

Aus der Cecilie-Vogt-Klinik
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Der Einfluss dendritischer Zellen auf den Krankheitsverlauf der
Multiplen Sklerose im Tiermodell

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Jan Oliver Helmut Voß

aus Berlin

Gutachter/in: 1. Prof. Dr. med. F. Zipp
 2. Prof. Dr. med. O. Aktas
 3. Prof. Dr. S. Lehnardt

Datum der Promotion: 01.02.2013

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	5
1 EINLEITUNG	8
1.1 Grundlagen des Immunsystems	8
1.1.1 Angeborenes und adaptives Immunsystem	8
1.1.2 Antigenpräsentierende Zellen und der MHC-Komplex	9
1.1.3 T-Lymphozyten	12
1.1.4 B-Lymphozyten	19
1.1.5 Das ZNS im <i>Steady State</i>	20
1.2 Multiple Sklerose als Autoimmunerkrankung	21
1.2.1 Pathogenese der Multiplen Sklerose	22
1.2.2 Klinik und Symptome der Multiplen Sklerose	23
1.2.3 Aktuelle Therapieoptionen	24
1.3 Multiple Sklerose im Tiermodell	26
1.3.1 Experimentelle Autoimmunenzephalomyelitis	27
1.3.2 Das CD11c-DTR-GFP-Mausmodell	28
1.4 Ziel der Arbeit	31
2 MATERIAL UND METHODEN	33
2.1 Laborartikel	33
2.1.1 Puffer und Lösungen	33
2.1.2 Peptide	33
2.1.3 Zytokine.....	33
2.1.4 Antikörper und Sekundärfarbstoffe.....	33
2.1.5 Sonstige Reagenzien und Chemikalien	34
2.1.6 Sonstige Materialien	35
2.1.7 Geräte	35
2.1.8 Verwendete Software	35
2.2 Tiermodell	35
2.2.1 C57BL/6	36
2.2.2 2d2 (C57BL/6-Tg(Tcra2D2,Tcrb2D2)1Kuch/J)	36
2.2.3 CD11c-DTR	36
2.3 Zellbiologische Methodik	37
2.3.1 Prinzipien.....	37
2.3.2 Magnetische Zellsortierung.....	37
2.3.3 Durchflusszytometrie	37
2.3.4 Generierung der Chimären	40
2.3.5 Verfahren zur Zellgewinnung.....	43
2.3.6 Zellkultur	46
2.3.7 Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis.....	47
2.3.8 Wirksamkeit des transgenen CD11c-DTR-Modells.....	49
2.4 Histologie	51
2.4.1 Generierung von Gewebeschnitten.....	51
2.4.2 Färbungen	52
2.5 Statistische Datenanalyse	53

3	ERGEBNISSE	56
3.1	Depletion dendritischer Zellen während der aktiven EAE	56
3.1.1	Kontinuierliche Depletion DZ während der aktiven EAE	56
3.1.2	Depletion DZ während der Initialisierungsphase der aktiven EAE	60
3.1.3	Depletion DZ während der Effektorphase der aktiven EAE	65
3.2	Krankheitsverlauf der <i>Knockout</i>-Chimären bei ausbleibender CD80/86-Kostimulation in der aktiven EAE.....	72
3.2.1	Verminderte FoxP3 ⁺ CD4 ⁺ -Zellen in Milz und ZNS bei CD80/86 ^(-/-)	77
3.2.2	Histologische Untersuchung der Versuchstiere.....	79
3.3	In-vitro-FoxP3⁺-Generierungspotenzial dendritischer Zellen	80
3.3.1	Erhöhte Treg-Induktionsrate bei steigender TGF-β-Konzentration	80
3.3.2	Kostimulatorisch vermittelter protektiver Effekt dendritischer Zellen bei der FoxP3-Generierung.....	81
4	DISKUSSION	84
4.1	Funktion dendritischer Zellen in Autoimmunerkrankungen	85
4.2	Auswirkung der DZ-Depletion.....	87
4.2.1	Verlust der immunregulatorischen Funktion dendritischer Zellen zu Beginn der aktiven EAE.....	88
4.2.2	Abbruch in der DZ-Depletion während des Krankheitsausbruches ohne protektive Auswirkung	90
4.2.3	Auswirkung der DZ-Depletion im Krankheitsausbruch auf die Progression des Krankheitsverlaufs	93
4.3	Rolle der kostimulatorischen B7-Familie in der DZ-T-Zell-Interaktion	96
4.3.1	Effekt dendritischer Zellen durch Kostimulation über B7-Moleküle.....	98
4.3.2	Selektiver CD80/86-Knockout und verminderte FoxP3 ⁺ CD4 ⁺ -Zellen in Milz und ZNS	99
4.3.3	CD80/86-abhängige Generierung FoxP3 ⁺ -Zellen in vitro.....	100
4.4	Klinischer Ausblick und Relevanz.....	101
5	ZUSAMMENFASSUNG	104
6	ABSTRACT	105
7	LITERATURVERZEICHNIS	106
	TIERSCHUTZ.....	116
	DANKSAGUNG	117
	LEBENS LAUF	118
	PUBLIKATIONS LISTE	119
	ERKLÄRUNG AN EIDES STATT.....	120

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AF	Alexa Fluor
ANOVA	<i>engl.: analysis of variance</i> , Varianzanalyse
APC	Allophycocyanin
APZ	antigenpräsentierende Zellen
AUC	<i>engl.: area under the curve</i> , Fläche unter der Kurve
BSA	Bovines Serumalbumin
BHS	Blut-Hirn-Schranke
BZR	B-Zell-Rezeptor
°C	Grad Celsius
CD	<i>engl.: cluster of differentiation</i> , Unterscheidungsgruppen
cDZ	<i>engl.: conventional dendritic cells</i> , konventionelle/klassische dendritische Zellen
CFA	<i>engl.: complete Freund's adjuvant</i> , komplettes Freund Adjuvant
DAMPs	<i>engl.: damage associated molecular pattern molecules</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTx	Diphtherietoxin
DTR	Diphtherietoxin-Rezeptor
DZ	dendritische Zelle(n)
EAE	experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	<i>engl.: epidermal growth factor</i> , epidermaler Wachstumsfaktor
FACS	<i>engl.: fluorescence activated cell sorting</i> , Durchflusszytometrie
FCS	<i>engl.: fetal calf serum</i> , fetales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FoxP3	<i>engl.: forkhead box protein P3</i>
FSC	<i>engl.: forward scatter</i> , Vorwärtsstreulicht
g	mittlere Erdschwerebeschleunigung

Abkürzungsverzeichnis

GA	Glatirameracetat
GFP	<i>engl.: green fluorescent protein</i> , grün fluoreszierendes Protein
GM-CSF	<i>engl.: granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i> , Granulozyten- und Makrophagenkolonie-stimulierender Faktor
HE	Hämatoxilin-Eosin
HLA	humanes Leukozytenantigen
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IMDM	Iscove's Mod Dulbecco's Medium
LFA	<i>engl.: lymphocyte function-associated antigen</i> , funktionelles Leukozytenantigen
LFB	Luxol Fast Blue
LPS	Lipopolysaccharide
K.o.	<i>engl.: knockout</i> , außer Gefecht setzen
m	murin
MACS	<i>engl.: magnetic activated cell sorting</i> , magnetische Zellsortierung
MB	<i>engl.: magnetic beads</i> , magnetische Mikropartikel
MBP	<i>engl.: myelin basic protein</i> , Myelin-Basisches-Protein
MHC	<i>engl.: major histocompatibility complex</i> , Haupthistokompatibilitätskomplex
MOG	Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein
MS	Multiple Sklerose
MRT	Magnetresonanztomographie
MyD88	Myeloidischer Differenzierungsfaktor 88
n	Anzahl
NaCl	Natriumchlorid
NO	Stickstoffmonoxid
OVA	Ovalbumin
PAMP	<i>engl.: pathogen-associated molecular patterns</i> , Pathogen-assoziierte molekulare Muster
PBS	<i>engl.: phosphate buffered saline</i> , phosphatgepufferte Kochsalzlösung

Abkürzungsverzeichnis

pDZ	plasmazytoide dendritische Zellen
PE	Phycoerythrin
PerCp	Peridin-Chlorophyll-Protein
PFA	Paraformaldehyd
PI	Propidiumjodid
PLP	Proteolipid-Protein
PMA	Phorbol-Myristat-Acetat
PML	Progressive Multifokale Leukoenzephalopathie
PTx	Pertussistoxin
rER	raues Endoplasmatisches Retikulum
RPMI	Rosewell Park Memorial Institute Medium
SE	<i>engl.: standard error</i> , Standardfehler
SEM	<i>engl.: standard error of the mean</i> , Standardfehler des Mittelwertes
SSC	<i>engl.: side scatter</i> , Seitwärtsstreulicht
TLR	<i>engl.: toll-like receptor</i> , Toll-ähnlicher Rezeptor
TGF- β	<i>engl.: transforming growth factor beta</i> , Transformierender Wachstumsfaktor beta
Th	T-Helferzelle
TNF	Tumornekrosefaktor
TRAIL	<i>engl.: tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand</i> , Tumornekrosefaktor-verwandter Apoptose-induzierender Ligand
Treg	Regulatorische T-Zelle
TZR	T-Zell-Rezeptor
VCAM	<i>engl.: vascular cell adhesion molecule</i> , vaskuläres Zelladhäsionsmolekül
VLA	<i>engl.: very late antigen</i> ,
WT	Wildtyp
ZNS	Zentrales Nervensystem
α -m	Anti-murin

1 EINLEITUNG

1.1 Grundlagen des Immunsystems

Der menschliche Organismus ist einer Vielfalt an schädlichen Einflüssen der belebten wie auch der unbelebten Umwelt ausgesetzt. Dabei stellen zelluläre Bestandteile wie Bakterien, Viren, Parasiten und Protozoen, aber auch deren toxische Abbauprodukte eine potentielle Gefahr dar. Gleichzeitig ist der Organismus aber auch harmlosen sowie körpereigenen Zellen ausgesetzt, welche erkannt und verschont werden sollten. Um diesen Anforderungen gerecht zu werden, hat sich im Laufe der Evolution ein Abwehrsystem entwickelt, welches sich in eng ineinandergreifende Teile untergliedern lässt: das angeborene und das erworbene/adaptives Immunsystem.

