphozyten im Gehirn stärker von IL-15R α als von IL-15 abhängig sind. In den dKO Tieren ist die Menge der CD3⁺ T-Lymphozyten erhöht. B-Zellen werden von IL-15/IL-15R α nicht beeinflusst, was durch die Untersuchungen anderer Gruppen bestätigt werden kann [325].

In den immunisierten Tieren ist jeweils die gesamte Population der Lymphozyten (CD45^{high}) in den KIN 71 und den KIN 71R α Tieren erhöht was für einen Effekt spricht, der von IL-15, aber nicht von IL-15R α abhängig ist. Durch die Immunisierung kommt es in den Gehirnen der KIN 71 und IL-15R α KO Tiere zu einer Erhöhung der NK-Zellen. Die CD3⁺ T-Lymphozyten und die B-Zellen werden quantitativ durch die Immunisierung nicht beeinflusst. Der erhöhte Anteil der kompletten Lymphozyten Population ist wahrscheinlich auf die Erhöhung der NK-Zellen zurückzuführen. Diese spielen bei der EAE auch im Gehirn eine entscheidende Rolle. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass die Depletion von NK-Zellen zu einem stärkeren Krankheitsverlauf führt [326]. Des Weiteren ist bekannt, dass NK-Zellen im Gehirn für die Regulation der Aktivität der CD3⁺ T-Lymphozyten verantwortlich sind [327].

5.9. Mikroglia entwickelt sich unabhängig von dem Zytokin IL-15 und seinem Rezeptor α

In den unter den angegebenen Settings durchgeführten Experimenten ist kein Einfluss von IL-15 oder IL-15R α auf die Mikroglia-Population in dem Gehirn der naiven Tiere erkennbar. Auch in den immunisierten Tieren zeigt sich kein IL-15/IL-15R α abhängiger Einfluss auf diese Population. Durch die Immunisierung kommt es jedoch in den KIN 71 und den IL-15R α KO Tieren zu einem Anstieg der Mikroglia. Ob Mikroglia den Verlauf der EAE und der MS positiv oder negativ beeinflussen ist nicht geklärt. Einerseits konnte von Heppner et al [328] gezeigt werden, dass die Unterdrückung der Aktivität

der Mikroglia zu einer Verbesserung der Krankheitssymptome und zu der Reduktion der Entzündungen im Gehirn bei an EAE erkrankten Mäusen führt. Andererseits ist bekannt, dass Mikroglia eine entscheidende Rolle bei der Reparatur beschädigter Neurone hat [329-330]. In den hier durchgeführten Experimenten ist kein Einfluss von den Mikroglia auf den Krankheitsverlauf der EAE zu erkennen.

Abschließend zu der Analyse der lymphoiden Zellen in verschiedenen Organen kann man sagen, dass IL-15 und IL-15R α bereits in naiven Mäusen zu unterschiedlichen Populationen der für die Regulation der Immunantwort essentiellen CD8⁺ T-Lymphozyten und NK-Zellen in Blut und Milz führen. Auch im Gehirn der naiven Tiere führen die Modulation von IL-15 und die Präsenz von IL-15R α zu Veränderungen in der NK-Zell-Population und in der T-Zell-Population.

6. Literaturverzeichnis:

1. Janeway C. A., Walport M., Shlomchik M. Immunobiology. 8th Edition, Garland Science (2012).
2. Goldsby A. R., Kindt T. J., Osborne B. A., Kuby J. Immunology 6th Edition. W.H. Freeman and Company (2006).
3. Busse W. W., Lemanske R. F. Asthma. *New England Journal of Medicine*, 344, 350–362 (2001).
4. Kariyawasam H. H., Robinson D. S. The role of eosinophils in airway tissue remodelling in asthma. *Current Opinion in Immunology*, 19, 681–686 (2007).
5. Nakagome K., Matsushita S., Nagata M. Neutrophilic Inflammation in Severe Asthma. *International Archives of Allergy and Immunology* 158, 96–102 (2012).
6. Alcorn J. F., Crowe C. R., Kolls J. K. TH17 Cells in Asthma and COPD. *Annual Review of Physiology* 72, 495–516 (2010).
7. Jones J., Dangl J. The Plant Immune System. *Nature* 444, 323-329 (2006).
8. Wright S. D., Ramos R. A., Tobias P. S., Ulevitch R. J., Mathison J. C. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science*, 249, 1431-1433 (1990).
9. Wright S. D., CD14 and innate recognition of bacteria. *J. Immunol.*, 155, 6-8 (1955).
10. Stahl P. D. The mannose receptor and other macrophage lectins. *Curr. Opin. Immunol.*, 4, 49-52 (1992).
10. Medzhitov R., Janeway C. A. Jr. Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Curr. Opin. Immunol.*, 9, 4-9 (1997).
11. Bogdan C., Rollingshoff M., Diefenbach A. Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity. *Curr. Opin. Immunol.*, 12, 64-76 (2000).
12. Kaisho T., Akira S. Toll-like receptor function and signaling. *J. Allergy. Clin. Immunol.* 117, 979-987, (2006).
13. Robbins S. L., Cotran R. S. Inflammation and repair. *Pathologic basis of disease*. 2nd ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 59-63. (1979).
14. Carroll M. C. The role of complement and complement receptors in induction and regulation of immunity. *Annu. Rev. Immunol.*, 16, 545-68. (1998).
15. Gewurz H., Zhang X. H., Lint T. F. Structure and function of the pentraxins. *Curr. Opin. Immunol.*, 7, 54-64 (1995).
16. Sastry K., Ezekowitz R. A. Collectins: pattern recognition molecules involved in first line host defense. *Curr. Opin. Immunol.*, 5, 566 (1993).
17. Shimizu Y., Newman W., Tanaka Y., Shaw S. Lymphocyte interactions with endothelial cells. *Immunol. Today*, 13, 106-12. (1992).
18. Issekutz T. B. Effects of six different cytokines on lymphocyte adherence to microvascular endothelium and in vivo lymphocyte migration in the rat. *J. Immunol.*, 144, 2140-2146. (1990).
19. Springer T. A. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell*, 76, 301-14. (1994).
20. Biron C. A., Nguyen K. B., Pien G. C., Cousens L. P., Salazar-Mather T. P. Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines. *Annu. Rev. Immunol.*, 17, 189-220 (1999).
21. Bancherau J., Steinman R. M. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*, 392, 245-252 (1998).
22. Schaub B., Lauener R., von Mutius E. The many faces of the hygiene hypothesis. *J. Allergy. Clin. Immunol.*, 117, 969–977 (2006).
23. Iwamoto I., Nakajima H., Endo H., Yoshida S. Interferon gamma regulates antigen-induced eosinophil recruitment into the mouse airways by inhibiting the infiltration of CD4⁺ T cells. *J. Exp. Med.*, 177, 573–576 (1993).
24. Iwasaki A., Medzhitov R. Control of adaptive immunity by the innate immune system. *Nature immunology*, 16, 343-353 (2015).
25. Steinman R. M. DC-Sign: a guide to some mysteries of dendritic cells. *Cell*, 100, 491-494(2000).
26. Steinman R. M. The DC cell system and its role in immunogenicity. *Annu. Rev. Immunol.*, 9, 271-296 (1991).
27. Hart D. N. Dendritic cells: unique leukocyte populations which control the primary immune response. *Blood*, 90, 3245-3287 (1997).
28. Matzinger P. Tolerance, danger, and the extended family. *Annu. Rev. Immunol.*, 12, 991-1045 (1994).
29. Poltorak M. P., Schraml B. U. Fate Mapping of Dendritic Cells. *Front. Immunol.*, 6, 199 (2015).

30. Wu L., D'Amico A., Hochrein H., O'Keeffe M., Shortman K., Lucas K. Development of thymic and splenic dendritic cell populations from different hemopoietic precursors. *Blood.*, 98, 3376-3382 (2001).
31. Vortrag Patrick Fischer, Universität von Kalifornien, San Francisco (Mai 2016)
32. Anjuère F., Martín P., Ferrero I., Fraga M. L., del Hoyo G. M., Wright N., Ardavin C. Definition of dendritic cell subpopulations present in the spleen, Peyer's patches, lymph nodes, and skin of the mouse. *Blood.*, 93, 590-598 (1999).
33. Shortman K., Liu Y. Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nature Reviews Immunology*, 2, 151-161 (2002).
34. Iwasaki A., Kelsall B. L. Localization of distinct Peyer's patch dendritic cell subsets and their recruitment by chemokines macrophage inflammatory protein (MIP)-3alpha, MIP-3beta, and secondary lymphoid organ chemokine. *J. Exp. Med.*, 191, 1381-1394 (2000).
35. Reis e Sousa C., Hieny S., Scharton-Kersten T., Jankovic D., Charest H., Germain R. N., Sher A. In vivo microbial stimulation induces rapid CD40 ligand-independent production of interleukin 12 by dendritic cells and their redistribution to T cell areas. *J. Exp. Med.*, 186, 1819-1829 (1997).
36. De Smedt T., Pajak B., Muraille E., Lespagnard L., Heinen E., De Baetselier P., Urbain J., Leo O., Moser M. Regulation of dendritic cell numbers and maturation by lipopolysaccharide in vivo. *J. Exp. Med.*, 184, 1413-1424 (1996).
38. Hume D. A. Macrophages as APC and the dendritic cell myth. *J. Immunol.*, 181, 5829-5835 (2008).
39. Huleatt J. W., Lefrançois L. Antigen-driven induction of CD11c on intestinal intraepithelial lymphocytes and CD8⁺ T cells in vivo. *J. Immunol.*, 154, 5684-5693 (1995).
40. Serbina N. V., Salazar-Mather T. P., Biron C. A., Kuziel W. A., Pamer E. G. TNF/iNOS-producing dendritic cells mediate innate immune defense against bacterial infection. *Immunity*, 19, 59-70 (2003).
41. Merad M., Sathe P., Helft J., Miller J., Mortha A. The dendritic cell lineage: ontogeny and function of dendritic cells and their subsets in the steady state and the inflamed setting. *Annu. Rev. Immunol.*, 31, 563-604 (2013).
42. Schaberg T., Klein U., Rau M., Eller J., Lode H. Subpopulations of alveolar macrophages in smokers and nonsmokers: relation to the expression of CD11/CD18 molecules and superoxide anion production. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.*, 151, 1551-1558 (1995).
43. Gordon E. J., Gale N. W., Harvey N. L. Expression of the hyaluronan receptor LYVE-1 is not restricted to the lymphatic vasculature; LYVE-1 is also expressed on embryonic blood vessels. *J. Exp. Med.*, 237, 1901-1909 (2008).
44. van Blijswijk J., Schraml B. U., Reis e Sousa C. Advantages and limitations of mouse models to deplete dendritic cells. *Eur. J. Immunol.*, 43, 22-26 (2013).
45. Patterson S. Flexibility and cooperation among dendritic cells. *Nat. Immunol.*, 1, 273-274 (2000).
46. Lipscomb M. F., Masten B. J. Dendritic cells: immune regulators in health and disease. *Physiol. Rev.*, 82, 97-130 (2002).
47. Pamer E., Cresswell P. Mechanisms of MHC class I-restricted antigen processing. *Annu. Rev. Immunol.*, 16, 323-358 (1998).
48. Rescigno M., Granucci F., Ricciardi-Castagnoli P. Dendritic cells at the end of the millennium. *Immunol. Cell. Biol.*, 77, 404-410 (1999).
49. Berkers C. R., de Jong A., Schurman K. G., Linnemann C., Meiring H. D., Janssen L., Neefjes J. J., Schumacher T. N., Rodenko B., Ovaas H. Definition of Proteasomal Peptide Splicing Rules for High-Efficiency Spliced Peptide Presentation by MHC Class I Molecules. *J. Immunol.*, 195, 4085-4095 (2015).
50. Kropshofer H., Vogt A. B. *Antigen Presenting Cells: From Mechanisms to Drug Development*. 1. Auflage, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA (2005).
51. Ackerman A. L., Cresswell P. Cellular mechanisms governing cross-presentation of exogenous antigens. *Nat. Immunol.*, 5, 678-684 (2004).
52. Castellino F., Germain R. N. Extensive trafficking of MHC class II-invariant chain complexes in the endocytic pathway and appearance of peptide-loaded class II in multiple compartments. *Immunity*, 2, 73-88 (1995).
53. Turley S. J., Inaba K., Garrett W. S., Ebersold M., Untermaehrer J., Steinman R. M., Mellman I. Transport of peptide-MHC class II complexes in developing dendritic cells. *Science*, 288, 522-527 (2000).
54. Schwartz R. H. Immunology. It takes more than two to tango. *Nature*, 409, 31-32 (2001).
55. Coyle A. J., Gutierrez-Ramos J. C. The expanding B7 superfamily: increasing complexity in costimulatory signals regulating T cell function. *Nat. Immunol.*, 2, 203-209 (2001).

56. Walunas T. L., Lenschow D. J., Bakker C. Y., Linsley P. S., Freeman G. J., Green J. M., Thompson C. B., Bluestone J. A. CTLA-4 can function as a negative regulator of T cell activation. *Immunity*, 1, 405-413 (1994).
57. Swallow M. M., Wallin J.J., Sha W. C. B7h, a novel costimulatory homolog of B7.1 and B7.2, is induced by TNFalpha. *Immunity*, 11, 423-432 (1999).
58. Jacob J., Baltimore D. Modelling T-cell memory by genetic marking of memory T cells in vivo. *Nature*, 399, 593-597 (1999).
59. Yoshinaga S. K., Whoriskey J. S., Khare S. D., Sarmiento U., Guo J., Horan T., Shih G., Zhang M., Coccia M. A., Kohno T., Tafuri-Bladt A., Brankow D., Campbell P., Chang D., Chiu L., Dai T., Duncan G., Elliott G. S., Hui A., McCabe S. M., Scully S., Shahinian A., Shaklee C. L., Van G., Mak T. W., Senaldi G. T-cell co-stimulation through B7RP-1 and ICOS. *Nature*, 402, 827-832 (1999).
60. Hutloff A., Dittrich A. M., Beier K. C., Eljaschewitsch B., Kraft R., Anagnostopoulos I., Kroczeck R. A. ICOS is an inducible T-cell co-stimulator structurally and functionally related to CD28. *Nature*, 397, 263-266 (1999).
61. Dong C., Juedes A. E., Temann U. A., Shresta S., Allison J. P., Ruddle N. H., Flavell R. A. ICOS co-stimulatory receptor is essential for T-cell activation and function. *Nature*, 409, 97-101 (2001).
62. Coyle A. J., Gutierrez-Ramos J.C. The expanding B7 superfamily: increasing complexity in costimulatory signals regulating T cell function. *Nat. Immunol.*, 2, 203-209 (2001).
63. Fehniger T. A., Caligiuri M. A. Interleukin 15: biology and relevance to human disease. *Blood*, 97, 14-32 (2001).
64. Waldmann T. A. The biology of interleukin-2 and interleukin-15: implications for cancer therapy and vaccine design. *Nat. Rev. Immunol.*, 6, 595-601 (2006).
65. Budagian V., Bulanova E., Paus R., Bulfone-Paus S. IL-15/IL-15 receptor biology: a guided tour through an expanding universe. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 17, 259-280 (2006).
66. Burton J. D., Bamford R. N., Peters C., Grant A. J., Kurys G., Goldman C.K., Brennan J., Roessler E., Waldmann T. A. A lymphokine, provisionally designated interleukin and produced by a human adult T-cell leukemia line, stimulates T-cell proliferation and the induction of lymphokine-activated killer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 91, 4935-4939 (1994).
67. Grabstein K. H., Eisenman J., Shanebeck K., Rauch C., Srinivasan S., Fung V., Beers C., Richardson J., Schoenborn M. A., Ahdieh M., et al. Cloning of a T cell growth factor that interacts with the beta chain of the interleukin-2 receptor. *Science*, 264, 965-968 (1994).
68. Anderson D. M., Johnson L., Glaccum M. B., Copeland N. G., Gilbert D. J., Jenkins N. A., Valentine V., Kirstein M. N., Shapiro D. N., Morris S. W., et al. Chromosomal assignment and genomic structure of IL15. *Genomics*, 25, 701-706 (1995).
69. Krause H., Jandrig B., Wernicke C., Bulfone-Paus S., Pohl T., Diamantstein T. Genomic structure and chromosomal localization of the human interleukin 15 gene (IL-15). *Cytokine*, 8, 667-674 (1996).
70. Pettit D. K., Bonnert T. P., Eisenman J., Srinivasan S., Paxton R., Beers C., Lynch D., Miller B., Yost J., Grabstein K. H., Gombotz W. R. Structure-function studies of interleukin 15 using site-specific mutagenesis, polyethylene glycol conjugation, and homology modeling. *J. Biol. Chem.*, 272, 2312-2318 (1997).
71. Bamford R. N., Battiata A. P., Burton J. D., Sharma H., Waldmann T. A. Interleukin (IL) 15/IL-T production by the adult T-cell leukemia cell line HuT-102 is associated with a human T-cell lymphotropic virus type I region/IL-15 fusion message that lacks many upstream AUGs that normally attenuates IL-15 mRNA translation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 93, 2897-2902 (1996).
72. Bamford R. N., DeFilippis A. P., Azimi N., Kurys G., Waldmann T. A. The 5' untranslated region, signal peptide, and the coding sequence of the carboxyl terminus of IL-15 participate in its multifaceted translational control. *J. Immunol.*, 160, 4418-4426 (1998).
74. Onu A., Pohl T., Krause H., Bulfone-Paus S. Regulation of IL-15 secretion via the leader peptide of two IL-15 isoforms. *J. Immunol.*, 158, 255-262 (1997).
75. Grabstein K. H., Eisenman J., Shanebeck K., Rauch C., Srinivasan S., Fung V., Beers C., Richardson J., Schoenborn M. A., Ahdieh M., et al. Cloning of a T cell growth factor that interacts with the beta chain of the interleukin-2 receptor. *Science*, 264, 965-968 (1994).
76. Tagaya Y., Kurys G., Thies T. A., Losi J. M., Azimi N., Hanover J. A., Bamford R. N., Waldmann T. A. Generation of secretable and nonsecretable interleukin 15 isoforms through alternate usage of signal peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 94, 14444-14449 (1997).

77. Meazza R., Verdiani S., Biassoni R., Coppolecchia M., Gaggero A., Orengo A. M., Colombo M. P., Azzarone B., Ferrini S. Identification of a novel interleukin-15 (IL-15) transcript isoform generated by alternative splicing in human small cell lung cancer cell lines. *Oncogene*, 12, 2187-2192 (1996).
78. Duitman E. H., Orinska Z., Bulanova E., Paus R., Bulfone-Paus S. How a cytokine is chaperoned through the secretory pathway by complexing with its own receptor: lessons from interleukin-15 (IL-15)/IL-15 receptor alpha. *Mol. Cell. Biol.*, 28, 4851-4861 (2008).
79. Giri J. G., Ahdieh M., Eisenman J., Shanebeck K., Grabstein K., Kumaki S., Namen A., Park L. S., Cosman D., Anderson D. Utilization of the beta and gamma chains of the IL-2 receptor by the novel cytokine IL-15. *EMBO J.*, 13, 2822-2830 (1994).
80. Carson W. E., Giri J. G., Lindemann M. J., Linett M. L., Ahdieh M., Paxton R., Anderson D., Eisenmann J., Grabstein K., Caligiuri M. A. Interleukin (IL) 15 is a novel cytokine that activates human natural killer cells via components of the IL-2 receptor. *J. Exp. Med.*, 180, 1395-1403 (1994).
81. Musso T., Calosso L., Zucca M., Millesimo M., Ravarino D., Giovarelli M., Malavasi F., Ponzi A. N., Paus R., Bulfone-Paus S. Human monocytes constitutively express membrane-bound, biologically active, and interferon-gamma-upregulated interleukin-15. *Blood*, 93, 3531-3539 (1999).
82. Bulfone-Paus S., Bulanova E., Budagian V., Paus R. The interleukin-15/interleukin-15 receptor system as a model for juxtacrine and reverse signaling. *Bioessays*, 28, 362-377 (2006).
83. Bernard J., Harb C., Mortier E., Quéméner A., Meloen R. H., Vermot-Desroches C., Wijdeness J., van Dijken P., Grötzinger J., Sloodstra J. W., Plet A., Jacques Y. Identification of an interleukin-15alpha receptor-binding site on human interleukin-15. *J. Biol. Chem.*, 279, 24313-24322 (2004).
84. Olsen S. K., Ota N., Kishishita S., Kukimoto-Niino M., Murayama K., Uchiyama H., Toyama M., Terada T., Shirouzu M., Kanagawa O., Yokoyama S. Crystal Structure of the interleukin-15.interleukin-15 receptor alpha complex: insights into trans and cis presentation. *J. Biol. Chem.*, 282, 37191-37204 (2007).
85. Nishimura H., Fujimoto A., Tamura N., Yajima T., Wajjwalku W., Yoshikai Y. A novel autoregulatory mechanism for transcriptional activation of the IL-15 gene by a nonsecretable isoform of IL-15 generated by alternative splicing. *FASEB J.*, 19, 19-28 (2005).
86. Waldmann T. A. The biology of IL-15: implications for cancer therapy and the treatment of autoimmune disorders. *J. Invest. Dermatol. Symp. Proc.*, 16, 28-30 (2013).
87. Stonier S. W., Ma L. J., Castillo E. F., Schluns K. S. Dendritic cells drive memory CD8 T-cell homeostasis via IL-15 transpresentation. *Blood*, 112, 4546-4554 (2008).
88. Giri J. G., Kumaki S., Ahdieh M., Friend D. J., Loomis A., Shanebeck K., DuBose R., Cosman D., Park L. S., Anderson D. M. Identification and cloning of a novel IL-15 binding protein that is structurally related to the alpha chain of the IL-2 receptor. *EMBO J.*, 14, 3654-3663 (1995).
89. Stonier S. W., Schluns K. S. Trans-presentation: a novel mechanism regulating IL-15 delivery and responses. *Immunol. Lett.*, 127, 85-92 (2010).
90. Nishimura H., Yajima T., Naiki Y., Tsunobuchi H., Umemura M., Itano K., Matsuguchi T., Suzuki M., Ohashi P. S., Yoshikai Y. Differential roles of interleukin 15 mRNA isoforms generated by alternative splicing in immune responses in vivo. *J. Exp. Med.*, 191, 157-170 (2000).
91. Anderson D. M., Kumaki S., Ahdieh M., Bertles J., Tometsko M., Loomis A., Giri J., Copeland N. G., Gilbert D. J., Jenkins N. A., et al. Functional characterization of the human interleukin-15 receptor alpha chain and close linkage of IL15RA and IL2RA genes. *J. Biol. Chem.*, 270, 29862-29869 (1995).
92. Dubois S., Magrangeas F., Lehours P., Raheer S., Bernard J., Boisteau O., Leroy S., Minvielle S., Godard A., Jacques Y. Natural splicing of exon 2 of human interleukin-15 receptor alpha-chain mRNA results in a shortened form with a distinct pattern of expression. *J. Biol. Chem.*, 274, 26978-26984 (1999).
93. Bulanova E., Budagian V., Duitman E., Orinska Z., Krause H., Rückert R., Reiling N., Bulfone-Paus S. Soluble Interleukin IL-15Ralpha is generated by alternative splicing or proteolytic cleavage and forms functional complexes with IL-15. *J. Biol. Chem.*, 282, 13167-13179 (2007).
94. Bazan J. F. Haemopoietic receptors and helical cytokines. *Immunol. Today*, 11, 350-354 (1990).
95. Bazan J. F. Structural design and molecular evolution of a cytokine receptor superfamily. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 87, 6934-6938 (1990).
96. Budagian V., Bulanova E., Paus R., Bulfone-Paus S. IL-15/IL-15 receptor biology: a guided tour through an expanding universe. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 17, 259-280 (2006).