1.1.1 Angeborenes und adaptives Immunsystem

Die Abwehrmechanismen des angeborenen Immunsystems greifen unmittelbar und unspezifisch nach Kontakt mit einem Pathogen ein. Dabei spielen zelluläre Bestandteile wie Makrophagen, dendritische Zellen, Granulozyten und natürliche Killerzellen – sog. Fresszellen (Phagozyten) –, aber auch humorale Bestandteile – wie das Komplementsystem – eine wichtige Rolle. Im Laufe der stammesgeschichtlichen Entwicklung sind diese Abwehrstrategien weitgehend unverändert geblieben. Trotz der relativ unspezifischen Abwehrreaktion weisen Teile der angeborenen Abwehr sehr genaue Funktionen – wie die Erkennung der Pathogen-assoziierten molekularen Muster (PAMP) – auf. Mittlerweile besteht die Annahme, dass dieser Teil des Immunsystems in der Lage ist, 90 % aller Infektionen erfolgreich zu erkennen und zu bekämpfen (Murphy et al. 2009). Das angeborene Immunsystem leistet hierbei einen wesentlichen Beitrag zur Aktivierung der adaptiven Abwehr.

Das adaptive Immunsystem stellt das entwicklungsgeschichtlich jüngere System dar, das sich im Laufe der Phylogenese der Wirbeltiere aus der angeborenen Abwehr entwickelte. Durch spezielle Anpassungsfähigkeiten sind Teile dieser Abwehr in der Lage, präzise auf neue oder veränderte Erreger zu reagieren. Die Zellen des adaptiven Immunsystems – die Lymphozyten – sind im Rahmen dieser Anpassung fähig, spezielle Strukturen auf der Oberfläche der Pathogene – sog. Antigene – zu erkennen und zu attackieren. Dabei exprimieren Lymphozyten spezielle, untereinander jedoch z. T. minimal verschiedene Antigenrezeptoren, welche die hierzu spezifischen Antigene erkennen und binden können. So werden bei Erstkontakt zelluläre wie auch humorale Abwehrmechanismen aktiviert – ein Prozess, der etwa vier bis sieben Tage Zeit dauert.

Eine Besonderheit der adaptiven Abwehr bildet das sogenannte immunologische Gedächtnis dieser Zellen, welches bei einer erneuten Konfrontation mit dem Pathogen eine schnellere und effizientere Immunantwort ermöglicht (Murphy et al. 2009).

1.1.2 Antigenpräsentierende Zellen und der MHC-Komplex

Über Proteinkomplexe – sog. Haupthistokompatibilitätskomplexe (*major histocompatibility complex*, MHC) – sind nahezu alle kernhaltigen Zellen des Organismus in der Lage, intrazellulär hergestellte zytosolische Proteine auf ihrer Zelloberfläche mittels MHC-Klasse-I-Molekülen zu präsentieren. Im Falle einer abnormen Antigenpräsentation, zum Beispiel bei einem Virusbefall dieser Zelle, werden intrazellulär hergestellte virale Proteine, ähnlich wie zelleigene Proteine, in Proteasomen zerteilt und über den MHC-I-Komplex präsentiert, wodurch eine CD8⁺-T-Zell-Antwort initiiert wird. CD-Moleküle sind membrangebundene Glykoproteine, welche eine immunphänotypische Einteilung der Zellen in Unterscheidungsgruppen (sog. *cluster of differentiation*, CD) nach biochemischen und funktionellen Eigenschaften erlauben (Murphy et al. 2009).

Professionell antigenpräsentierende Zellen (APZ) wie dendritische Zellen, Monozyten, Makrophagen und B-Lymphozyten sind zudem in der Lage, sowohl körperfremde Pathogene als auch erkrankte körpereigene Zellen zu phagozytieren und zu zerlegen, um daraufhin durch die Präsentation einzelner Bestandteile über MHC-Klasse-II-Moleküle eine T-Helferzell (Th)-Antwort auszulösen. Durch weitere kostimulatorische Moleküle können aktivierte professionell antigenpräsentierende Zellen naive T-Zellen aktivieren, welche sich daraufhin zu Effektorzellen umwandeln. Im Gegensatz zu B-Lymphozyten sind T-Lymphozyten auf die Antigenpräsentation über den MHC-Komplex angewiesen. Der T-Zell-Antigen-Rezeptor (TZR) benötigt zur Erkennung von Antigenfragmenten die Präsentation über den MHC-Komplex auf der Zelloberfläche antigenpräsentierender Zellen.

1.1.2.1 Dendritische Zellen

Dendritische Zellen (DZ) stammen von myeloischen sowie lymphatischen Progenitorzellen ab, welche sich nach dem gegenwärtigen Kenntnisstand aus einer gemeinsamen hämatopoetischen Stammzelle entwickeln. DZ befinden sich v. a. auf Oberflächengewebe, wie der Haut und den Schleimhäuten, aber auch in den Geweben immunologisch wichtiger Organe, um vor Ort Pathogene sowie Selbstantigene aufzunehmen und zu prozessieren. Dendritische Zellen können als eine sehr heterogene Zellpopulation angesehen werden, welche sich – trotz ausgeprägter

Fähigkeit zur Antigenaufnahme – hinsichtlich ihrer Lokalisation, ihrer Fertigkeit, Gewebe zu durchwandern, sowie in ihren immunologischen Funktionen in Abhängigkeit infektiöser oder inflammatorischer Stimuli unterscheiden. In Mäusen kann aufgrund der Expression der unterschiedlichen Oberflächenmoleküle eine Unterteilung in zwei Hauptgruppen vorgenommen werden. Konventionelle dendritische Zellen (cDZ), die die typische sternartige Form sowie die voll ausgeprägte Funktion unter *Steady-State*-Bedingungen aufweisen, können zudem in „migratorische“ DZ und in „verweilende“ DZ (v. a. im lymphatischen Gewebe) eingeteilt werden. Sie weisen hohe Werte an CD11c-Oberflächenmolekülen auf und exprimieren zudem die kostimulatorischen Moleküle CD80, CD86, CD40 sowie MHC-Komplexe. Weitere wichtige Unterteilungen können in der Maus anhand der Expression der Oberflächenmoleküle CD4 und CD8 sowie CD11b und CD205 getroffen werden (Shortman and Liu 2002).

Anders als cDZ sind die Vorstufen-DZ – sog. Prä-DZ – noch nicht voll ausgereift und bedürfen noch weiterer Reifungsprozesse, um Gestalt und Funktion voll auszubilden. Dennoch darf hier nicht von primitiven Zellformen ausgegangen werden: Prä-DZ stehen am Ende der Entwicklungsreihe, sodass keine umfassenden Zellteilungsprozesse für die letzten Schritte in der Entwicklung notwendig sind. Ein Beispiel hierfür sind plasmatische DZ (pDZ), welche die Oberflächenmoleküle $CD8^{+/-}B220^{+}$ exprimieren, nur moderate Werte an CD11c-Oberflächenmolekülen aufweisen und sich wesentlich ineffizienter in ihrer Antigenpräsentation darstellen. Nach viraler oder bakterieller Stimulation sind sie zur Produktion großer Mengen an Interferon Typ 1 fähig und damit bei der Immunantwort unerlässlich (Shortman and Liu 2002; Shortman and Naik 2007).

Eine Einteilung humaner DZ und ein daraus resultierender Vergleich hinsichtlich muriner DZ ist aufgrund limitierter Forschungsmöglichkeiten an humanem Gewebe nur schwer zu realisieren. Humane DZ weisen eine Heterogenität in der Expression der Oberflächenmoleküle CD4, CD11c und CD11b auf und sind im Besonderen durch die fehlende CD8-Oberflächenmolekül-Expression gekennzeichnet.