97. Fehniger T. A., Caligiuri M. A. Interleukin 15: biology and relevance to human disease *Blood*, 97, 14-32 (2001).
98. Taniguchi T., Miyazaki T., Minami Y., Kawahara A., Fujii H., Nakagawa Y., Hatakeyama M., Liu Z. J. IL-2 signaling involves recruitment and activation of multiple protein tyrosine kinases by the IL-2 receptor. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 766, 235-244 (1995).
99. Ihle J. N., Witthuhn B. A., Quelle F. W., Yamamoto K., Silvennoinen O. Signaling through the hematopoietic cytokine receptors. *Annu. Rev. Immunol.*, 13, 369-398 (1995).
100. Mody C. H., Spurrell J. C., Wood C. J. Interleukin-15 induces antimicrobial activity after release by *Cryptococcus neoformans*-stimulated monocytes. *J. Infect. Dis.*, 178, 803-814 (1998).
101. Zhang X., Sun S., Hwang I., Tough D. F., Sprent J. Potent and selective stimulation of memory-phenotype CD8⁺ T cells in vivo by IL-15. *Immunity*, 8, 591-599 (1998).
102. Kanegane H., Tosato G. Activation of naive and memory T cells by interleukin-15. *Blood*, 88, 230-235 (1996).
103. Lodolce J. P., Boone D. L., Chai S., Swain R. E., Dassopoulos T., Trettin S., Ma A. IL-15 receptor maintains lymphoid homeostasis by supporting lymphocyte homing and proliferation. *Immunity*, 9, 669-676 (1998).
104. Perera L. P. Interleukin 15: its role in inflammation and immunity. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.)*, 48, 457-464 (2000).
105. Miyazaki T., Kawahara A., Fujii H., Nakagawa Y., Minami Y., Liu Z. J., Oishi I., Silvennoinen O., Witthuhn B. A., Ihle J. N., et al. Functional activation of Jak1 and Jak3 by selective association with IL-2 receptor subunits. *Science*, Vol. 266, Issue 5187, 1045-1047 (1994).
106. Lin J. X., Migone T. S., Tsang M., Friedmann M., Weatherbee J. A., Zhou L., Yamauchi A., Bloom E. T., Mietz J., John S., et al. The role of shared receptor motifs and common Stat proteins in the generation of cytokine pleiotropy and redundancy by IL-2, IL-4, IL-7, IL-13, and IL-15. *Immunity*, 2, 331-339 (1995).
107. Chen Q., Carroll H. P., Gadina M. The newest interleukins: recent additions to the ever-growing cytokine family. *Vitam. Horm.*, 74, 207-228 (2006).
108. Waldmann T. A. The biology of interleukin-2 and interleukin-15: implications for cancer therapy and vaccine design. *Nat. Rev. Immunol.*, 6, 595-601 (2006).
109. Bergamaschi C., Bear J., Rosati M., Beach R. K., Alicea C., Sowder R., Chertova E., Rosenberg S. A., Felber B. K., Pavlakis G. N. Circulating IL-15 exists as heterodimeric complex with soluble IL-15R α in human and mouse serum. *Blood*, 120 (2012).
110. Mortier E., Woo T., Advincula R., Gozalo S., Ma A. IL-15R α chaperones IL-15 to stable dendritic cell membrane complexes that activate NK cells via trans presentation. *J. Exp. Med.*, 205, 1213-1225 (2008).
111. Ota N., Takase M., Uchiyama H., Olsen S. K., Kanagawa O. No requirement of trans-presentations of IL-15 for human CD8 T cell proliferation. *J. Immunol.*, 185, 6041-6048 (2010).
112. Bamford R. N., Grant A. J., Burton J. D., Peters C., Kurys G., Goldman C. K., Brennan J., Roessler E., Waldmann T. A. The interleukin (IL) 2 receptor beta chain is shared by IL-2 and a cytokine, provisionally designated IL-T, that stimulates T-cell proliferation and the induction of lymphokine-activated killer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 91, 4940-4944 (1994).
113. Budagian V., Bulanova E., Orinska Z., Pohl T., Borden E. C., Silverman R., Bulfone-Paus S. Reverse signaling through membrane-bound interleukin-15. *J. Biol. Chem.*, 279, 42192-42201 (2004).
114. Budagian V., Bulanova E., Orinska Z., Thon L., Mamat U., Bellosta P., Basilico C., Adam D., Paus R., Bulfone-Paus S. A promiscuous liaison between IL-15 receptor and Axl receptor tyrosine kinase in cell death control. *EMBO J.*, 24, 4260-4270. (2005).
115. Bulanova E., Budagian V., Pohl T., Krause H., Dürkop H., Paus R., Bulfone-Paus S. The IL-15R alpha chain signals through association with Syk in human B cells. *J. Immunol.*, 167, 6292-6302 (2001).
116. Stonier S. W., Schluns K. S. Trans-presentation: a novel mechanism regulating IL-15 delivery and responses. *Immunol. Lett.*, 127, 85-92 (2010).
117. Bergamaschi C., Rosati M., Jalah R., Valentin A., Kulkarni V., Alicea C., Zhang G. M., Patel V., Felber B. K., Pavlakis G. N. Intracellular interaction of interleukin-15 with its receptor alpha during production leads to mutual stabilization and increased bioactivity. *J. Biol. Chem.*, 283, 4189-4199 (2008).
118. Duitman E. H., Orinska Z., Bulanova E., Paus R., Bulfone-Paus S. How a cytokine is chaperoned through the secretory pathway by complexing with its own receptor: lessons from interleukin-15 (IL-15)/IL-15 receptor alpha. *Mol. Cell. Biol.*, 28, 4851-4861 (2008).

119. Perera P. Y., Lichy J. H., Waldmann T. A., Perera L.P. The role of interleukin-15 in inflammation and immune responses to infection: implications for its therapeutic use. *Microbes Infect.*, 14, 247-261 (2012)
120. Yona S., Jung S. Monocytes: subsets, origins, fates and functions. *Curr. Opin. Hematol.* 17, 53-59 (2010).
121. Regamey N., Obregon C., Ferrari-Lacraz S., van Leer C., Chanson M., Nicod L. P., Geiser T. Airway epithelial IL-15 transforms monocytes into dendritic cells. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.*, 37, 75-84 (2007).
122. Mattei F., Schiavoni G., Belardelli F., Tough D. F. IL-15 is expressed by dendritic cells in response to type I IFN, double-stranded RNA, or lipopolysaccharide and promotes dendritic cell activation. *J. Immunol.*, 167, 1179-1187 (2001).
123. Kovanen P. E., Leonard W. J. Cytokines and immunodeficiency diseases: critical roles of the gamma(c)-dependent cytokines interleukins 2, 4, 7, 9, 15, and 21, and their signaling pathways. *Immunol. Rev.*, 202, 67-83 (2004).
124. Ladolce J. P., Boone D. L., Chai S., Swain R. E., Dassopoulos T., Trettin S., Ma A. IL-15 receptor maintains lymphoid homeostasis by supporting lymphocyte homing and proliferation. *Immunity*, 9, 669-676 (1998).
125. Kennedy M. K., Glaccum M., Brown S. N., Butz E. A., Viney J. L., Embers M., Matsuki N., Charrier K., Sedger L., Willis C. R., Brasel K., Morrissey P. J., Stocking K., Schuh J. C., Joyce S., Peschon J. J. Reversible defects in natural killer and memory CD8 T cell lineages in interleukin 15-deficient mice. *J. Exp. Med.*, 191, 771-780 (2000).
126. Lutz M. B., Kukutsch N., Ogilvie A. L., Rössner S., Koch F., Romani N., Schuler G. An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. *J. Immunol. Methods.* 223, 77-92 (1999).
127. Bulfone-Paus S., Ungureanu D., Pohl T., Lindner G., Paus R., Rückert R., Krause H., Kunzendorf U. Interleukin-15 protects from lethal apoptosis in vivo. *Nat. Med.*, 3, 1124-1128 (1997).
128. Masuda A., Matsuguchi T., Yamaki K., Hayakawa T., Yoshikai Y. Interleukin-15 prevents mouse mast cell apoptosis through STAT6-mediated Bcl-xL expression. *J. Biol. Chem.*, 276, 26107-26113 (2001).
129. Rochman Y., Spolski R., Leonard W. J. New insights into the regulation of T cells by gamma(c) family cytokines. *Nat. Rev. Immunol.*, 9, 480-490 (2009).
130. Bodnár A., Nizsalóczi E., Mocsár G., Szalóki N., Waldmann T. A., Damjanovich S., Vámosi G. A biophysical approach to IL-2 and IL-15 receptor function: localization, conformation and interactions. *Immunol. Lett.*, 116, 117-125 (2008).
131. Allen M. P., Nilsen-Hamilton M. Granzymes D, E, F, and G are regulated through pregnancy and by IL-2 and IL-15 in granulated metrial gland cells. *J. Immunol.*, 161, 2772-2779 (1998).
132. Ye W., Young J. D., Liu C. C. Interleukin-15 induces the expression of mRNAs of cytolytic mediators and augments cytotoxic activities in primary murine lymphocytes. *Cell. Immunol.*, 174, 54-62 (1996).
133. Kennedy M. K., Glaccum M., Brown S. N., Butz E. A., Viney J. L., Embers M., Matsuki N., Charrier K., Sedger L., Willis C. R., Brasel K., Morrissey P. J., Stocking K., Schuh J. C., Joyce S., Peschon J. J. Reversible defects in natural killer and memory CD8 T cell lineages in interleukin 15-deficient mice. *J. Exp. Med.*, 191, 771-780 (2000).
134. Ashkar A. A., Reid S., Verdu E. F., Zhang K., Coombes B. K. Interleukin-15 and NK1.1⁺ cells provide innate protection against acute *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection in the gut and in systemic tissues. *Infect. Immun.*, 77, 214-222 (2009).
135. Kovanen P. E., Leonard W. J. Cytokines and immunodeficiency diseases: critical roles of the gamma(c)-dependent cytokines interleukins 2, 4, 7, 9, 15, and 21, and their signaling pathways. *Immunol. Rev.*, 202, 67-83 (2004).
136. Wu X., Pan W., He Y., Hsueh H., Kastin A. J. Cerebral interleukin-15 shows upregulation and beneficial effects in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Neuroimmunol.*, 223, 65-72 (2010).
137. Carroll H. P., Paunovic V., Gadina M. Signalling, inflammation and arthritis: Crossed signals: the role of interleukin-15 and -18 in autoimmunity. *Rheumatology (Oxford)*, 47, 1269-1277 (2008).
138. Pacheco Y., Solé V., Billaud E., Allavena C., Plet A., Ferré V., Garrigue-Antar L., Raffi F., Jacques Y., Mc Ilroy D. Despite an impaired response to IL-7, CD4⁺EM T cells from HIV-positive patients proliferate normally in response to IL-15 and its superagonist, RLI. *AIDS.*, 25, 1701-1710 (2011).
139. Unutmaz D., KewalRamani V. N., Marmon S., Littman D. R. Cytokine signals are sufficient for HIV-1 infection of resting human T lymphocytes. *J. Exp. Med.*, 189, 1735-1746 (1999).

140. Azimi N., Mariner J., Jacobson S., Waldmann T. A. How does interleukin 15 contribute to the pathogenesis of HTLV type 1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis? *AIDS Res. Hum. Retroviruses*, 16, 1717-1722 (2000).
141. Ahmad A., Sharif-Askari E., Fawaz L., Menezes J. Innate immune response of the human host to exposure with herpes simplex virus type 1: in vitro control of the virus infection by enhanced natural killer activity via interleukin-15 induction. *J. Virol.*, 74, 7196-7203 (2000).
142. Kakumu S., Okumura A., Ishikawa T., Yano M., Enomoto A., Nishimura H., Yoshioka K., Yoshika Y. Serum levels of IL-10, IL-15 and soluble tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) receptors in type C chronic liver disease. *Clin. Exp. Immunol.*, 109, 458-463 (1997).
143. Rausch A., Hessmann M., Hölscher A., Schreiber T., Bulfone-Paus S., Ehlers S., Hölscher C. Interleukin-15 mediates protection against experimental tuberculosis: a role for NKG2D-dependent effector mechanisms of CD8⁺ T cells. *Eur. J. Immunol.*, 36, 1156-1167 (2006).
144. Stoklasek T.A., Schluns K. S., Lefrançois L. Combined IL-15/IL-15Ralpha immunotherapy maximizes IL-15 activity in vivo. *J. Immunol.*, 177, 6072-6080 (2006).
145. Jabri B., Abadie V. IL-15 functions as a danger signal to regulate tissue-resident T cells and tissue destruction. *Nat. Rev. Immunol.*, 15, 771-783 (2015).
146. Lanier L. L. NK cell receptors. *Annu. Rev. Immunol.*, 16 359-393 (1998).
147. Kim S., Poursine-Laurent J., Truscott S. M., Lybarger L., Song Y. J., Yang L., French A. R., Sunwoo J. B., Lemieux S., Hansen T. H., Yokoyama W. M. Licensing of natural killer cells by host major histocompatibility complex class I molecules. *Nature*, 436, 709-713 (2005).
148. Harada S., Yamamura M., Okamoto H., Morita Y., Kawashima M., Aita T., Makino H. Production of interleukin-7 and interleukin-15 by fibroblast-like synoviocytes from patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.*, 42, 1508-1516 (1999).
149. McInnes I. B., al-Mughales J., Field M., Leung B. P., Huang F. P., Dixon R., Sturrock R. D., Wilkinson P. C., Liew F. Y. The role of interleukin-15 in T-cell migration and activation in rheumatoid arthritis. *Nat. Med.*, 2, 175-182 (1996).
150. Bouchaud G., Gehrke S., Krieg C., Kolios A., Hafner J., Navarini A. A., French L. E., Boyman O. Epidermal IL-15R α acts as an endogenous antagonist of psoriasisform inflammation in mouse and man. *The Rockefeller University Press, JEM Vol. 210, 2105-2117* (2013).
151. Villadsen L. S., Schuurman J., Beurskens F., Dam T. N., Dagnaes-Hansen F., Skov L., Rygaard J., Voorhorst-Ogink M. M., Gerritsen A. F., van Dijk M. A., Parren P. W., Baadsgaard O., van de Winkel J. G. Resolution of psoriasis upon blockade of IL-15 biological activity in a xenograft mouse model. *J. Clin. Invest.*, 112, 1571-1580 (2003).
152. Chen J., Feigenbaum L., Awasthi P., Butcher D. O., Anver M. R, Golubeva Y. G., Bamford R., Zhang X., St Claire M. B., Thomas C. J., Discepolo V., Jabri B., Waldmann T. A. Insulin-dependent diabetes induced by pancreatic beta cell expression of IL-15 and IL-15R α . *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 110, 13534-13539 (2013).
153. Waldmann T. A. The biology of interleukin-2 and interleukin-15: implications for cancer therapy and vaccine design. *Nature Reviews Immunology*, 6, 595-601 (2006).
154. Mishra A., Sullivan L., Caligiuri M. A. Molecular pathways: interleukin-15 signaling in health and in cancer. *Clin. Cancer Res.*, 20, 2044-2050 (2014).
155. Villadsen L. S., Schuurman J., Beurskens F., Dam T. N., Dagnaes-Hansen F., Skov L., Rygaard J., Voorhorst-Ogink M. M., Gerritsen A. F, van Dijk M. A, Parren P. W., Baadsgaard O., van de Winkel J.G. Resolution of psoriasis upon blockade of IL-15 biological activity in a xenograft mouse model. *J. Clin. Invest.*, 112, 1571-1580 (2003).
156. Kivisäkk P., Matusevicius D., He B., Söderström M., Fredrikson S., Link H. IL-15 mRNA expression is up-regulated in blood and cerebrospinal fluid mononuclear cells in multiple sclerosis (MS). *Clin. Exp. Immunol.*, 111, 193-197 (1998)
157. Hemmer B., Cepok S., Nessler S., Sommer N. New approaches in research of therapy of multiple sclerosis. *Med. Klin. (Munich)*, 1, 23-28 (2001).
158. Constantinescu C. S., Farooqi N., O'Brien K., Gran B. Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) as a model for multiple sclerosis (MS). *Br. J. Pharmacol.*, 64, 1079-1106 (2011).
159. Motl R. W., Learmonth Y. C. Neurological disability and its association with walking impairment in multiple sclerosis: brief review. *Neurodegener Dis. Manag.*, 4, 491-500 (2014).

160. DeLuca G. C., Yates R. L., Beale H., Morrow S. A. Cognitive impairment in multiple sclerosis: clinical, radiologic and pathologic insights. *Brain Pathol.*, 25, 79-98 (2015).
161. Gold R., Linington C., Lassmann H. Understanding pathogenesis and therapy of multiple sclerosis via animal models: 70 years of merits and culprits in experimental autoimmune encephalomyelitis research. *Brain*, 129, 1953-1971 (2006).
162. Stuart G., Krikoriana K. S. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*. The Neuro-Paralytic Accidents of Anti-Rabies Treatment. Volume 22, Issue 3, 327-377 (1928).
163. Sriram S., Steiner I. Experimental allergic encephalomyelitis: a misleading model of multiple sclerosis. *Ann. Neurol.*, 58, 939-945 (2005).
164. Rivers T. M., Sprunt D. H., Berry G. P. Observations on attempts to produce acute disseminated encephalomyelitis in monkeys. *J. Exp. Med.*, 58, 39-53 (1933).
165. Rivers T. M., Schwentker F. F. Encephalomyelitis accompanied by myelin destruction experimentally produced in monkeys. *J. Exp. Med.*, 61, 689-702 (1935).
166. Schwentker F. F., Rivers T. M. The antibody response of rabbits to injections of emulsions and extracts of homologous brain. *J. Exp. Med.*, 60, 559-574 (1934).
167. Freund J., McDermott K. Sensitization to Horse Serum by Means of Adjuvants. *Exp. Biol. Med.* (Maywood), Vol. 49, No. 4, 548-553 (1942).
168. Kabat E. A., Wolf A., Bezer A. E. The rapid production of acute disseminated encephalomyelitis in rhesus monkeys by injection of heterologous and homologous brain tissue with adjuvants. *J. Exp. Med.*, 85, 117-130 (1947).
169. Morgan I. M. Allergic encephalomyelitis in monkeys in response to injection of normal monkey nervous tissue. *J. Exp. Med.*, 85, 131-140 (1947).
170. Wolf A., Kabat E. A., Bezer A. E. The pathology of acute disseminated encephalomyelitis produced experimentally in the rhesus monkey and its resemblance to human demyelinating disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 6, 333-357 (1947).
171. Thomas L., Paterson P. Y., Smithwick B. Acute disseminated encephalomyelitis following immunization with homologous brain extracts; studies on the role of a circulating antibody in the production of the condition in dogs. *J. Exp. Med.*, 92, 133-152 (1950).
172. Freund J., Stern E. R., Pisani T. M. Isoallergic encephalomyelitis and radiculitis in guinea pigs after one injection of brain and Mycobacteria in water-in-oil emulsion. *J. Immunol.*, 57, 179-194 (1947).
173. Morrison L. R. Disseminated encephalomyelitis experimentally produced by the use of homologous antigen. *Arch. Neurol. Psychiatry.*, 58, 391-416 (1947).
174. Lumsden C. E. Experimental "Allergic" Encephalomyelitis. *Brain*, Vol. 72 No. Pt. 2 198-226 (1949).
175. Ranzenhofer E. R., Lipton M. M., Steigman A. J. Effect of homologous spinal cord in Freund's adjuvant on cockerel comb, testicular and body growth. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 99, 280-282 (1958).
176. Olitsky P. K., Yager R. H. Experimental disseminated encephalomyelitis in white mice. *J. Exp. Med.*, 90, 213-224 (1949).
177. Lipton M. M., Freund J. Encephalomyelitis in the rat following intracutaneous injection of central nervous system tissue with adjuvant. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 81, 260-261 (1952).
178. Tal C., Laufer A., Behar A. J. An experimental demyelinating disease in the Syrian hamster. *Br. J. Exp. Pathol.*, 39, 158-164 (1958).
179. Johns T. G., Bernard C. C. The structure and function of myelin oligodendrocyte glycoprotein. *J. Neurochem.*, 72, 1-9 (1999).
180. Clements C. S., Reid H. H., Beddoe T., Tynan F. E., Perugini M. A., Johns T. G., Bernard C. C., Rossjohn J. The crystal structure of myelin oligodendrocyte glycoprotein, a key autoantigen in multiple sclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 100, 11059-11064 (2003).
181. Ayzenberg I., Schlevogt S., Metzendorf J., Stahlke S., Pedreitturia X., Hunfeld A., Couillard-Despres S., Kleiter I. Analysis of neurogenesis during experimental autoimmune encephalomyelitis reveals pitfalls of bioluminescence imaging. *PLoS. One*, 10 (2015).
182. Hofstetter H. H., Shive C. L., Forsthuber T. G. Pertussis toxin modulates the immune response to neuroantigens injected in incomplete Freund's adjuvant: induction of Th1 cells and experimental autoimmune encephalomyelitis in the presence of high frequencies of Th2 cells. *J. Immunol.*, 169, 117-125 (2002).

183. O'Garra A., Steinman L., Gijbels K. CD4⁺ T-cell subsets in autoimmunity. *Curr. Opin. Immunol.*, 9, 872-883 (1997).
184. Goverman J. Autoimmune T cell responses in the central nervous system. *Nat. Rev. Immunol.*, 9, 393-407 (2009).
185. Rostami A., Ciric B. Role of Th17 cells in the pathogenesis of CNS inflammatory demyelination. *J. Neurol. Sci.*, 333, 76-87 (2013).
186. Miller S. D., Shevach E. M. Immunoregulation of experimental autoimmune encephalomyelitis: editorial overview. *Res. Immunol.*, 149, 753-759 (1998).
187. Friese M. A., Fugger L. Autoreactive CD8⁺ T cells in multiple sclerosis: a new target for therapy. 1747-1763 (2005).
188. Huseby E. S., Liggitt D., Brabb T., Schnabel B., Ohlén C., Goverman J. A pathogenic role for myelin-specific CD8⁽⁺⁾ T cells in a model for multiple sclerosis. *J. Exp. Med.*, 194, 669-676 (2001).
189. Sun D., Whitaker J. N., Huang Z., Liu D., Coleclough C., Wekerle H., Raine C. S. Myelin antigen-specific CD8⁺ T cells are encephalitogenic and produce severe disease in C57BL/6 mice. *J. Immunol.*, 166, 7579-7587 (2001).
190. Ford M. L., Evavold B. D. Specificity, magnitude, and kinetics of MOG-specific CD8⁺ T cell responses during experimental autoimmune encephalomyelitis. *Eur. J. Immunol.*, 35, 76-85 (2005)
191. Jiang H., Zhang S. I., Pernis B. Role of CD8⁺ T cells in murine experimental allergic encephalomyelitis. *Science*, 256, 1213-1215 (1992).
192. Koh D. R., Fung-Leung W. P., Ho A., Gray D., Acha-Orbea H., Mak T. W. Less mortality but more relapses in experimental allergic encephalomyelitis in CD8^{-/-} mice. *Science*, 256, 1210-1213 (1992).
193. Najafian N., Chitnis T., Salama A. D., Zhu B., Benou C., Yuan X., Clarkson M. R., Sayegh M. H., Khoury S. J. Regulatory functions of CD8⁺CD28⁻ T cells in an autoimmune disease model. *J. Clin. Invest.*, 112, 1037-1048 (2003).
194. Gilliet M., Liu Y. J. Generation of human CD8 T regulatory cells by CD40 ligand-activated plasmacytoid dendritic cells. *J. Exp. Med.*, 195, 695-704 (2002).
195. Faunce D. E., Terajewicz A., Stein-Streilein J. Cutting edge: *in vitro*-generated tolerogenic APC induce CD8⁺ T regulatory cells that can suppress ongoing experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol.*, 172, 1991-1995 (2004).
196. Lee Y. H., Ishida Y., Rifa'i M., Shi Z., Isobe K., Suzuki H. Essential role of CD8⁺CD122⁺ regulatory T cells in the recovery from experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol.*, 180, 825-832 (2008).
197. Steinman L., Conlon P. Antigen specific immunotherapy of multiple sclerosis. *J. Clin. Immunol.*, 21, 93-98 (2001).
198. Hao J., Campagnolo D., Liu R., Piao W., Shi S., Hu B., Xiang R., Zhou Q., Vollmer T., Van Kaer L., La Cava A., Shi F. D. Interleukin-2/interleukin-2 antibody therapy induces target organ natural killer cells that inhibit central nervous system inflammation. *Ann. Neurol.*, 69, 721-734 (2011).
199. Vivier E., Tomasello E., Baratin M., Walzer T., Ugolini S. Functions of natural killer cells. *Nat. Immunol.*, 9, 503-510 (2008).
200. Matsumoto Y., Kohyama K., Aikawa Y., Shin T., Kawazoe Y., Suzuki Y., Tanuma N. Role of natural killer cells and TCR gamma delta T cells in acute autoimmune encephalomyelitis. *Eur. J. Immunol.*, 28, 1681-1688 (1998).
201. Shi F. D., Van Kaer L. Reciprocal regulation between natural killer cells and autoreactive T cells. *Nat. Rev. Immunol.*, 6, 751-760 (2006).
202. McLaughlin K. A., Wucherpfennig K. W. B cells and autoantibodies in the pathogenesis of multiple sclerosis and related inflammatory demyelinating diseases. *Adv. Immunol.*, 98, 121-149 (2008).
203. Tran E. H., Hoekstra K., van Rooijen N., Dijkstra C. D., Owens T. Immune invasion of the central nervous system parenchyma and experimental allergic encephalomyelitis, but not leukocyte extravasation from blood, are prevented in macrophage-depleted mice. *J. Immunol.*, 161, 3767-3775 (1998).
204. Zhang B., Yamamura T., Kondo T., Fujiwara M., Tabira T. Regulation of experimental autoimmune encephalomyelitis by natural killer (NK) cells. *J. Exp. Med.*, 186, 1677-1687 (1997).
205. Dungan L. S., McGuinness N. C., Boon L., Lynch M. A., Mills K. H. Innate IFN- γ promotes development of experimental autoimmune encephalomyelitis: a role for NK cells and M1 macrophages. *Eur. J. Immunol.*, 44, 2903-2917 (2014).
206. Xu W., Fazekas G., Hara H., Tabira T. Mechanism of natural killer (NK) cell regulatory role in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Neuroimmunol.*, 163, 24-30 (2005).