Pathogenstrukturen, wie die bakteriellen Lipopolysaccharide (LPS), werden von Toll-ähnlichen Rezeptoren (TLR) auf dendritischen Zellen erkannt und bewirken durch Aktivierung des myeloidischen Differenzierungsfaktors 88 (MyD88) wiederum die Aktivierung und Umwandlung von unreifen in reife dendritische Zellen (Akira and Takeda 2004). Bei der Reifung dendritischer Zellen kommt es zu mehreren Veränderungen: erhöhter Formation von MHC-Peptid-Komplexen, vermehrter Expression von kostimulatorischen Membranmolekülen der B7-Familie, welche die T-Zell-Bindung und -Aktivierung unterstützen, Veränderungen in

der Synthese von verschiedenen Zytokinen, welche die T-Zell-Proliferation und -Differenzierung beeinflussen, sowie zur veränderten Produktion von Chemokinen und Chemokinrezeptoren, die für die Intensivierung der DZ-Wanderung in lymphatische Gewebe verantwortlich sind (Steinman and Nussenzweig 2002). Nach der Aufnahme in der Peripherie beginnen DZ mit der Expression des prozessierten Antigens in Form von MHC-Peptid-Komplexen auf ihrer Oberfläche, um daraufhin in die lymphatischen Organe einzuwandern und dort den Lymphozyten die Peptidkomplexe zu präsentieren. Reife dendritische Zellen weisen eine hochregulierte Expression von MHC-Klasse-II-Molekülen sowie den kostimulatorischen Molekülen CD80/86 auf und sind durch Induzierung verschiedener löslicher und oberflächengebundener Proteine in der Lage, unterschiedliche CD4⁺- und CD8⁺-T-Zell-Effektorfunktionen zu unterstützen (Kapsenberg 2003). Durch ihre 10- bis 100-fach höheren Werte an MHC-Komplexen auf ihrer Oberfläche im Vergleich zu anderen APZ, wie B-Lymphozyten oder Monozyten, sind DZ wesentlich effizienter in ihrer T-Zell-Aktivierung (Banchereau and Steinman 1998b). Als einzige Zellart sind dendritische Zellen in der Lage, naive T-Zellen zu *primen* sowie phagozytierte, endozytisch prozessierte Antigenpeptide sowohl über MHC-Klasse-II-, als auch über MHC-Klasse-I-Moleküle zu präsentieren und somit eine CD8⁺-T-Zell-Antwort zu initiieren, was als Kreuzpräsentation bezeichnet wird (Zaft et al. 2005).

Bemerkenswerterweise sind dendritische Zellen sowohl in der Lage eine adäquate Immunreaktion auszulösen, als auch die zentrale und periphere Toleranz aufrechtzuerhalten. Dies geschieht u. a. über die Modulierung der Induzierung unterschiedlicher CD4⁺-T-Helferzell-Typen wie Th1, Th2 und Th17, welche eher proinflammatorische Wirkungen aufweisen, oder über die Anregung sog. FoxP3⁺-regulatorischer T-Zellen (Treg), welche für die Abschwächung und Regulierung der Immunantwort verantwortlich sind (Steinman and Banchereau 2007).

Entgegen der früheren Auffassung, Toleranzentwicklung bzw. Immunität seien abhängig vom Reifegrad der dendritischen Zellen (unreife, wie auch mittelreife DZ seien für Toleranz verantwortlich, reife DZ für Immunität (Lutz and Schuler 2002a)), geht man heute davon aus, dass in Abhängigkeit des dendritischen Zelltyps, des jeweiligen Aktivierungszustandes sowie der Expression kostimulatorischer oder koinhibitorischer Oberflächenmoleküle die Interaktion zwischen DZ und T-Lymphozyten zum Einen proinflammatorische Formen der Immunantwort auslösen kann, zum Anderen aber auch die T-Zell-gestützte Toleranzentwicklung unterstützt wird (Shortman and Naik 2007). Genauere Untersuchungen der Umstände, welche zur Induzierung suppressiver oder autoreaktiver T-Lymphozyten durch DZ-Stimulierung führen,

sind hier dringend notwendig um die immunmodulatorische Rolle der DZ in inflammatorischen Erkrankungen des Zentralen Nervensystems (ZNS) besser verstehen zu können.

1.1.3 T-Lymphozyten

Nach ihrer Entstehung im Knochenmark migrieren T-Lymphozyten- (Synonym T-Zellen) Vorläuferzellen in den Thymus, um durch weitere Selektionsschritte – sog. positive und negative Selektion – zu reifen. Diese Selektion führt dazu, dass autoreaktive T-Zellen erkannt und daraufhin aussortiert werden – ein Prozess, der als zentrale Toleranzinduktion bezeichnet wird (Kisielow et al. 1988). Doch nicht alle autoreaktiven T-Zellen werden durch diese Prozesse ausgesiebt und können somit auch in gesunden Lebewesen nachgewiesen werden. Während dieser Reifephase entwickeln T-Zellen die Eigenschaft, auf spezifische Antigene zu reagieren. T-Zellen tragen auf ihrer Oberfläche einen Rezeptor-Proteinkomplex, welcher für die Erkennung von Antigenen, die durch MHC-Komplexe präsentiert werden, zuständig ist. Dieser T-Zell-Rezeptor (TZR) gehört zur Immunglobulin-Gen-Superfamilie und besteht aus zwei Immunglobulinketten (zumeist α/β , seltener γ/δ), welche über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Der TZR ist an ein CD3-Rezeptormolekül gebunden, welches das Aktivierungssignal in das Zellinnere der T-Zelle leitet. Das Ausmaß der Reaktion steht dabei in Abhängigkeit von der Rezeptordichte der MHC-Moleküle auf APZ und des TZR auf T-Zellen bzw. der Konzentration an TZR-Antigen-MHC-Komplexen. T-Zellen können kein freies Antigen erkennen, sondern müssen dieses über MHC-Klasse-I- oder -II-Komplexe präsentiert bekommen (Murphy et al. 2009).

T-Zellen unterscheiden sich untereinander nicht nur durch ihren individuell spezifischen TZR, sondern zusätzlich in ihren exprimierten Korezeptoren $CD4^+/CD8^+$, welche zusammen mit dem TZR das zugehörige Antigen im MHC-Molekül-Komplex auf anderen Körperzellen erkennen. Hier kann zwischen zwei Subpopulationen unterschieden werden: a) $CD4^+$ -T-Zellen, welche durch die Sezernierung von Zytokinen die Immunantwort modulieren, und b) $CD8^+$ -Zellen, welche erkrankte Zielzellen nach Antigenaktivierung zerstören.

1.1.3.1 Naive T-Zellen und Aktivierung

Nach der Entwicklung im Thymus gelangen T-Lymphozyten ins Blut, wodurch sie in der Lage sind, periphere Lymphgewebe zu erreichen und diese zu durchwandern, um anschließend wieder über die Lymphflüssigkeit in den Blutkreislauf einzutreten. Adhäsionsmoleküle – sog. *homing* Selektine (CD62L) –, welche auf T-Zellen exprimiert werden, sorgen dafür, dass T-Zellen in sekundäre lymphatische Gewebe geführt werden. Alle T-Zellen exprimieren zudem

Zelloberflächenproteine, sog. Integrine, zum Beispiel funktionelle Leukozytenantigene (LFA-1), welche in Verbindung mit interzellulären Adhäsionsmolekülen (ICAMs) auf der Oberfläche von Venolen mit hohen Epithelien (HEV) die Passage ermöglichen. Im Kortex des Lymphknotens binden sie vorübergehend an jede antigenpräsentierende Zelle, der sie begegnen. So besteht die Möglichkeit, mit Tausenden von dendritischen Zellen in Kontakt zu treten. Reife T-Zellen, welche während dieser Wanderung nicht auf ihr passendes Antigen gestoßen sind, werden als naive T-Zellen bezeichnet. Erst die Begegnung mit dem spezifischen Antigen, welches durch passende MHC-Komplexe präsentiert wird, löst eine klonale Expansion und Differenzierung dieser Zellen aus, was auch als *priming* bezeichnet wird. Diese Form der Zellen, welche einen klonalen Hintergrund und damit identische Antigenpezifität aufweisen und nun zur Beseitigung dieses Antigens beitragen können, werden Effektorzellen genannt.

Für die Aktivierung von naiven T-Zellen sind die mit Abstand wichtigsten antigenpräsentierenden Zellen die hoch spezialisierten dendritischen Zellen, welche mit T-Zellen in einem einzigartigen, wechselseitigen Rezeptorkomplex interagieren. Die Erkennung des Peptid-MHC-Komplexes mit einer naiven T-Zelle wird als antigenspezifisch bezeichnet. Des Weiteren bedarf es einer Bindung der kostimulatorischen Moleküle B7-1 (CD80) und B7-2 (CD86) auf DZ mit CD28-Oberflächenmolekülen auf T-Zellen. Die gleichzeitige Interaktion des Antigenrezeptors und der Korezeptoren bewirkt die Aktivierung bestimmter Gene des Zellkerns und damit den Übergang der Zelle in den aktivierten Zustand. Die zusätzliche Ausschüttung von Zytokinen trägt zur Differenzierung in verschiedene Typen von T-Effektorzellen bei (Murphy et al. 2009).