207. Korsgren M. NK cells and asthma. *Curr. Pharm. Des.*, 8, 1871-1876 (2002).
208. Hamann I., Dörr J., Glumm R., Chanvillard C., Janssen A., Millward J. M., Paul F., Ransohoff R. M., Infante-Duarte C. Characterization of natural killer cells in paired CSF and blood samples during neuroinflammation. *J. Neuroimmunol.*, 254, 165-169 (2012).
209. Kastrukoff L. F., Morgan N. G., Zecchini D., White R., Petkau A. J., Satoh J., Paty D. W. A role for natural killer cells in the immunopathogenesis of multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol.*, 86, 123-133 (1998).
210. Kastrukoff L. F., Lau A., Wee R., Zecchini D., White R., Paty D. W. Clinical relapses of multiple sclerosis are associated with 'novel' valleys in natural killer cell functional activity. *J. Neuroimmunol.*, 145, 103-114 (2003).
211. Chanvillard C., Jacolik R. F., Infante-Duarte C., Nayak R. C. The role of natural killer cells in multiple sclerosis and their therapeutic implications. *Front. Immunol.*, 4, 63 (2013).
212. Polman C. H., Reingold S. C., Barkhof F., Calabresi P. A., Clanet M., Cohen J. A., Cutter G. R., Freedman M. S., Kappos L., Lublin F. D., McFarland H. F., Metz L. M., Miller A. E., Montalban X., O'Connor P. W., Panitch H., Richert J. R., Petkau J., Schwid S. R., Sormani M. P., Thompson A. J., Weinschenker B. G., Wolinsky J. S. Ethics of placebo-controlled clinical trials in multiple sclerosis: a reassessment. *Neurology*, 70, 1134-1140 (2008).
213. Lim S. Y., Constantinescu C. S. Current and future disease-modifying therapies in multiple sclerosis. *Int. J. Clin. Pract.*, 64, 637-650 (2010).
214. Sriram S., Steiner I. Experimental allergic encephalomyelitis: a misleading model of multiple sclerosis. *Ann. Neurol.*, 58, 939-945 (2005).
215. Smith P. J., Morgan S. A., Fox M. E., Watson J. V. Mitoxantrone-DNA binding and the induction of topoisomerase II associated DNA damage in multi-drug resistant small cell lung cancer cells. *Biochem. Pharmacol.*, 40, 2069-2078 (1990).
216. Nathanson L. Mitoxantrone. *Cancer. Treat. Rev.*, 11, 289-293 (1984).
217. Millefiorini E., Gasperini C., Pozzilli C., D'Andrea F., Bastianello S., Trojano M., Morino S., Morra V. B., Bozzao A., Calo' A., Bernini M. L., Gambi D., Prencipe M. Randomized placebo-controlled trial of mitoxantrone in relapsing-remitting multiple sclerosis: 24-month clinical and MRI outcome. *J. Neurol.*, 244, 153-159 (1997).
218. Arnon R., Sela M. Immunomodulation by the copolymer glatiramer acetate. *J. Mol. Recognit.*, 16, 412-421 (2003).
219. Fridkis-Hareli M., Teitelbaum D., Gurevich E., Pecht I., Brautbar C., Kwon O. J., Brenner T., Arnon R., Sela M. Direct binding of myelin basic protein and synthetic copolymer 1 to class II major histocompatibility complex molecules on living antigen-presenting cells--specificity and promiscuity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 91, 4872-4876 (1994).
220. Constantinescu C. S., Farooqi N., O'Brien K., Gran B. Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) as a model for multiple sclerosis (MS). *Br. J. Pharmacol.*, 164, 1079-1106 (2011).
221. Arnon R., Aharoni R. Neuroprotection and neurogeneration in MS and its animal model EAE effected by glatiramer acetate. *J. Neural. Transm. (Vienna)*, 116, 1443-1449 (2009).
222. Farina C., Weber M. S., Meini E., Wekerle H., Hohlfeld R. Glatiramer acetate in multiple sclerosis: update on potential mechanisms of action. *Lancet. Neurol.*, 4, 567-575 (2005).
223. Aharoni R., Aizman E., Fuchs O., Arnon R., Yaffe D., Sarig R. Transplanted myogenic progenitor cells express neuronal markers in the CNS and ameliorate disease in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Neuroimmunol.*, 215, 73-83 (2009).
224. Bassoe P., Grinker R. R. Human rabies and rabies vaccine encephalomyelitis a clinicopathologic study. *Arch. Neur. Psych.*, 23, 1138-1160 (1930).
225. O'Garra A., Murphy K. Role of cytokines in development of Th1 and Th2 cells. *Chem. Immunol.*, 63, 1-13 (1996).
226. Abdel-Motal U.M., Dahmen J., Liu T., Ljunggren H.G., Jondal M. External glycopeptide binding to MHC class-I in relation to expression of TAP transporters, beta 2-microglobulin and to pH. *Immunol. Lett.*, 54, 31-35 (1996).
227. Yewdell J.W., Bennink J.R. Mechanisms of viral interference with MHC class I antigen processing and presentation. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.*, 15, 579-606 (1999).
228. Lin S.J., Cheng P.J., Hsiao S.S. Effect of Interleukin-15 on effector and regulatory function of anti-CD3/anti-CD28-stimulated CD4⁺ T-cells. *Bone Marrow Transplant.*, 37, 881-887 (2006).
229. Minden S.L., Marder W.D., Harrold L.N., Dor A., Multiple Sclerosis: a statistical portrait. A compendium of data on demographics, disability, and health services utilisation in the United States. Cambridge (1993).

230. Mc Glen R., Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *hayle medical* (2015).
231. Legroux L., Pittet C.L., Beauseigle D., Deblois G., Prat A., Arbour N., An optimized method to process mouse CNS to simultaneously analyze neural cells and leukocytes by flow cytometry. *J. Neurosci. Methods*, 30, 23-31 (2015).
232. Flachendecker P., Stuke K., Wlasiak W., Freidel M., Haas J., Pitschnau-Michel D., Schmirigk S., Zettl U.K., Rieckmann P. Multiple-Sklerose-Register in Deutschland. *Deutsch. Ärztebl.*, 105, 113-129 (2008).
233. Wiendl H., Neuhaus O., Kappos L., Hohfeld R., Multiple sclerosis. Current review of failed and discontinued trials of drug treatment. *Nervenarzt*, 71, 597-610 (2000).
234. Outteryck O., Natalizumab in relapsing remitting multiple sclerosis. *Expert Rev. Neurother.*, 16, 471-481 (2016).
235. Haghikita A., Hellwig K., Fischer M., Brune N., Schmirigk S., Chan A., Gold R. Natalizumab (Tysabri) neun Monate nach der Zulassung im klinischen Alltag: neutralisierende Antikörper und klinische Daten. *Akt. Neurol.*, 34, 735 (2007).
236. Huster K.M., Busch V., Schiemann M., Linkemann K., Kerksiek K.M., Wagner H., Busch D. Selective expression of IL-7 receptor on memory T cells identifies early CD40L- dependent generation of distinct CD8⁺ memory T cell subsets. *Current Issue*, 101, 5610-5615 (2003).
237. Ahlers J.D., Belyakov I.M., Terabe M., Koka R., Donaldson D.D., Thomas E.K., Berzofsky J.A., A push-pull approach to maximize vaccine efficacy: Abrogating suppression with a IL-13 inhibitor while augmenting help with granulocyte/macrophage colony stimulating factor and CD40L. *Current Issue*, 99, 13020-13025 (2002).
238. Liu J., Yu Q., Stone G.W., Yue F.Y., Ngabi N., Jones R.B., Kornbluth R.S., Ostrowski M.A. CD40L expressed from the canarypox vector, ALVAC, can boost immunogenicity of HIV-1 canarypox vaccine in mice and enhance the in vitro expansion of viral specific CD8⁺ T cell memory responses from HIV-1-infected and HIV-1-uninfected individuals. *Vaccine*, 26, 4062-4072 (2008).
239. Ahonen C.L., Doxsee C.L., McGurran S.M., Riter T.R., Wade W.F., Barth R.J., Vasilakos J.P., Noelle R.J., Kedl R.M. Combined TLR and CD40 Triggering Induces Potent CD8⁺ T Cell Expansion with Variable Dependence on Type I IFN . *JEM*, 199, 775-784 (2004).
240. Sanchez P.J., Mc Williams J.A., Haluszczak C., Yagita H., Kedl R.M. Combined TLR/CD40 stimulation mediates potent cellular immunity by regulating dendritic cell expression of CD70 in vivo. *J. Immunol.*, 178, 1564-1572 (2007).
241. Xiao Y., Peperzak V., Keller A.M., Borst J. CD27 Instructs CD4⁺ T Cells to Provide Help for the Memory CD8⁺ T Cell Response after Protein Immunization. *J. Immunol.*, 181, 1071-1082 (2008).
242. Keller A.M., Groothuis T.A., Veraar E.A.M., Marsman M., Maillette de Buy Wenninger L., Janssen H., Neefjes J., Borst J., Costimulatory ligand CD70 is delivered to the immunological synapse by shared intracellular trafficking with MHC class II molecules. *Current issue*, 104, 5989-5994 (2007).
243. Barclay A.N., Brown M.H., Law S.K.A., McKnight A.J., Tomlinson M.G., Van der Merwe P.A., *The leucocyte antigen FactsBook*, Academic Press, Second Edt. (1997).
244. Förstermann U., Closs E.I., Pollock J.S., Nakane M., Schwarz P., Gath I., Kleinert H. Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions. *Hypertension*, 23, 1121-1131 (1994).
245. Klinger M., Kim J.K., Chmura S.A., Barczak A., Erle D.J., Killeen N., Thymic OX40 Expression Discriminates Cells Undergoing Strong Responses to Selection Ligands. *J. Immunol.*, 182, 4581-4589 (2009).
246. Jones R.B., Ndhlovu L.C., Barbour J.D., Sheth P.M., Jha A.R., Long B.R., Wong J.C., Satakunrajah M., Schwenecker M., Chapman J.M., Gyenes G., Vali B., Hycza M.D., Yue F.Y., Kovacs C., Sassi A., Loutfy M., Halpenny R., Persad D., Spotts G., Hecht F.M., Chun T.W., McCune J.M., Kaul R., Rini J.M., Nixon D.F., Ostrowski M.A., Tim-3 expression defines a novel population of dysfunctional T cells with highly elevated frequencies in progressive HIV-1 infection. *JEM*, 205, 2763-2779 (2008).
247. Krieg C., Boyman O., Fu Y.X., Kaye J., B and T lymphocyte attenuator regulates CD8⁺ T cell–intrinsic homeostasis and memory cell generation. *Nature Immunology*, 8, 162-171 (2007).
248. Di Sabatino A., Calarota S.A., Vidali F., Macdonald T.T., Corazza G.R., Role of IL-15 in immune-mediated and infectious diseases. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 22, 19-33 (2011).
249. Baldassarre G., Fedele M., Battista S., Vecchione A., Klein-Szanto A.J.P., Santoro M., Waldmann T.A., Atimi N., Croce C.M., Fusco A., Onset of natural Killer cell lymphomas in transgenic mice carrying a truncated HMGI-C gene by the chronic stimulation of IL-2 and IL-15 pathway. *Current Issue*, 98, 7970-7975 (2001).

250. Polansky J. K., Bahri R., Divivier M., Duitman E. H., Vock C., Goyeneche-Patino D. A., Orinska Z., Bulfone-Paus S. High dose CD11c-driven IL15 is sufficient to drive NK cell maturation and anti-tumor activity in a trans-presentation independent manner. *Sci. Rep.*, 6, 19699 (2016).
251. Kennedy M.K., Glaccum M., Brown S.N., Butz E.A., Viney J.L., Embers M., Matsuki N., Charrier K., Sedger L., Willis C.R., Brasel K., Morrissey P.J., Stocking K., Schuh J.C., Joyce S., Peschon J.J. Reversible defects in natural killer and memory CD8 T cell lineages in interleukin 15-deficient mice. *J. Exp. Med.*, 191, 771-780 (2000).
252. Lodolce J.P., Boone D.L., Chai S., Swain R.E., Dassopoulos T., Trettin S., Ma A. IL-15 receptor maintains lymphoid homeostasis by supporting lymphocyte homing and proliferation. *Immunity*, 9, 669-676 (1998).
253. Schaefer M., Reiling N., Fessler C., Stephani J., Taniuchi I., Hatam F., Yildirim A.O., Fehrenbach H., Walter K., Ruland J., Wagner H., Ehlers S., Sparwasser T. Decreased pathology and prolonged survival of human DC-SIGN transgenic mice during mycobacterial infection. *J. Immunol.*, 180, 6836-6845 (2008).
254. Brouck T., Riedinger M., Karjalainen K. Targeted expression of major histocompatibility complex (MHC) class II molecules demonstrates that dendritic cells can induce negative but not positive selection of thymocytes in vivo. *J. Exp. Med.*, 185, 541-550 (1997).
255. Polansky J.K., Bahri R., Divivier M., Duitman E.H., Vock C., Goyeneche-Patino D.A., Orinska Z., Bulfone-Paus S. High dose CD11c-driven IL15 is sufficient to drive NK cell maturation and anti-tumor activity in a trans-presentation independent manner. *Sci. Rep.*, 6, 19699 (2016).
256. Hogquist K.A., Jameson S.C., Heath W.R., Howard J.L., Becan M.J., Carbone F.R. Pillars article: T cell receptor antagonist peptides induce positive selection. *Cell*, 76, 17-27 (1994)
257. Holland P.M., Abramson R.D., Watson R., Gelfand D.H. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5' to 3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 88, 7276-7280 (1991).
258. Holzapfel B., Wickert L., Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. *Biologie in unserer Zeit / Die quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR)*. Band 37, 120-126 (2007).
259. Pfaffle M.W., *BIOspektrum / Real-time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung*. Band 1, 92-95 (2004).
260. Lutz M.B., Kukutsch N., Ogilvie A.L., Rössner S., Koch F., Romani N., Schuler G. An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. *J. Immunol. Methods*, 223, 77-92, (1999)
260. Inaba K., Swiggard W.J., Steinman R.M., Romani N., Schuler G., Brinster C. Isolation of dendritic cells. *Curr. Protoc. Immunol.*, Chapter 3:Unit 3.7. (2009)
261. Pino P.A., Cardona A.E. Isolation of brain and spinal cord mononuclear cells using percoll gradients. *Jove*, , Feb 2;(48) (2011).
262. Parish C.R., Glidden M.H., Quah B.J., Warren H.S. Use of the intracellular fluorescent dye CFSE to monitor lymphocyte migration and proliferation. *Curr. Protoc. Immunol.*, Chapter 4:Unit4.9. (2009).
263. Chattopadhyay P.K., Melenhorst J.J., Ladell K., Gostick E., Scheinberg P., Barrett A.J., Wooldridge L., Roederer M., Sewell A.K., Probst D.A. Techniques to improve the direct ex vivo detection of low frequency antigen-specific CD8⁺ T cells with peptide-major histocompatibility complex class I tetramers. *Cytometry A*, 73,1001-1009 (2008).
264. Vasilevko V., Ghochikyan A., Holterman M. J., Agadjanyan M.G. CD80 (B7-1) and CD86 (B7-2) are functionally equivalent in the initiation and maintenance of CD4⁺ T-cell proliferation after activation with suboptimal doses of PHA. *DNA Cell. Biol.*, 21, 137-149 (2002).
265. Ma D.Y., Clark E.A. The role of CD40 and CD154/CD40L in dendritic cells. *Semin. Immunol.*, 21, 265-272 (2009).
266. Ballesteros-Tato A., León B., Lund F.E., Randall T.D. Temporal changes in dendritic cell subsets, cross-priming and costimulation via CD70 control CD8⁺ T cell responses to influenza. *Nat. Immunol.*, 11, 216-224 (2010).
267. Shortman K., Heath W.R. The CD8⁺ dendritic cell subset. *Immunol. Rev.*, 234, 18-31 (2010).
268. de Araújo-Souza P.S., Hanschke S.C., Viola J.P. Epigenetic control of interferon-gamma expression in CD8 T cells. *J. Immunol. Res.*, 849573 (2015).
269. Shnyreva M., Weaver W.M., Blanchette M., Taylor S.L., Tompa M., Fitzpatrick D.R., Wilson C.B. Evolutionarily conserved sequence elements that positively regulate IFN-gamma expression in T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 101, 12622-12627 (2004).