Durch die Aktivierung naiver T-Zellen in Gegenwart einer Kostimulation durch CD80/86-Signale treten zuvor ruhende naive T-Zellen in die G1-Phase des Zellzyklus ein und die Synthese von Interleukin-2 (IL-2) sowie der α -Kette des IL-2 Rezeptors (CD25) wird initiiert. IL-2-Rezeptoren ruhender T-Zellen weisen nicht die normalen Ketten α , β und γ auf, sondern nur einen β/γ -Heterodimer, was eine Verminderung der Affinität zum IL-2 hervorruft. Die Aktivierung und die daraus resultierende Verbindung der α -Ketten mit dem β/γ -Heterodimer bewirkt eine bedeutend höhere Affinität, wodurch die Zelle auf eine wesentlich geringere IL-2-Konzentration reagieren kann. IL-2 bindet an diese Rezeptoren, was wiederum zu einer Ausschüttung von IL-2 der Zelle führt und damit das autokrine Wachstum der Zelle fördert. Dadurch sind die aktivierten T-Zellen in der Lage, sich mehrmals pro Tag zu teilen und eine umfassende Generation von Tochterzellen mit identischem Antigenrezeptor zu produzieren. IL-2

ist dabei das wichtigste Zytokin, das die T-Zell-Proliferation stimuliert. Kommt es bei Antigenerkennung einer T-Zelle nicht zu einer zusätzlichen Kostimulation durch ihr CD28-Molekül, wird IL-2 nur vermindert hergestellt und die Zelle ist unfähig zu proliferieren.

Aktivierete T-Zellen entwickeln sich nach vier bis fünf Tagen andauernden Wachstums zu Effektorzellen und weisen Veränderungen in ihren Eigenschaften auf. Durch eine verminderte Expression des Sphingosin-1-phosphat-Rezeptors wird das Verlassen der lymphatischen Organe unterbunden. Zudem werden bestimmte Proteine exprimiert, welche der eigenen Vermehrung Einhalt gebieten. Ein dem CD28 ähnliches Protein – das CTLA-4 – sendet der aktivierten T-Zelle bei B-7-Bindung ein inhibitorisches Signal und begrenzt die anhaltende Proliferation. Veränderungen in den Zelladhäsionsmolekülen von T-Effektorzellen bewirken eine Unterbrechung ihrer Durchwanderung von Lymphknoten.

Interessanterweise verfallen naive T-Zellen bei Antigenpräsentation körpereigener Peptide durch Gewebszellen ohne zusätzliche Kostimulation in einen anergischen Zustand. Dieser Zustand hält auch dann noch an, wenn selbst das Antigen im Folgenden von einer APZ präsentiert wird, welche die notwendigen kostimulatorischen Moleküle aufweist. Dieser Schutzmechanismus leistet einen wichtigen Beitrag zur Aufrechterhaltung der sog. Selbst-Toleranz (Murphy et al. 2009). Bemerkenswert ist zudem, dass nach abgelaufener Entwicklung der T-Zelle zur Effektorzelle beim Zusammentreffen mit dem spezifischen Antigen keine weitere Kostimulation für eine Immunantwort erforderlich ist.

1.1.3.2 $CD4^+$ -T-Zellen

Für die Erkennung von Antigenstrukturen durch $CD4^+$ -T-Zellen ist die Antigenpräsentation mittels MHC-Klasse-II-Molekülen erforderlich. Nach der Präsentation sind $CD4^+$ -T-Zellen in der Lage, sich in Abhängigkeit vom umgebenden Zytokinmilieu in verschiedene Typen von Effektorgruppen zu differenzieren, welche in unterschiedlichem Maße die Immunantwort modulieren können und sich in ihrer Zytokinproduktion voneinander unterscheiden. Dabei übt im besonderen Maße die antigenpräsentierende Zelle, welche zuvor das *Priming* initiierte, Einfluss auf den Werdegang der T-Zelle aus. Zytokine, welche zum Zeitpunkt des *Primings* auf die T-Zelle einwirken, stimulieren intrazellulär ablaufende Signalwege, die wiederum die Expression von bestimmten Transkriptionsfaktoren auslösen. Dadurch ergibt sich ein flexibles Repertoire an Effektoraktivitäten. Die unterschiedlichen T-Zell-Typen lassen sich anhand ihrer differierenden Produktion an Zytokinen in Gruppen einteilen (vgl. Abb. 1). Zu den anfänglich bekannten Th1- und Th2-T-Zellen werden zurzeit auch Th17- und sog. regulatorische T-Zellen gezählt. Sowohl das bereits erwähnte vorliegende Zytokinmilieu als auch die Stärke der

Verbindung des TZR-MHC-Komplexes spielen bei der Differenzierung eine wichtige Rolle. Interessanterweise können sich die verschiedenen Untergruppen von T-Zellen durch die Sezernierung ihrer spezifischen Zytokine in ihrer Differenzierung gegenseitig regulieren und hemmen.

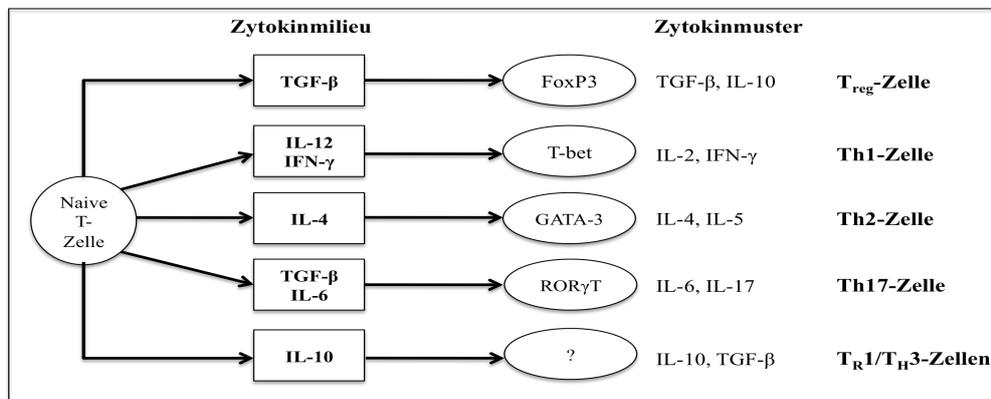


Abb. 1: CD4⁺-Differenzierungsoptionen der naiven T-Zelle in Abhängigkeit von dem vorliegenden Zytokinmilieu sowie dem dadurch entstehenden Phänotyp der jeweiligen Zelle. Treg = regulatorische T-Zelle, Th = T-Helferzelle (modifizierte Darstellung aus Murphy et al. 2009).

1.1.3.2.1 Th1-Zellen

Eine überwiegende Differenzierung von naiven T-Zellen in Th1-Zellen führt zu einer zellvermittelten Immunität und zur Produktion von opsonierenden Antikörpertypen wie dem IgG, welche sich auf der Zelloberfläche von Pathogenen absetzen und deren Abtötung mit Hilfe der Komplementkaskade sowie von Makrophagen und neutrophilen Granulozyten unterstützt wird. Die spezifischen Zytokine der Th1-Zellen IL-2, IFN- γ und TNF- α werden als proinflammatorische Zytokine bezeichnet und spielen eine zentrale Rolle bei der Aktivierung von Makrophagen, welche wesentlich zur Abtötung von intrazellulär gelegenen Pathogenen wie Viren und Bakterien beitragen. Gleichzeitig sind Th1-Zellen zur Aktivierung von zytotoxischen CD8⁺-T-Zellen wichtig und damit im Besonderen an der Bekämpfung von Virusinfektionen beteiligt. Eine weitere wichtige Funktion der Th1-Zellen liegt in der Ausschüttung von kostimulatorischen Signalen, welche antigenaktivierte naive B-Lymphozyten in der Antikörperproduktion gegen extrazelluläre Pathogene unterstützen.

Interessanterweise sezernieren Makrophagen und zytotoxische T-Zellen bei einer viralen Infektion oder nach einem Befall mit intrazellulären Erregern große Mengen an IFN- γ . Gleichzeitig führt die Produktion von IL-12 durch dendritische Zellen zu einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors T-bet und damit zu einem *Shift* in Richtung Th1-Zellantwort. Dabei

weisen die Zytokine IL-12 und INF- γ eine hemmende Wirkung in Bezug auf eine Th2-Differenzierung auf, während Interleukin-4 die Entwicklung zu Th1-Zellen verhindert (Murphy et al. 2009).

1.1.3.2.2 Th2-Zellen

Die Differenzierung in Richtung Th2-Zellen trägt zur humoralen Immunität bei, indem B-Lymphozyten in ihrer Antikörperproduktion im Besonderen durch den Isotypenklassenwechsel zum Immunglobulin E unterstützt werden. Dabei stellt das IL-4 den wirkungsvollsten Auslöser für die Entwicklung der Th2-Zellen aus naiven CD4⁺-T-Zellen über die Aktivierung des Transkriptionsfaktors GATA-3 dar. Dieser nimmt nicht nur einen verstärkenden Einfluss auf seine eigene Expression, auch die Aktivierung von Genen, welche zur Produktion des Th2-typischen Interleukin-4 führen, werden initiiert (Murphy et al. 2009).

1.1.3.2.3 Th17-Zellen

Th17-Zellen wurden erst zu Beginn des 21. Jahrhunderts in der Synovialflüssigkeit von Patienten mit Lyme-Arthritis entdeckt und werden seither mit der Entwicklung von Autoimmunerkrankungen in Verbindung gebracht (Infante-Duarte et al. 2000). Th17-Zellen sind v. a. zu Beginn einer Infektion durch die Mobilisierung von neutrophilen Granulozyten von Bedeutung und zeichnen sich u. a. dadurch aus, dass sie in der Lage sind, proinflammatorische Zytokine wie das IL-17, IL-22, den Tumornekrosefaktor- α sowie das Glykoprotein GM-CSF zu sezernieren, zur IL-4- oder INF- γ -Produktion jedoch nicht fähig sind (Murphy et al. 2009).

Bislang ist noch nicht eindeutig geklärt, welche Zytokine im Speziellen für die Differenzierung zu Th17-Zellen erforderlich sind. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass sowohl TGF- β als auch IL-6, IL-23 und IL-1 β für die Induzierung einer IL-17-Expression in naiven humanen CD4⁺-T-Zellen notwendig waren (Manel et al. 2008). Für die Festlegung der Th17-Zelllinie ist der Transkriptionsfaktor ROR γ T verantwortlich, der zur Expression des IL-23-Rezeptors beiträgt (Ivanov et al. 2006). Die Funktion des IL-23 wird v. a. in der Vermehrung und weiteren Differenzierung der Th17-Effektoraktivität vermutet (Murphy et al. 2009). Dieses zur IL-12-Familie gehörende Zytokin ist ein Heterodimer, bestehend aus einer p19-Untereinheit und einer p40-Untereinheit. Diese p40-Untereinheit ist zudem ein wichtiger Bestandteil im IL-12. Trotz der Gemeinsamkeit in der p40-Untereinheit konnten Langrish et al. zeigen, dass IL-23 zwar IL-17-produzierende Zellen expandiert, INF- γ -produzierende Zellen aber nicht stimuliert werden (Langrish et al. 2005).

Interessanterweise zeigen Interferon- γ und Interleukin-4 einen inhibierenden Effekt auf die Entwicklung von Th17-Zellen aus naiven T-Zellen, während die gleichen Zytokine auf differenzierte Th17-Zellen keine Auswirkung mehr haben (Harrington et al. 2005).

1.1.3.2.4 regulatorische T-Zellen

Regulatorische T-Zellen bilden eine heterogene Gruppe von Zellen und können in Abhängigkeit von ihrem Ursprung in wenigstens drei Kategorien eingeordnet werden: in natürliche regulatorische T-Zellen, welche im Thymus entstehen (Treg), und zwei Formen von induzierfähigen/adaptiven regulatorischen T-Zellen, welche aus naiven T-Zellen der Peripherie unter TGF- β - und IL-10-Einfluss abstammen: Th3 und Tr1. Im Folgenden werden nur die natürlichen Treg-Zellen näher beschrieben.

Natürliche Treg-Zellen sind CD4⁺-Zellen, welche zusätzlich das CD25- und CD62L-Oberflächenmolekül exprimieren und etwa 5 – 10 % aller peripheren CD4⁺-Zellen im Menschen repräsentieren (Zeng et al. 2009). Sie werden im Thymus anhand ihrer starken Bindung an MHC-Moleküle selektiert und stellen potenzielle autoreaktive Zellen dar, die den α : β -T-Zell-Rezeptor exprimieren. Der Transkriptionsfaktor FoxP3 (*forkhead box protein P3*) der Treg-Zellen bewirkt über intrazelluläre Wechselwirkungen, dass das IL-2-Gen nicht aktiviert wird und die Zelle vorwiegend anergisch vorliegt (Murphy et al. 2009). Yamazaki et al. konnten in In-vitro-Experimenten zeigen, dass auch ohne zusätzliche Zytokinzusätze reife dendritische Zellen in der Lage sind, CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺-Zellen zur Proliferation anzuregen (Yamazaki et al. 2003). Die sezernierten Zytokine IL-10 und TGF- β sind fähig, die Differenzierung dendritischer Zellen so zu beeinflussen, dass die IL-12-Freisetzung gehemmt und damit die Differenzierung von Th1-Zellen beeinträchtigt wird.

Regulatorische T-Zellen sind sowohl für die Eindämmung einer aufkommenden Immunantwort als auch für die Aufrechterhaltung der Selbsttoleranz von großer Bedeutung. Im Tiermodell konnte gezeigt werden, dass die gezielte FoxP3-Gendepletion in eine frühe multiorgan-lymphoproliferative Autoimmunerkrankung mündete (Fontenot and Rudensky 2005). Gleichzeitig konnten Carrier et al. zeigen, dass der Transfer von CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺-Zellen die experimentelle Autoimmunenzephalomyelitis in Mäusen unterdrückt, sofern der Transfer vor Ausbruch bzw. während des Ausbruches vollzogen wird (Carrier et al. 2007).

1.1.3.2.5 Gedächtniszellen

Nach abgeschlossener Immunantwort sterben viele der Effektorzellen, die für die Bekämpfung der Infektion verantwortlich waren, durch Initiierung der Apoptose. Einige dieser Effektorzellen bleiben jedoch am Leben und werden anschließend als Gedächtniszellen bezeichnet. Sie sind dafür verantwortlich, dass bei erneuter Konfrontation mit dem Pathogen eine viel schnellere und effektivere Reaktion zur Bekämpfung eingeleitet wird. Es ist bislang noch nicht eindeutig geklärt, welche Faktoren dafür verantwortlich sind, dass einige der Effektorzellen in den programmierten Zelltod eintreten, während andere Zellen erhalten bleiben. Gedächtniszellen können sich sowohl direkt aus naiven T-Zellen als auch aus Effektorzellen differenzieren. Dabei wandern sie in die peripheren Gewebe oder verbleiben im lymphatischen Gewebe (Murphy et al. 2009).

Im Vergleich zu den Effektorzellen weisen Gedächtniszellen Unterschiede in ihrem Oberflächenmolekülmuster auf. Zusätzlich unterscheidet sich diese Art von Zellen hinsichtlich ihrer Gene, welche das Überleben der Zellen steuern. Die meisten dieser Zellen befinden sich in einer Art Ruhestadium. Einige wenige Zellen führen jedoch zu bestimmten Zeitpunkten eine Teilung durch. Dabei bleibt die Gesamtzahl dieser Gedächtniszellen in der Gedächtnisphase konstant, was auf ein Gleichgewicht zwischen Zelltod und Proliferation hinweist (Murphy et al. 2009). Hammarlund et al. konnten zeigen, dass auch 75 Jahre nach abgelaufener Impfung gegen das Pockenvirus Antikörper nachweisbar waren, während T-Gedächtniszellen eine ungefähre Halbwertszeit von 8 bis 15 Jahren aufweisen (Hammarlund et al. 2003).

1.1.3.3 CD8⁺-T-Zellen

Zellen, welche einen Virusbefall aufweisen, präsentieren nicht nur ihre eigenen Peptidfragmente über MHC-Klasse-I-Komplexe, sondern auch Fragmente von viralen Proteinen. CD8⁺-T-Zellen – sog. zytotoxische T-Zellen – erkennen Peptidfragmente von Pathogenstrukturen aus dem Zytosol, welche auf der Zelloberfläche von Zielzellen mittels MHC-Klasse-I-Komplexen präsentiert werden, und leiten Mechanismen ein, die zur Zerstörung bzw. Abtötung der Zelle führen.

Die Bindung des membranständigen Fas-Liganden auf CD8⁺- und Th1-Zellen mit dem Fas auf Zielzellen löst eine Caspasereaktion aus, welche in die Apoptose der Zielzelle mündet. Zytotoxische Zellen besitzen intrazellulär gelegene lytische Granula, welche ihre Funktion nach der Freisetzung erhalten. Perforine bewirken das Eindringen des Inhaltes der Granula in das Zytosol der Zielzelle. Dort lösen sog. Granzyme eine Aktivierung der Caspasekaskade aus.

Zusätzlich bewirken sezernierte Zytokine wie IFN- γ eine Einschränkung der viralen Replikation sowie eine gesteigerte Expression von MHC-Klasse-I-Molekülen auf benachbarten Zellen. Bei erneuter Bindung zwischen T-Zell-Rezeptor und dem passenden Liganden werden erschöpfte Vorräte an lytischen Granula wieder aufgefüllt. So kann eine einzige CD8⁺-T-Zelle nacheinander mehrere befallene Zellen zerstören (Murphy et al. 2009).

Für die Differenzierung naiver CD8⁺-T-Zellen in zytotoxische T-Effektorzellen bedarf es einer stärkeren Kostimulation als bei CD4⁺-T-Zellen. Dendritische Zellen, welche eine hohe Aktivität aufweisen, können CD8⁺-T-Zellen zur IL-2-Produktion veranlassen, wodurch die Differenzierung vorangetrieben wird. In seltenen Fällen kann ein *Priming* der CD8⁺-T-Zelle ohne Hilfe direkt durch die vom Virus befallene Zelle stattfinden. In der Regel jedoch bedarf es einer zusätzlichen Hilfe durch CD4⁺-T-Zellen. Diese interagieren mit schwach präsentierenden APZ und der gebundenen CD8⁺-T-Zelle, so dass sowohl die APZ eine höhere kostimulatorische Aktivität induziert als auch die CD4⁺-T-Zelle selbst IL-2 sezerniert, was die Proliferation und Differenzierung der CD8⁺-Zelle initiiert.