270. Walch M, Ramoini S, Stoeckli I, Latinovic-Golic S, Dumrese C, Sundstrom H, Vogetseder A, Marino J, Glauser D.L., Van den Broek M., Sander P., Groskurth P., Ziegler U., Involvement of CD252 and IL-2 in the Expression of Cytotoxic Proteins in Bacterial or Viral –Activated Human Cells. *Journ. Of Immun.*, 182, 7569-7579 (2009).
271. Pino P.A., Cardona A.E., Isolation of Brain and Spinal Cord Mononuclear Cells Using Percoll Gradients. *Jove*, 48, 2348 (2011).
273. Zanino I., Spreafico R., Bodio C., Di Gioia M., Cigni C., Broggi A., Gorletta T., Caccia M., Chirico G., Sironi L., Collini M., Colombo M., Garbi N., Granucci F. IL-15 cos presentation is required for optimal NK-cell activation in lipopolysaccharide mediated inflammatory conditions. *Cell Reports*, 4, 1235-1249 (2013).
274. Hendriks J., Xiao Y., Borst J., CD27 Promotes Survival of Activated T Cells and Complements CD28 in Generation and Establishment of the Effector T Cell Pool. *JEM*, 198, 1369-1380 (2003).
275. Hendriks J., Gravestien L., Tesselaar K., van Lier R., Schumacher T., Birst J., CD27 is required for generation and long-term maintenance of T cell immunity. *Nature Immunology*, 1, 433-440 (2000).
276. Ping J., Han T., Jiaqiang R., Saunders S., Wang E., Marincola F.M., Stroncek D.F. Molecular signatures of maturing dendritic cells: implications for testing the quality of dendritic cell therapies. *Journal of Translational Medicine*, 8, 1-15 (2010).
277. Mattei F., Schiavoni G., Belardelli F., Tough D.F. IL-15 is expressed by dendritic cells in response to type I IFN, double-stranded RNA, or lipopolysaccharide and promotes dendritic cell activation. *J. Immunol.*, 167, 1179-1187 (2001).
278. Helft J., Böttcher J., Chakravarty P., Zelenay S., Huotari J., Schraml B.U., Goubau D., Reis e Sousa C. GM-CSF Mouse Bone Marrow Cultures Comprise a Heterogeneous Population of CD11c⁺MHCII⁺ Macrophages and Dendritic Cells. *Immunity*. 2, 988-990 (2015).
280. Jenkins M.R, Tsun A., Stinchcombe J.C., Griffiths G.M. The strength of T cell receptor signal controls the polarization of cytotoxic machinery to the immunological synapse. *Immunity*. 31, 621-631 (2009).
281. Weng N.P., Liu K., Catalfamo M., Li Y., Henkart P.A. IL-15 is a growth factor and an activator of CD8 memory T cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 975, 46-56 (2002).
282. Oh S., Perera L.P., Terabe M., Ni L., Waldmann T.A., Berzofsky J.A. IL-15 as a mediator of CD4⁺ help for CD8⁺ T cell longevity and avoidance of TRAIL-mediated apoptosis. *Current Issue*, 105, 5201–5206 (2008).
283. Sprent J., Surh C.D. T cell memory. *Annu. Rev. Immunol.*, 20, 551-579 (2002).
284. Pritchard G.H., Cross E.W., Strobel M., Jameson S.C., Kedl R.M., Hogquist K.A., Hunter C.A. Spontaneous partial loss of the OT-I transgene. *Nat. Immunol.*, 17, 471 (2016).
285. Zhang X., Sun S., Hwang I., Tough D.F., Sprent J. Potent and selective stimulation of memory-phenotype CD8⁺ T cells in vivo by IL-15. *Immunity*, 8, 591-599 (1998).
286. Mortier E., Advincula R., Kim L., Chmura S., Barrera J., Reizis B., Malynn B.A., Ma A. Macrophage- and Dendritic-Cell-Derived Interleukin-15 Receptor Alpha Supports Homeostasis of Distinct CD8⁺ T Cell Subsets. *Immunity Cell Press*, 31, 811–822 (2009).
287. Kremontsov D.N., Case L.K., Hickey W.F., Teuscher C. Exacerbation of autoimmune neuroinflammation by dietary sodium is genetically controlled and sex specific. *FASEB J.*, 29, 3446-3457 (2015).
288. Gomez-Nicola D., Spagnolo A., Guaza C., Nieto-sampedro M., Aggravated experimental autoimmune encephalomyelitis in IL-15 KO mice. *Exp. Neuro.*, 222, 235-242 (2010).
289. Pandiyan P., Yang X., Saravanamuthu S., Zheng L., Ishihara S., The role of IL-15 in activating STAT5 and fine tuning IL-17A Production in CD4 T-Lymphocytes. *Journ. Of Immunol.* 189, 4237-4246 (2012).
290. WU X. Hsuchou H., Kastin A., He Y., Khan R., Stone K., Cash M., Pan W., Interleukin 15 affects serotonin system and exerts antidepressive effects through IL-15Ra receptor. *Psychoneuroendocrinology*, 36, 266-287 (2011).
291. Colpitts S. Puddington L. IL-15 receptor a signaling constrains the development of IL-17 producing $\gamma\delta$ T-cells, *National Acad Sciences*, 112, 9692-9697 (2015).
292. Ferber I.A., Brocke S., Taylor-Edwards C., Ridgway W., Dinisco C., Steinman L., Dalton D., Tathman C., Mice with a disrupted IFN gamma gene are susceptible to the induction of EAE. *Journ. Of Immun.*, 156, 5-7 (1996).
293. Zhang X., Sun S., Hwang I., Tough D., Sprent J., Potent and selective stimulation of memory phenotype CD8⁺ T cells in vivo by IL-15, *Immunity*, 8, 591-599 (1998).

294. Zeng R., Spolski R., Finkelstein S., Oh S., Kovanen P., Hinrichs C., Pise-Masison C., Radonovich M., Brady J., Restifo N., Berzofsky J., Leonard W., Synergy of IL-21 and IL-15 in regulating CD8⁺ T cell expansion and function. *JEM*, 201, 139-148 (2005).
295. Huntington N., Legrand N., Alves N., Jaron B., Weijer K., Plet A., Corcuff E., Mortier E., Jacques J., Spits H., Di Santo J., IL-15 trans presentation promotes human NK cell development and differentiation in vivo. *JEM*, 206, 25-34 (2008).
296. Infante-Duarte C., Weber A., Krätzschar J., Prozorovski T., Pikol S., Hamann I., Aktas O., Dörr J., Wuerfel J., Stürzebecher C., Zipp F., Frequency of Blood CX3CR1-positive NK cells correlates with disease activity in MS patients. *The FASEB Journal*, 19, 1902-1904 (2005).
297. Melief J., Koning N., Schuurman K., Van De Garde M., Smolders J., Hoek R., Van Eijk M., Hamann J., Huitinga I., Phenotyping primary human microglia: tight reactions of LPS responsiveness. *Glia*, 60, 1506-1517 (2012).
298. Kastrukoff L.F., Lau A., Wee R., Zecchini D., White R., Paty D., Clinical relapses of MS are associated with novel valleys in natural killer cell functional activity. *J. Neuroimm.*, 145, 103-114 (2003).
299. Shi F.D., Takeda K., Akira S., Sarvetnick N., Ljunggren H.G., IL-18 directs autoreactive T cells and promotes autodestruction in the CNS via induction IFN gamma by NK cells. *J. Immunol.*, 165, 3099-3104 (2000).
300. Xu W.; Fazekas G., Hara H., Tabira T., Mechanism of NK cell regulatory role in EAE. *J. Neuroimm.*, 163, 24-30 (2005).
301. Habib J., Deng J., Lava N., Tyor W., Galipeau J., Blood B-cell and regulatory subset content in MS patients. *Journ. Of MS, J. Multiple Sclerosis*, 2, 1-12 (2015).
302. Weber M.S., Prod'homme T., Patarroyo J., Molnarfi N., Kamezis T., Lehmann-Horn K., Danilenko D., Eastham-Anderson J., Slavin A., Lington C., Bernard C., Martin F., Zamvil S., B-cell activation influences T cell polarization and outcome of anti-CD20 B-cell depletion in CNS autoimmunity. *Ann. Neurol.*, 68, 369-383 (2010).
303. Stonier S.W., Schluns K.S. Trans-presentation: a novel mechanism regulating IL-15 delivery and responses. *Immun. Letters*, 2, 85-92 (2010).
304. Ku C., Murakami M., Sakamoto A., Kappler J., Marrack P., Control of homeostasis of CD8 memory T cells by opposing cytokines. *science*, 288, 675-678 (2000).
305. Carson W.E., Giri J., Lindemann M., Linett M., Ahdieh M., Paxton R., Anderson D., Eisenmann J., Grabstein K., Caligiuri M., IL-15 is a novel cytokine that activates human NK cells via components of the IL-2 receptor. *Jove*, 180, 1395-1403 (1994).
306. Marks-Konczalik J., Dubois S., Losi J., Sabzevari H., Yamada N., Feigenbaum L., Waldmann T., Tagaya Y. IL-2 induced activation induced cell death is inhibited in IL-15 transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 10, 11445-11450 (2000).
307. Van Belle T.; Grooten J., IL-15 and IL-15Ra in CD4⁺ T-cell immunity. *Arch. Immunol. Ther. Exp.*, 53, 115-126 (2005).
308. Aliyari Z., Alami F., Mostafi T., Taiefi Nasrabadi H., Soleimanirad J., Nozad H., The roles of IL-2, IL-7, and IL-15 ligands in B cells dependent from cord blood mononuclear cells. *Iran J. Ped. Hematol. Oncol.*, 5, 155-160 (2015).
309. Matsushita T., Yanaba K., Bouaziz J., Fujimoto M., Tedder T., Regulatory B-cells inhibit EAE initiation in mice while other B-cells promote DC progression. *J. Clin. Invest.*, 118, 3420-3430 (2008).
310. Fillatreau S., Sweeney C., Mc Geachy M., Gray D., Anderton S., B cells regulate autoimmunity by provision of IL-10. *Nat. Immunol.*, 3, 944-950 (2002).
311. Edwards J.C., Cambridge G., Sustained improvement in rheumatoid arthritis following a protocol designed to deplete B lymphocytes. *Rheumatology*, 40, 205-211 (2001).
312. Edwards J.C., Cambridge G., Prospects for B-cell targeted therapy in autoimmune disease. *Rheumatology*, 44, 151-156 (2005).
313. El Tal A., Posner M., Spigelman Z., Ahmed A., Rituximab: a monoclonal Antibody to CD20 used in the treatment of pemphigus vulgaris. *J. Acad Dermatol.*, 55, 449-459 (2006).
314. Anolik J-H., Barnard J., Cappione A., Pugh-Bernard A., Felgar R., Looney R., Sanz J., Rituximab improves peripheral B cell abnormalities in human systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.*, 50, 3580-2590 (2004).
315. Schroder K.; Hertzog P., Ravasi T., Hume D., Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J. Leucoc. Biol.*, 75, 163-189 (2004).
316. Ferber I., Brocke S., Taylor-Edwards C., Ridgway W., Dinisco C., Steinman L., Dalton T., Fahtman C., Mice with a disrupted IFN gamma gene are susceptible to the induction of EAE. *J. Immunol.*, 156, 5-7 (1996).

317. Sanvito L., Constantinescu C., Gran B., 't Hart B., The multifaceted role of IFN- γ in CNS autoimmune demyelination. *The Open auto. Journ.*, 2, 151-159 (2010).
318. Willenborg D., Staykova M., Fordham S., O'Brien N., Linares D., The contribution of nitric oxide and IFN gamma to the regulation of the neuro inflammation in EAE. *J. Neuroimm.*, 191, 16-25 (2007).
319. Kwizdzinski E., Bunse J., Aktas O., Richter D., Mutlu L., Zipp F., Nitsch R., Bechmann I., Indolamine 2,3-dioxygenase is expressed in the CNS and down regulates autoimmune inflammation. *FASEB Journal*, 19, 1347-1349 (2005).
320. Pierson E., Simmons S., Castelli L., Goverman J., Mechanisms regulating regional localization of inflammation during CNS autoimmunity. *Immunol. Rev.*, 248, 205-215 (2012).
321. Hedegaard C., Krakauer M., Bendtzen K., Lund H., Sellebjerg F., Nielsen C., T helper cell type 1 (Th1), Th2 and Th17 responses to myelin basic protein and disease activity in MS. *Immunology*, 124, 161-169 (2008).
322. Steel J., Waldmann T., Morris J., Interleukin 15 biology and its therapeutic implications in cancer. *Trends Pharmacol. Scien.*, 33, 35-41 (2012).
323. Alpdogan O., Van den Brink M., IL-7 and IL-15: therapeutic cytokines for immunodeficiency. *Trends Immunol.*, 26, 56-64 (2005).
324. Matsushita T., Yanaba K., Bouaziz J., Fujimoto M., Tedder T., Regulatory B cells inhibit EAE initiation in mice while other B cells promote disease progression. *J. Clin. Invest.*, 118, 3420-3430 (2008).
325. Matsumoto Y., Kohyama K., Aikawa Y., Shin T., Kawazoe, Y., Suzuki Y. and Tanuma N., Role of natural killer cells and TCR $\gamma\delta$ T cells in acute autoimmune encephalomyelitis. *Eur. J. Immunol.*, 28, 1681- 1688 (1998).
326. Gross C., Schulte-Mecklenbeck A., Rünzi A., Kuhlmann T., Schwab N., Schneider-Hohendorf T., Herich S., Held K., Konjevic M., Hartwig M., Dornmair K., Hohlfe.d R., Ziemssen T., Klotz L., Meuth S., Wiendl H., Impaired NK-mediated regulation of T-cell activity in MS is reconstituted by IL-2 receptor modulation. *Proct. Nat. Acad. Sci.*, 113, 2973-2982 (2016).
327. Heppner F., Greter M., Marino D., Falsing J., Raivich G., Hövelmeyer N., Waisman A., Prinz M., Becher B., Aguzzi A., EAE repressed by microglial paralysis. *Nature Medicine* 11, 146-152 (2005).
328. Franklin R., Kotter M., The biology of CNS remyelination: the key to therapeutic advances. *J. Immunol.*, 255, 19-25 (2008).
329. Dubois-Dalcq M., Development and regeneration of oligodendrocytes: therapeutic perspectives in demyelinating diseases. *Bull. Mem. Acad. Rev.*, 160, 407-415 (2005).
330. Kotter M., Li W., Zhao C., Franklin R., Myelin impairs CNS remyelination by inhibiting oligodendrocyte precursor Cell differentiation. *J. Neurosc.*, 26, 328-332 (2006).