1.1.4 B-Lymphozyten

Im Menschen entstehen die B-Lymphozyten (B-Zellen) im Knochenmark und werden durch ihre Fähigkeit zur Antikörperproduktion der humoralen Immunantwort des adaptiven Immunsystems zugeordnet. Im Gegensatz zu T-Zellen sind B-Zellen in der Lage, löslich vorliegende Antigene direkt über ihren membranständigen B-Zell-Rezeptor (BZR) zu binden. Dabei kann die B-Zelle in Abhängigkeit von dem vorliegenden Antigen in einer T-Zell-abhängigen oder T-Zell-unabhängigen Weise aktiviert werden. Um die Unterstützung einer T-Helferzelle zu erhalten, nimmt die B-Zelle den Antigen-BZR-Komplex auf und präsentiert Bestandteile des Pathogens mittels MHC-Klasse-II-Komplexen auf ihrer Zelloberfläche. So kann die T-Helferzelle an den MHC-Komplex binden und schüttet ihrerseits Zytokine aus, welche eine Vermehrung – eine sog. klonale Expansion – und eine Differenzierung in antikörperproduzierende Plasmazellen unterstützen. Die Antikörper weisen dabei eine ähnliche Y-förmige Gestalt auf wie der BZR. Durch ihre zwei identischen Enden können Antikörper an Pathogene binden und dadurch sowohl die Neutralisierung und Opsonierung der Pathogene unterstützen als auch den Abbau über die Aktivierung der Komplementkaskade durch den Fc-Teil des Antikörpers veranlassen. Die Antikörper der B-Zelle weisen dabei dieselbe Spezifität auf wie ihr B-Zell-Rezeptor. Zusätzliche Mutationen der Antikörper-Gene bewirken eine verbesserte Affinität zum Antigen, was als somatische Hypermutation bezeichnet wird (Murphy et al. 2009).

1.1.5 Das ZNS im *Steady State*

Entgegen der früheren Annahme, das ZNS sei ein abgeschlossenes, immunologisch privilegiertes System, welches isoliert vom Immunsystem vorläge, kann man heutzutage davon ausgehen, dass eine immunologische Überwachung wie auch ein Austausch mit dem peripheren Immunsystem permanent besteht. Die wichtigste Struktur, die dabei einem übermäßigen Austausch an Stoffen und Zellen entgegenwirkt, ist die sog. Blut-Hirn-Schranke (BHS).

Unter *Steady-State*-Bedingungen exprimieren Endothelzellen der Blutgefäße im Gehirn nur ein sehr geringes Niveau an sog. vaskulären Zelladhäsionsmolekülen (VCAM) wie VCAM-1 auf ihrer Oberfläche, welche eine Leukozytenimmigration über die Bindung der *very-late-antigen-4* (VLA-4)-Oberflächenmoleküle auf Leukozyten unterstützen. Parazellulärer Transport wird durch Adhäsions-Schlussleisten, sog. *tight junctions*, einen komplizierten Komplex aus Transmembranproteinen zwischen Endothelzellen, verhindert. Zusammen mit Astrozyten, Perizyten, Neuronen und der extrazellulären Matrix bildet die BHS eine neurovaskuläre Einheit, welche für die Funktion und Unversehrtheit des Immunsystems verantwortlich ist.

Trotz dieser effektiven Abschirmung sind unter physiologischen Bedingungen aktivierte T-Zellen in der Lage, das Gehirn zu durchwandern und auf ihr spezifisches Antigen hin zu begutachten. Dabei scheinen aktivierte T-Zellen das ZNS nicht gezielt, sondern willkürlich auf der Suche nach ihrem spezifischen Antigen aufzusuchen (Hickey 1999). Naive T-Zellen, welche noch keine Antigen-Aktivierung erfahren haben, sind nicht in der Lage, die BHS zu penetrieren (Engelhardt and Ransohoff 2005).

Eine weitere Besonderheit des ZNS ist das Fehlen von Lymphgefäßen. Heute weiß man, dass die Drainage des Gehirns durch das Passieren der zirkulierenden Rückenmarksflüssigkeit gewährleistet wird und über den Virchow-Robin-Raum kraniale Spinalnervenwurzeln erreicht werden können (Kida et al. 1995). Über diesen Weg finden Antigene von Gehirnstrukturen ihren Weg in die Peripherie, wo sie über APZ in sekundär lymphatischen Geweben präsentiert werden können. Dendritische Zellen sind unter normalen Umständen selten im ZNS-Gewebe aufzufinden, können aber v. a. in gefäßreichen Gebieten, wie den Meningen und dem Plexus Choroideus, gefunden werden (Zozulya et al. 2010). Mikrogliazellen, Astrozyten, Makrophagen, B-Zellen, aber v. a. perivaskuläre dendritische Zellen sind zur Antigenpräsentation über MHC-II-Moleküle im ZNS befähigt. Zudem sind auch Neurone unter bestimmten Bedingungen in der Lage, MHC-Moleküle auf ihrer Oberfläche zu exprimieren (Höftberger et al. 2004).

Durch Infektionen, andauernde Inflammation oder sogar durch Zelluntergang bei ischämischen Bedingungen verändert sich das Milieu des ZNS in eine proinflammatorische Lage. Die Migration von T-Zellen erhöht sich durch vermehrte Expression von Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen. Zytokine wie TNF- α bewirken zum Einen eine vermehrte Permeabilität, zum Anderen kommt es zu einer erhöhten Passage von Molekülen aus dem ZNS in die Peripherie (Dickstein et al. 2000).

1.2 Multiple Sklerose als Autoimmunerkrankung

Der wohl früheste beschriebene Fall der Multiplen Sklerose (MS) stammt aus dem 14. Jahrhundert. Saint Ludwina von Schiedam wies im Alter von 16 Jahren Paresen der Beinmuskulatur, verbunden mit Koordinations- sowie Gleichgewichtsstörungen, auf, welche zusammen mit visuellen Einschränkungen auftraten und nach einiger Zeit wieder verschwanden. Nach dieser ersten Beschreibung folgten Veröffentlichungen u. a. von Carswells und Cruveilhiers, welche Läsionen in Teilen des Rückenmarkes von Patienten mit ähnlichen neurologischen Symptomen beschrieben. 1868 lieferte dann Charcot die erste umfassende Beschreibung der histologischen und klinischen Befunde und gab der Erkrankung den Namen „*sclérose en plaques*“ (Charcot JM 1868). Heutzutage gilt die Multiple Sklerose als die häufigste chronisch-inflammatorische Erkrankung des ZNS in der westlichen Welt (Siffrin et al. 2007).

Histologische Untersuchungen zeigen in Biopsieproben aus Gehirnen von MS-Patienten multiple, scharf abgrenzbare Plaques in der weißen Substanz des ZNS mit Prädilektionsstellen im Sehnerven, der periventrikulären weißen Substanz, im Hirnstamm sowie in der weißen Substanz im Rückenmark (Trapp et al. 1998). Die degenerativen Prozesse umfassen dabei den Verlust von Axonen in Läsionen, diffuse Beschädigungen der weißen Substanz, welche unter Umständen entfernt außerhalb der Läsionsgrenzen mit typischer Histopathologie liegen, sowie die Involvierung der tiefen und kortikalen grauen Substanz (McFarland and Martin 2007).

Das Zellprofil der inflammatorischen Läsionen weist dabei unterschiedlichste Zellen auf wie: perivaskuläre CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen, Monozyten, B-Zellen, Plasmazellen sowie Antikörper und Komplementsystemablagerungen. Zudem können Lymphozyten in Bereichen der weißen Substanz außerhalb von Läsionen aufgefunden werden, welche keine typischen Merkmale aufzeigen. Dabei wurden insgesamt vier verschiedene Kategoriestadien der Pathologie beschrieben, welche sich in folgenden Merkmalen voneinander abgrenzen: Ausmaß der Demyelinisierung, Umfang und Ort des Plaqueaufkommens, Art der Oligodendrozyten-

zerstörung sowie im unterschiedlichen Zellaufkommen und in der Komplementaktivierung (Hafler 2004). Die Ursachen, die dabei zum Ausbruch der Erkrankung führen, sind bis heute nicht genau geklärt. Mittlerweile wurde eine Reihe von Einflussfaktoren bestimmt, bei denen sowohl der genetische Hintergrund bei bestimmten humanen Leukozytenantigen-Typen (HLA) als auch Umweltfaktoren eine große Rolle spielen (Hemmer et al. 2002).

1.2.1 Pathogenese der Multiplen Sklerose

Obwohl über die Jahre immer wieder infektiöse Pathogene, wie das Epstein-Barr-Virus oder das *Chlamydia-pneumoniae*-Bakterium, als mögliche Auslöser der Multiplen Sklerose in Betracht gezogen wurden, geht man heute davon aus, dass in genetisch suszeptiblen Individuen autoreaktive T-Zellen, welche Antigenstrukturen auf Myelinscheiden im ZNS erkennen, verantwortlich für den Ausbruch der Erkrankung sind. Innerhalb des normalen T- und B-Zell-Repertoires kommen Zellen vor, welche eigene Antigene erkennen und bekämpfen können. Diese autoreaktiven Zellen unterliegen unter normalen Umständen bestimmten Regulierungen, welche eine sog. Immuntoleranz gegenüber körpereigenen Zellen bewirken, zugleich jedoch eine effektive Abwehr gegenüber Pathogenen sicherstellen. Die Aktivierung dieser autoreaktiven Zellen und damit die Auslösung einer Autoimmunreaktion ist – neben dem Differenzierungsgrad der antigenpräsentierenden dendritischen Zelle – von der Expression kostimulatorischer bzw. koinhibitorischer Oberflächenmoleküle sowie dem Niveau proinflammatorischer Zytokine, wie Tumornekrosefaktor (TNF)- α und IL-6, abhängig (Lutz and Schuler 2002b; Zozulya et al. 2010).

Nach Aktivierung sind T-Zellen im Gegensatz zu naiven T-Lymphozyten in der Lage, die Blut-Hirn-Schranke zu penetrieren und mit antigenpräsentierenden Zellen des ZNS in Kontakt zu treten (Engelhardt and Ransohoff 2005). Werden dann die TZR-spezifischen Antigenstrukturen im ZNS von den T-Zellen aufgefunden, sezernieren diese Zytokine wie TNF- α , welche eine inflammatorische Kaskade initiieren. Dabei kommt es u. a. durch aktivierte Mikrogliazellen und Makrophagen zur Ausschüttung von Sauerstoffradikalen wie dem Stickstoffmonoxid (NO). Als freies Radikal ist NO am Zelluntergang der oligodendrozytischen Zellen beteiligt. Von B-Zellen sezernierte Antikörper leiten Komplementkaskaden ein und vervollständigen die Bandbreite der Immunantwort (Steinman 2001).

1.2.1.1 Mechanismen der auf- und abbauenden Prozesse

Das komplexe Zusammenspiel von T-Zellen, B-Zellen, Makrophagen, Komplementkaskade und Zytokinen bewirkt durch Demyelinisierung sowie den Untergang von Axonen eine Beeinflussung der elektronischen Leitfähigkeit der Nerven und mündet in neuronale Ausfälle.

Durch den Verlust der schützenden Myelinscheide beim Oligodendrozytenuntergang zeigen Axone Zeichen von Apoptose. In Läsionen akuter Demyelinisierung konnten zudem ausgedehnte Bereiche beeinträchtigter Axone mit axonaler Unterbrechung nachgewiesen werden (Trapp et al. 1998). Doch nicht nur Axone scheinen von der Demyelinisierung betroffen zu sein. Zusätzlich zur Demyelinisierung und dem axonalen Zelluntergang konnten ein neuronaler Untergang und Unterbrechungen von Neuriten im Kortex von MS-Patienten detektiert werden (Peterson et al. 2001).

Magnetresonanztomographie (MRT)-gestützte Auswertungen der auftretenden Gehirnatrophien deuten zudem auf eine progressive Degeneration von Strukturen der grauen Substanz in frühen Phasen der MS hin (Dalton et al. 2004). Zipp et al. beschrieben neben dem axonalen Untergang die Auswirkung T-Zell-vermittelten neuronalen Untergangs durch sog. Todesliganden wie TRAIL (Tumornekrosefaktor-verwandter Apoptose-induzierender Ligand), welcher auf CD4⁺-eingewanderten T-Zellen exprimiert wird. Ein zusätzlicher Faktor, der zum Untergang von Neuronen beiträgt, ist 7-Ketocholesterol, welches ein Abbauprodukt der Myelinscheide darstellt und einen neurotoxischen Phänotyp in Mikrogliazellen hervorruft (Zipp and Aktas 2006).

Abhängig vom jeweiligen Zeitpunkt der Erkrankung sowie vom Krankheitsverlauf treten Demyelinisierungen im Kortex und in den Kernen der grauen Substanz sowie diffuse Verletzungen der normal erscheinenden weißen Substanz auf und zeigen dabei unterschiedliche Ausprägungen bei verschiedenen Patienten (Lassmann et al. 2007).

Überraschenderweise laufen Reparaturmechanismen bereits in früheren Phasen der MS ab. Remyelinisierung konnte in räumlicher Nähe zur aktiven Zerstörung von Myelinscheiden durch T-Zellen und Makrophagen gesehen werden. Zwar sind neue Myelinscheiden im Vergleich zu den vorherigen dünner und die Myelinisierungen liegen in kürzeren Intervallen vor, eine vollständige Remyelinisierung kann jedoch erreicht werden (Stadelmann and Brück 2008).

1.2.2 Klinik und Symptome der Multiplen Sklerose

In Abhängigkeit von Ort und Ausmaß der Schädigung in Gehirn, *Nervus Opticus* und Rückenmark ist das klinische Bild der Multiplen Sklerose mit Symptomen wie Taubheitsgefühl,

Missempfindungen und Muskelschwäche in den Extremitäten, Ataxie, unscharfem Sehen und schmerzhaften Augenbewegungen, Blasen- und Darmdysfunktionen sowie Abgeschlagenheit sehr variabel und von Patient zu Patient verschieden. Im Alter zwischen 20 – 40 Jahren kommt es meist zum Auftreten erster Symptome (McFarlin and McFarland 1982a, 1982b). In 85 – 90 % der Fälle erleiden die Patienten voneinander abgrenzbare Schübe, in denen Symptome auftreten, welche sich anfänglich vollständig oder unvollständig wieder zurückbilden können. Diese Form wird als schubförmig-remittierender Verlauf bezeichnet und mündet über Jahre hinweg häufig in einer sog. sekundär-progressiven Form, in der es zu einer langsamen Zunahme der neurologischen Dysfunktionen kommt. Pathologisch werden im Besonderen fokalinflammatorische demyelinisierte Läsionen in der weißen Substanz detektiert. Abzugrenzen sind hiervon ca. 10 – 15 % der Patienten mit einer schleichenden Progression von Beginn an, ohne Rückbildung der neurologischen Defizite; diese Form wird als primär progrediente MS bezeichnet und weist eher eine globale Beeinträchtigung des Gehirns mit diffusem axonalem Schaden in normal erscheinender weißer Substanz sowie Demyelinisierung im Kortex der grauen Substanz auf (Gold et al. 2006). Unklar ist bis heute, welche Faktoren die jeweilige Verlaufsform begünstigen und wie die morphologischen und histopathologischen Unterschiede erklärt werden können. Man geht jedoch davon aus, dass genetische Faktoren, welche die immungesteuerte Inflammation beeinflussen, aber auch neuronales Überleben einen wesentlichen Einfluss in der Modulierung der Erkrankung aufweisen (Compston and Coles 2008).

1.2.3 Aktuelle Therapieoptionen

Die aktuell angewendeten Therapiestrategien richten sich in erster Linie auf die Modulierung der Immunreaktion während der inflammatorischen Phasen der MS. Hierbei werden verschiedene Ansätze verfolgt, um auf das Immunsystem Einfluss zu nehmen: a) Ausschalten spezifischer Immunzellpopulationen, b) Blockierung der T-Zell-Migration ins ZNS und c) ein sog. Neustart des Immunsystems, wodurch das bestehende Immunzellrepertoire gelöscht wird. Während akuter Schübe werden zur Remissionsinduzierung intravenös hoch dosierte Steroide appliziert. Zur Langzeittherapie werden sog. Immunmodulatoren wie Interferon- β und Glatirameracetat (GA) eingesetzt.

Der Effekt des Interferon- β zeigt sich durch die Reduzierung der Rückfälle sowie das verlangsamte Voranschreiten des Behinderungsgrades. Die verminderte Expression kostimulatorischer Moleküle sowie die Hemmung der MHC-Klasse-II-Antigenpräsentation führt

über eine gehemmte Aktivierung zu einer verminderten T-Zell-Antwort. Des Weiteren kommt es durch die unterdrückte Th1-Zell-Antwort zu einem antiproinflammatorischen *Shift* hin zum Th2-Phänotyp. Der wohl wichtigste Effekt liegt jedoch in der Reduktion der Sekretion von Matrix-Metalloproteasen und der Reduktion der Expression von VLA-4 auf T-Zellen, was zu einer verminderten T-Zell-Migration in das ZNS führt (Hartung et al. 2004).

Der genaue Wirkmechanismus des Glatirameracetates ist momentan noch nicht eindeutig geklärt. In-vitro-Experimente deuten jedoch auf eine durch strukturelle Ähnlichkeit bedingte Konkurrenz zwischen GA und einem Protein der Myelinscheide um die Bindung an MHC-Moleküle hin. Zudem konnte in MS-Patienten ein Wechsel der GA-reaktiven T-Zell-Population vom Th1- zum Th2-Phänotyp gezeigt werden. Aufgrund ihres hohen Nebenwirkungspotentiales werden die Arzneistoffe Mitoxantron und Natalizumab nur zur Eskalationstherapie bei besonders aggressiven Formen der schubförmig verlaufenden MS eingesetzt.

Mitoxantrone rufen über die Interkalierung mit der DNA Quervernetzungen sowie Doppelstrangbrüche hervor. Dadurch werden zum Einen T-Zellen, B-Zellen und Makrophagen in ihrer Proliferation gehemmt, zum Anderen werden die Antigenpräsentation wie auch die Sekretion proinflammatorischer Zytokine beeinflusst. Dabei tritt die zytotoxische Wirkung sowohl bei ruhenden als auch bei sich teilenden Zellen auf und ist somit vom Zellzyklus unabhängig. Neben der Knochenmarkstoxizität wurden zudem Fälle von toxischer Kardiomyopathie berichtet (Fox 2004).