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
°C	Grad Celsius
"	Sekunden
APC	Antigen präsentierende Zelle
APC (Durchflusszytometrie)	Allophycocyanin
APC-Cy	Allophycocyanin-Cyandye
BMDC	Bone Marrow Dendritic Cell (Aus dem Knochenmark generierte Dendritische Zelle)
Bref A	Brefeldin A
BV (421, 605, 711)	Brilliant Violet
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cDNA	Copy Desoxyribonukleinsäure
CFA	Komplettes Freundsches Adjuvans
CFSE	Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester
ConA	Concanvalin A
DC	Dendritic cell (Dendritische Zelle)
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPBS	Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EAE	Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis
EDTA	Ethylendiomintetraazetat
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FACS	<i>fluorescence-activated cell sorting</i>
FCS	Fötale Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FMO	<i>fluorescence minus one</i>
fsc	<i>Forward Scatter (Vorwärtsstreulicht)</i>
for	<i>forward</i>
g	<i>Erdbeschleunigung</i>
GA	Golgi Apparat
GM-CSF	<i>granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i>
h	Stunde
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
HPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphorribosyl-Transferase
IFN- γ	Interferon gamma
IL	Interleukin
JAK	Janus Kinase
kD	Kilodalton
KIN	Knock in Tiere
KO	Knock out Tiere
l	Liter

LPS	Lipopolysachharid
MACS	<i>magnetic-activated cell sorting</i>
mg	Milligramm
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i> (<i>Haupthistokompatibilitätskomplex</i>)
min	Minute
ml	Milliliter
MOG	Myelin Oligodendrozyten Glykoprotein
MS	Multiple Sklerose
NK (T)-Zelle	Natürliche Killer (T) Zelle
ns	Nicht signifikant
OVA	Ovalbumin
PBMC	Mononukleare Zellen des peripheren Blutes
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin Chlorophyll Protein
PI	Propidiumiodid
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PRR	Pattern-Recognition-Rezeptor
P/S	Penicillin /Streptomycin
PTX	Pertussis Toxin
R α	Rezeptor α
rev	revers
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
S1	Sicherheitsbereich 1
SD	Standardabweichung
SPF	Spezifisch Pathogenfrei
ssc	<i>Side Scatter</i> (Seitwärtsstreulicht)
STAT	<i>signal transducer and activator of transcription</i>
TCR	T-Zell-Rezeptor
tg	transgen
TH-Antwort	T-Helferantwort
UV-Licht	ultraviolettes Licht
WHO	Weltgesundheitsorganisation
WT	Wildtyp
z.B.	Zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 Schematische Darstellung der Komponenten des angeborenen und adaptiven Immunsystems.	1
Abb. 2: Aktivierung der CD8 ⁺ T-Zellen durch DCs	5
Abb. 3: Schematische Darstellung des Aufbaus der Rezeptorkomponenten von IL-15 und IL-2	9
Abb. 4: Schematische Darstellung der Trans- und Cis-Präsentation von IL-15.....	6
Abb. 5: Wirkungsmechanismen von IL-15/ IL-15R α	7
Abb. 6: Schematische Darstellung der von IL-15 beeinflussten Zellpopulationen	8
Abb. 7: Globale geographische Verbreitung der Prävalenz an Multipler Sklerose zu erkranken	11
Abb. 8: Generierung der IL-15 transgenen Stämme.....	18
Abb. 9: Genotypisierung des IL-15 Transgens	26
Abb. 10: Schematische Darstellung des EAE Versuchablaufs	29
Abb. 11: Anreicherung der CD8 ⁺ T-Zellen durch die Negativselektion.....	33
Abb. 12: Kontrolle der CFSE-Markierung der CD8 ⁺ T-Zellen	35
Abb. 13: Expression von CD11c RNA in der Milz der IL-15 CD11c Tiere	39
Abb. 14: Expression von IL-15 in den modifizierten Stämmen	39
Abb. 15: Effekt von IL-15 auf die Expression der MHC Moleküle von BMDCs	40
Abb. 16: Einfluss von IL-15 auf die Expression von CD80 und CD86 Molekülen von BMDCs.....	41
Abb. 17: IL-15 bedingter Effekt auf die Expression von CD40 und CD252 Molekülen von BMDCs.	42
Abb. 18: IL-15 bedingter Einfluss auf die Expression von CD70 Molekülen von BMDCs.	42
Abb. 19: Einfluss von IL-15R α auf die Expression von MHC Moleküle von BMDCs.....	43
Abb. 20: Effekt von IL-15R α auf die Expression von CD80 und CD86 Molekülen auf BMDC	44
Abb. 21: Effekt von IL-15R α auf die Expression von CD40 und CD252 auf BMDCs	44
Abb. 22: Effekt von IL-15R α auf die CD70 Expression von BMDCs	45
Abb. 23: Repräsentative Gating-Strategie für die FACS-Analyse der Proliferation von CD8 ⁺ T-Zellen.....	46
Abb. 24: Einfluss von IL-15 auf die antigenspezifische Proliferation von CD8 ⁺ T-Zellen.....	47
Abb. 25: Effekt von IL-15R α auf die antigenspezifische Proliferation der CD8 ⁺ T-Zellen.....	49
Abb. 26: Einfluss von IL-15 auf die Viabilität der TCR spezifischen CD8 ⁺ T-Lymphozyten in Kultur mit BMDCs	50
Abb. 27: Einfluss von IL-15R α auf die Viabilität von TCR spezifischen CD8 ⁺ T-Lymphozyten in Kultur mit BMDCs	51
Abb. 28: IL-15 abhängige Zytokinproduktion während der antigenspezifischen Stimulation	53
Abb. 29: IL-15R α abhängige Zytokinproduktion während der antigenspezifischen Stimulation.	54
Abb. 30: Repräsentative Gating-Strategie für die FACS-Analyse der aus der Milz isolierten DCs.	55
Abb. 31: Effekt von IL-15 auf DCs in der Milz.	56
Abb. 32: Einfluss auf die Expression von CD80 und MHC Klasse II auf den DCs der Milz	57
Abb. 33: Effekt von IL-15 auf Subpopulationen der DCs in der Milz	57
Abb. 34: Plasmazytoide DCs in Abhängigkeit von IL-15.....	58
Abb. 35: Effekt von IL-15R α auf DCs in der Milz. Absolute Zellzahl der DCs	58
Abb. 36: Effekt von IL-15R α auf die Expression kostimulatorischer Moleküle der DCs	59
Abb. 37: Effekt von IL-15R α auf Subpopulationen der DCs in der Milz	59
Abb. 38: Plasmazytoide DCs in Abhängigkeit von IL-15R α	60
Abb. 39: Effekt von IL-15 auf die Makrophagen in der Milz	60
Abb. 40: Effekt von IL-15R α auf die Makrophagen in der Milz	61
Abb. 41: Repräsentative Gating-Strategie für die FACS-Analyse der Lymphozyten aus dem Blut	61
Abb. 42: Einfluss von IL-15 auf die Lymphozyten im Blut. A: Prozentualer Anteil der CD8 ⁺ T-Zellen	62
Abb. 43: Einfluss von IL-15R α auf Lymphozyten Populationen im Blut.....	63
Abb. 44: Repräsentatives Gating für die FACS-Analyse der Milzzellen	64
Abb. 45: Einfluss von IL-15 auf CD8 ⁺ T-Zellen in der Milz	65
Abb. 46: Einfluss von IL-15 auf CD4 ⁺ T-Zellen in der Milz	65

Abb. 47: Einfluss von IL-15 auf NK-Zellen in der Milz	66
Abb. 48: Einfluss von IL-15 auf B-Zellen in der Milz	67
Abb. 49: Einfluss von IL-15R α auf CD8 ⁺ T-Zellen in der Milz	67
Abb. 50: Einfluss von IL-15R α auf CD4 ⁺ T-Zellen in der Milz	68
Abb. 51: Einfluss von IL-15R α auf NK-Zellen in der Milz.....	68
Abb. 52: Einfluss von IL-15R α auf die B-Zellen in der Milz	69
Abb. 53: Repräsentative Gating-Strategie der Analyse der Zellen des Gehirns	70
Abb. 54: Einfluss von IL-15 auf die Lymphozyten im Gehirn	71
Abb. 55: Effekt der IL-15 Rekonstitution auf NK- und B-Zellen im Gehirn	72
Abb. 56: Effekt von IL-15 auf T-Lymphozyten im Gehirn	72
Abb. 57: Einfluss von IL-15R α auf die Lymphozyten im Gehirn	73
Abb. 58: Einfluss von IL-15R α auf NK- und B-Zellen im Gehirn.....	73
Abb. 59: Einfluss von IL-15R α auf T-Lymphozyten im Gehirn.....	74
Abb. 59: Einfluss der Rekonstitution von IL-15 auf die Mikroglia im Gehirn	75
Abb. 61: Einfluss der Präsenz von IL-15R α auf die Mikroglia im Gehirn	76
Abb. 62: Effekt von IL-15 auf den Krankheitsverlauf der EAE.....	77
Abb. 63: Einfluss von IL-15R α auf den Krankheitsverlauf der EAE.....	78
Abb. 64: Einfluss von IL-15 auf das Überleben der immunisierten Tiere	79
Abb. 65: Einfluss von IL-15R α auf das Überleben der immunisierten Tiere	80
Abb. 66: Einfluss von IL-15 auf die Lymphozyten im Blut immunisierter Tiere.....	82
Abb. 67: Einfluss von IL-15R α auf Lymphozyten im Blut immunisierter Tiere	83
Abb. 68: EAE bedingte quantitative Änderungen der Lymphozyten im Blut in Abhängigkeit von IL-15.....	84
Abb. 69: EAE bedingte Änderungen der Lymphozyten Populationen im Blut in Abhängigkeit von IL-15R α	85
Abb. 70: Effekt von IL-15 auf CD8 ⁺ T-Lymphozyten in der Milz immunisierter Tiere	87
Abb. 71: Effekt von IL-15 auf CD4 ⁺ T-Lymphozyten in der Milz immunisierter Tiere	87
Abb. 72: Einfluss von IL-15 auf NK-Zellen der Milz immunisierter Tiere.....	88
Abb. 73: Effekt von IL-15 auf B-Lymphozyten der Milz immunisierter Tiere	88
Abb. 74: Einfluss der Immunisierung auf die IL-15-spezifische Rekonstitution der lymphoiden Zellen der Milz	89
Abb. 75: Einfluss der Abwesenheit von IL-15R α auf die CD8 ⁺ T-Lymphozyten der Milz immunisierter Tiere...	90
Abb. 76: Einfluss der Abwesenheit von IL-15R α auf die CD4 ⁺ T-Lymphozyten der Milz immunisierter Tiere...	90
Abb. 77: Einfluss der Abwesenheit von IL-15R α auf die NK-Zellen der Milz immunisierter Tiere	91
Abb. 78: Einfluss der Abwesenheit von IL-15R α auf B-Zellen der Milz immunisierter Tiere	91
Abb. 79: Einfluss der Immunisierung auf IL-15R α -spezifische Effekte auf die absolute Zellzahl der lymphoiden Zellen der Milz.....	92
Abb. 80: Repräsentative Gating-Strategie IFN- γ Produktion ausgewählter Lymphozyten der Milz	94
Abb. 81: IFN- γ Produktion von CD8 ⁺ Memory-Zellen in der Milz naiver Tiere in Abhängigkeit von IL-15	95
Abb. 82: IFN- γ Produktion von CD4 ⁺ Memory-Zellen in der Milz naiver Tiere unter dem Einfluss von IL-15....	95
Abb. 83: Effekt von IL-15 auf die Funktionalität von NK-Zellen aus der Milz naiver Mäuse.....	96
Abb. 84: IL-15R α gebundene IFN- γ Produktion von CD8 ⁺ T-Zellen in der Milz naiver Mäuse	97
Abb. 85: IL-15R α abhängige IFN- γ Produktion von CD4 ⁺ T-Zellen der Milz naiver Mäuse	97
Abb. 86: Einfluss von IL-15R α auf die IFN- γ Produktion von NK-Zellen in der Milz naiver Mäuse.....	98
Abb. 87: IFN- γ Produktion von CD8 ⁺ Zellen in der Milz immunisierter Tiere in Anhängigkeit von IL-15.	99
Abb. 88: IL-15 bedingte IFN- γ Produktion von CD4 ⁺ Zellen in der Milz von immunisierten Tieren	100
Abb. 89: IL-15R α bestimmte IFN γ Produktion von CD8 ⁺ Zellen in der Milz von immunisierten Tieren	102
Abb. 90: IL-15R α bedingte IFN- γ Produktion von CD4 ⁺ T-Zellen in der Milz von immunisierter Tiere.....	103
Abb. 91: IL-15R α bestimmte IFN- γ Produktion von NK-Zellen in der Milz von immunisierten Tieren.....	104
Abb. 92: Auswirkungen von IL-15 auf Lymphozyten im Gehirn immunisierter Tiere.....	105
Abb. 93: IL-15 bedingte Effekte auf die NK- und B-Zellen im Gehirn nach der Immunisierung	106
Abb. 94: Expression von CD3 ⁺ T-Lymphozyten in immunisierten Mäusen in Abhängigkeit von IL-15	106
Abb. 95: Lymphozyten im Gehirn immunisierter Mäuse unter dem Einfluss von IL-15R α	107
Abb. 96: Einfluss von IL-15R α auf NK und B-Zellen im Gehirn immunisierter Mäuse	108
Abb. 97: Anteil der CD3 ⁺ T-Lymphozyten im Gehirn immunisierter Mäuse in Abwesenheit von IL-15R α	108

Abb. 98: Effekt von IL-15 auf die Mikroglia im Gehirn nach der Immunisierung der Mäuse.....	109
Abb. 99: Menge der Mikroglia im Gehirn immunisierter Tiere in Abwesenheit von IL-15R α	110
Abb. 100: Effekte von IL-15/IL-15R α .auf die BMDCs.....	112

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Populationen der DCs im lymphatischen Gewebe.....	4
Tab. 2.: Beispiele für von DCs exprimierten kostimulatorischen Moleküle	6
Tab. 3: Verwendete Reagenzien	20
Tab. 4: Monoklonale Antikörper für die FACS-Analyse	21
Tab. 5: Detektionsreagenzien für FACS.....	21
Tab. 6: Verbrauchsmaterial	24
Tab. 7: Verwendete Geräte	24
Tab. 8: Verwendete Software.....	25
Tab. 9: Für die qRT-PCR verwendete Primer und UPL-Proben	28
Tab. 10: Einstufung der klinischen Symptomatik der immunisierten Tiere	30
Tab. 11: Wichtige Parameter zur Analyse des Effekts von IL-15 und IL-15R α auf den Krankheitsverlauf von EAE	81

Zusammenfassung

Multiple Sklerose ist eine inflammatorische, demyelinisierende autoimmune Erkrankung des zentralen Nervensystems, welche am weitesten in Nordeuropa und Nordamerika verbreitet ist. Ein wichtiges und seit vielen Jahren untersuchtes Tiermodell der Multiplen Sklerose stellt die Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis dar.

Zahlreiche Untersuchungen konnten zeigen, dass IL-15/IL-15R α eine entscheidende Rolle bei der Differenzierung von, für die Immunantwort essentiell wichtigen, CD8⁺ T-Lymphozyten und NK-Zellen sind. So zeigt sich bei IL-15KO und IL-15R α KO-Mäusen eine starke Reduktion der CD8⁺ T-Lymphozyten und NK-Zellen. IL-15 kann von unterschiedlichen Zellen produziert werden und darüber hinaus über verschiedene Mechanismen den Zielzellen präsentiert werden. Dies macht die Aktivierung der Zielzellen über IL-15/IL-15R α im Kontext einer Autoimmunreaktion zu einem sehr komplexen Prozess.

In den verwendeten IL-15 transgenen Mausstämmen findet die Produktion von IL-15 ausschließlich durch CD11c⁺ Zellen statt, was die Komplexität der IL-15-Produktion verringert. Zudem unterscheiden sie sich in der Quantität der Produktion von IL-15, was sich in der unterschiedlich starken Rekonstitution der IL-15 abhängigen CD8⁺ T-Zellen und NK-Zellen widerspiegelt. Die verwendeten IL-15 transgenen Mausstämme (KIN 64, KIN 69, KIN 65 und KIN 71) ermöglichten die Analyse der Rekonstitution von IL-15. Zudem erlaubten die verwendeten IL-15R α defizienten Stämme (IL-15R α KO, KIN 71R α und dKO) die Differenzierung des Effektes von freiem und trans-präsentiertem IL-15.

Dendritische Zellen (DCs) sind eine wichtige Verbindung zwischen den Zellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems. Deshalb wurde analysiert, ob IL-15/IL-15R α einen intrinsischen Effekt auf die DCs hat. *In vitro* kultivierte, zum Teil mit LPS stimulierte, Bone Marrow Dendritic Cells (BMDCs) wurden auf ihre Expression verschiedener kostimulatorischer Moleküle untersucht. Durch die Stimulation mit LPS wurde die Expression der meisten kostimulatorischen Moleküle zwar erhöht, es war jedoch kein modulierender Effekt von IL-15/IL-15R α erkennbar. Auch bei der *in vitro* durchgeführten antigenspezifischen Stimulation von CD8⁺ T-Lymphozyten war kein Einfluss von IL-15/IL-15R α auf die Proliferation der CD8⁺ T-Zellen sichtbar. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass IL-15R α einen positiven Einfluss auf das Überleben der CD8⁺ T-Zellen hat. Zudem konnte bei der Abwesenheit von IL-15R α (in IL-15R α und dKO Tieren) eine geringere Menge an IL-2 detektiert werden. Darüber hinaus ergab die Analyse von *in vivo* gereiften DCs aus der Milz, dass IL-15/IL-15R α keinen intrinsischen Effekt auf die Menge der DCs hat. Die Modulation von IL-15 und die Defizienz von IL-15R α haben keinen Effekt auf die Reifung oder Aktivierung von untersuchten DC-Populationen in der Milz.

Wie bereits publiziert wurde, findet in den IL-15 transgenen Stämmen die Rekonstitution der CD8⁺ T-Lymphozyten und NK-Zellen in verschiedenen Organen statt. Nach den aktuellen Erkenntnissen haben NK-Zellen und CD8⁺ T-Lymphozyten eine entscheidende Rolle bei der Erkrankung an Multipler Sklerose und in dem Mausmodell EAE. Dies ließ vermuten, dass die Rekonstitution der CD8⁺ T-Lymphozyten und der NK-Zellen in den Organen den Verlauf der EAE beeinflussen könnte. Deshalb wurde zuerst die Rekonstitution in der Milz mit der Rekonstitution in Blut und Gehirn naiver Tiere verglichen. Hierbei wurde herausgefunden, dass durch IL-15 die NK-Zellen sowohl in der Milz, als auch in Blut und Gehirn rekonstituiert werden können. CD8⁺ T-Zellen können in der Milz und in Blut

ebenfalls rekonstituiert werden. Die Rekonstitution dieser Zellen ist in der Milz, Blut und in dem Gehirn zudem abhängig von der Präsenz des IL-15R α . Anschließend erfolgte die Analyse des Effektes von IL-15 in den IL-15 transgenen Stämmen und von IL-15R α in den defizienten Stämmen hinsichtlich des Krankheitsverlaufs, der Inzidenz und der Mortalität der EAE. Der Verlauf der Erkrankung sowie die Mortalität und die Inzidenz zeigen keine direkte Abhängigkeit von der Dosis von IL-15. Es treten jedoch IL-15R α abhängige Effekte auf. Neben dem Krankheitsverlauf wurde auch der Einfluss von IL-15/IL-15R α auf die lymphoiden Zellen (CD4 $^+$ und CD8 $^+$ T-Zellen, NK-Zellen) in Blut, Milz und Gehirn in den immunisierten Mäusen analysiert. Durch die Immunisierung führt die Defizienz des IL-15R α zu einer erhöhten NK-Zellzahl im Blut. In den Milzen der immunisierten Tiere hat die Rekonstitution von IL-15 einen positiven Effekt auf die Zytokinbildung (IFN- γ) der CD8 $^+$ T- und NK-Zellen. Durch die EAE Induktion sind die lymphoiden Zellen im Gehirn unabhängig von IL-15/IL-15R α erhöht. Die Mikroglia werden durch die Immunisierung abhängig von IL-15 verstärkt exprimiert.

Zusammenfassend konnte kein direkter Zusammenhang zwischen der Rekonstitution von IL-15 und der hiermit verbundenen Rekonstitution der CD8 $^+$ T-Zellen und der NK-Zellen zu dem Krankheitsverlauf der EAE gezeigt werden. Die durch die Rekonstitution von IL-15 und der gleichzeitigen Defizienz von IL-15R α leichtere Erkrankung an EAE stellt einen potentiellen Kandidaten für die Entwicklung neuer therapeutischer Zielstrukturen für autoimmune Erkrankungen dar.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die hier vorliegende Dissertation mit dem Thema „Charakterisierung von Interleukin-15/Interleukin-15R α abhängigen Effekten während der Induktion der Experimentellen Autoimmunen Enzephalomyelitis“ unter der Anleitung von Frau Dr. Zane Orinska ohne fremde Hilfe angefertigt und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe. Weder vorher noch gleichzeitig habe ich andernorts einen Zulassungsantrag gestellt oder diese Dissertation vorgelegt. Ich habe mich bisher noch keinem Promotionsverfahren unterzogen.

Ich bin damit einverstanden, dass meine Doktorarbeit veröffentlicht wird.

Oering, den 31.05.2016

Mylène Divivier

Veröffentlichungen

Teile dieser Arbeit wurden in folgenden Vorträgen präsentiert:

- Divivier M., Fehrenbach H., Orinska Z., Characterization of IL-15/IL-15R α dependent autocrine effects on different CD11c⁺ cell populations. NDI 10/2015, Borstel
- Divivier M., Fehrenbach H., Orinska Z., Characterization of IL-15/IL-15R α dependent autocrine effects on different CD11c⁺ cell populations. Allergy meets infection 11/2015, Lübeck
- Divivier M., Orinska Z., IL-15/IL-15R α as targets for modulation of autoimmune reactions in CNS. Evaluierung des GRK 1727 01/2015, Lübeck

Publikationen:

Polansky J., Bahri R., Divivier M., Duitman E., Vock C., Goyeneche-Patino D., Orinska Z., Bulfone-Paus S. High dose CD11c-driven UL-15 is sufficient to drive NK-cell maturation and anti-tumor activity in a trans-presentation independent manner. Scientific reports, doi:10.1038/srep19699 (2015)

Danksagung

Bei Herrn Prof. Dr. H. Fehrenbach möchte ich mich herzlich für die Bereitschaft bedanken, die Schirmherrschaft für diese Arbeit zu übernehmen.

Ich danke Frau Dr. Z. Orinska für die Überlassung des hochinteressanten Promotionsthemas. Des Weiteren möchte ich mich bei ihr für die hervorragende Betreuung und die Korrektur dieser Arbeit bedanken.

Bei allen Mitarbeitern der ehemaligen FG Immunbiologie, die mich während meiner Doktorarbeit begleitet haben, möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit bedanken.

Ganz besonders danke ich Frau F. Koops für ihre Hilfe und Unterstützung bei der praktischen Durchführung der Experimente.

Besonderer Dank gilt auch Frau G. Rode für die Typisierung der Mäuse.

Frau S. Treder möchte ich für ihre tatkräftige Unterstützung bei der Durchführung der ELISA-Experimente danken.

Auch möchte ich mich bei der FG Experimentelle Pneumologie bedanken. Besonderer Dank gilt hier Frau J. Artelt für ihre Unterstützung bei der Durchführung der Experimente.

Vielen Dank auch an Frau Prof. Dr. S. Bulfone-Paus für die Überlassung der IL-15 transgenen Stämme für die Versuche.

Großer Dank gilt auch Sarah und Nina aus der Tierhaltung, für ihre große Kooperationsbereitschaft.

Ich danke Herrn Dr. J. Behrends aus der Fluoreszenz-Zytometrie-Einheit am Forschungszentrum Borstel, der bei Problemen mit der FACS-Messung stets ein offenes Ohr hatte.

Herrn Dr. C. Hölscher danke ich dafür, dass er das Amt meines Zweitbetreuers übernommen hat und für die guten Ratschläge während unserer Meetings.

Für die Übernahme der Mentorenschaft der Dissertation möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. S. Ibrahim bedanken.

Des Weiteren möchte ich allen Mitgliedern des GRK1727 für die anregenden Diskussionen in den regelmäßig stattfindenden Seminaren und Retreats danken. Großer Dank gilt auch dem GRK1727 an sich, durch das die Finanzierung meiner Doktorarbeit erst ermöglicht wurde.

Ganz großer Dank gilt meinem Partner, meinen Freunden und meiner Familie für die fortwährende moralische Unterstützung während der Anfertigung dieser Arbeit.