Natalizumab ist ein monoklonaler Antikörper gegen das VLA-4-Adhäsionsmolekül auf T-Zellen, welcher die Bindung zum VCAM auf Endothelzellen behindert und damit die Penetration der Blut-Hirn-Schranke durch Lymphozyten limitiert. Während Phase-III-Studien an Patienten kam es jedoch zu Fällen von Progressiver Multifokaler Leukoenzephalopathie (PML), die durch die Reaktivierung bzw. Neuinfektion von Oligodendrozyten mit dem JC-Virus hervorgerufen wird.

Neue Therapieoptionen beziehen sich vorwiegend auf zellspezifische Angriffsmechanismen. Neben Fingolimod (FTY720), welches als Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptorblocker fungiert und die Lymphozytenmigration ins ZNS herabsetzt (Khatri et al. 2011), werden auch Daclizumab (Antikörper gegen IL-2-Rezeptorkette (CD25), verhindert Expansion und Reifung aktivierter T-Zellen) sowie Alemtuzumab (Campath-1-monoklonaler Antikörper gegen CD52-Oberflächenmoleküle auf Lymphozyten und Monozyten, welcher zu einer generellen Lymphopenie führt) erprobt.

Das Zytostatikum Cladribin, ein chloriertes Purin-Nukleosid-Analogon, wie auch HMG-CoA-

Reduktasehemmer, sog. Statine, zeigten in ersten Studien Erfolge.

1.3 Multiple Sklerose im Tiermodell

Der Gedanke, die Komplexität der Pathogenese und die vielfältigen Ausprägungen klinischer Krankheitszeichen der Multiplen Sklerose besser verstehen und erforschen zu können, reicht bis ins 19. Jahrhundert zurück. Pasteurs Versuche zur Entwicklung einer Impfung gegen das Tollwutvirus lieferten 1885 den Anfang für die Entstehung des Konzeptes über die Triggerung einer autoreaktiven Immunreaktion in der Peripherie, welche sich bis in das Zentrale Nervensystem fortsetzt. Nachdem es in den folgenden Jahren zu vermehrten Fällen von sporadischen Lähmungserscheinungen bei Patienten nach Tollwutimpfung gekommen war, lieferten immer neu hinzukommende Fälle den Anstoß zu umfassenderen Forschungen (Baxter 2007). Schweinburg sowie Stuart und Krikorian sahen in ihren Versuchen, dass die wiederholte Inokulation von menschlichem Rückenmark oder Schafsgehirnen in Ratten eine Art Paralyse hervorrief. In Versuchen an Rhesusaffen, welche Injektionen mit Suspensionen von Rattengehirnpartikeln erhalten hatten, konnte Rivers histologisch perivaskuläre Infiltrate sowie Zeichen von Demyelinisierung nachweisen (Rivers et al. 1933). Paterson zeigte, dass durch die Übertragung von Lymphknotenzellen aus Tieren, welche zuvor mit Rückenmarkspartikeln immunisiert worden waren, in naiven Tieren eine Enzephalomyelitis ausgelöst werden konnte, was in der Folge als passive Induktion bezeichnet wurde (Paterson 1960).

Die Assoziation zwischen ZNS-spezifischen Antikörpern und der resultierenden Pathologie ließ vermuten, dass die Demyelinisierung auf eine spezifische Immunreaktion zurückzuführen sei. Durch die 1942 von Freund eingeführte Emulsion mit *Mycobacterium tuberculosis* und Paraffinöl war es nun möglich, die als Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis (EAE) bezeichnete Erkrankung in Tieren hervorzurufen (Freund et al. 1947); sie wurde erstmals 1949 von Olitsky gezielt in Mäusen induziert (Olitsky and Yager 1949). Seit diesen ersten Versuchen wurde die EAE in einer weiten Bandbreite an Tieren, u. a. Meerschweinchen, Ratten, Ziegen, Mäusen, Kaninchen, Hamstern, Hunden, Schafen, Seidenaffen und Hühnern, ausgelöst (Gold et al. 2006). Obwohl mittlerweile mehrere verschiedene Modelle von demyelinisierenden Erkrankungen im ZNS existieren, gilt die EAE nicht nur als das am häufigsten verwendete Tiermodell der MS (Ercolini and Miller 2006; Zamvil and Steinman 1990), sondern zudem als das als erstes identifizierte und am besten charakterisierte Tiermodell bei Autoimmunerkrankungen im Menschen (Steinman and Zamvil 2006a).

1.3.1 Experimentelle Autoimmunenzephalomyelitis

In den vergangenen Jahren wurden Protokolle zur EAE-Induzierung immer weiter präzisiert. Durch die zusätzliche Applikation des Toxins des *Bordetella-pertussis*-Bakteriums konnte eine weitere Verbesserung in der Effizienz zur EAE-Induktion erreicht werden (Levine and Sowinski 1973). Die Identifizierung spezifischer enzephalitogener Myelinantigene, wie des Myelin-Basischen-Proteins (MBP), Myelin-oligodendrozytischen-Proteins (MOG) und Proteolipidischen-Proteins (PLP), führte dazu, dass diese heute in gereinigter rekombinanter sowie synthetischer Form zur Induktion aktiver EAEs angewendet werden können (Stromnes and Goverman 2006a). Zusätzliche Untersuchungen zeigten, dass durch die Übertragung spezieller MHC-II-spezifischer T-Zellen eine passive EAE ausgelöst werden kann (Zamvil et al. 1985). Das Prinzip der aktiven und passiven EAE-Induktion beruht im Wesentlichen auf der Aktivierung der in der Peripherie zirkulierenden myelinspezifischen CD4⁺-T-Zellen, welche der positiven Selektion des Immunsystems entkommen sind. Werden diese Zellen aktiviert, penetrieren sie die Blut-Hirn-Schranke und werden dort durch antigenpräsentierende Zellen über den MHC-II-Komplex sowie über kostimulatorische Moleküle aktiviert (McMahon et al. 2005; Tompkins et al. 2002). Nach Aktivierung dieser myelinspezifischen CD4⁺-T-Zellen läuft eine Vielzahl unterschiedlicher Ereignisse parallel ab, welche in der Beschädigung von Hirngewebe mündet.

Mittlerweile gibt es eine breite Variation an Protokollen darüber, wie sowohl aktive als auch passive EAEs induziert werden können (Stromnes and Goverman 2006a, b; Furlan et al. 2009). Pathologie, Ablauf der Erkrankungsphase und die klinische Ausprägung der Demyelinisierung bzw. der Krankheitszeichen hängen dabei von der Strategie der Induzierung, dem genetischen Hintergrund der jeweiligen Spezies und Zucht sowie von den Eigenschaften des verwendeten Immunogens ab. Während die klassischen Zeichen der akuten EAE vorwiegend perivaskuläre Infiltration von CD4⁺- und CD8⁺-T-Lymphozyten sowie Makrophagen im Rückenmark der Tiere beinhalten, zeigen atypische EAE-Modelle eine erhöhte Inflammation im Gehirn der Tiere (Furlan et al. 2009; Stromnes and Goverman 2006a).

Neben der unterschiedlichen histologischen Ausprägung zeigen Tiere mit atypischer EAE vermehrte Zeichen von Kleinhirnbeeinträchtigung, wie propriozeptive Einschränkungen, Hypersensitivität, Spastizität und Ataxie. Abhängig vom verwendeten Antigen, der Spezies und dem Applikationsschema können somit verschiedene Verlaufsformen simuliert werden, welche in vergleichbarer Weise in der MS auftreten. Zudem können in der EAE Zeichen der

inflammatorischen Infiltrate, bestehend aus T-Zellen, B-Zellen und Makrophagen, sowie fokale demyelinisierende Plaques im ZNS nachgewiesen werden, welche für neurologische Defizite verantwortlich sind und auch in der MS detektiert werden können. Somit bietet die Anwendung des EAE-Modells die Möglichkeit, die Mechanismen, die zur autoimmun gesteuerten Inflammation, Demyelinisierung sowie axonalen Schädigung im ZNS führen, genauer zu untersuchen und therapeutische Ansätze sowie Behandlungsstrategien abzuleiten. So konnten in der Vergangenheit drei in der EAE untersuchte Medikamente erfolgreich in die klinische Behandlung von MS-Patienten eingeführt werden: Glatirameracetat, Mitoxantron und Natalizumab (Steinman and Zamvil 2006a).

1.3.2 Das CD11c-DTR-GFP-Mausmodell

Um den Einfluss dendritischer Zellen auf den Krankheitsverlauf während der EAE studieren zu können, wurde das von Jung et al. entwickelte transgene Mausmodell ((B6.FVB-Tg(Itgax-DTR/EGFP)57Lan/J)) verwendet, welches die bedingte Depletion dendritischer Zellen nach Diphtherietoxin (DTx)-Anwendung erlaubt (Jung et al. 2002). Das Diphtherietoxin ist eines der am besten erforschten bakteriellen Exotoxine (Holmes 2000) und wurde von Saito et al. durch die Generierung DT-Rezeptor-transgener Mäuse im Jahr 2001 zur gezielten Depletion von Hepatozyten verwendet (Saito et al. 2001). Das Diphtherietoxin wird vom *Corynebacterium diphtheriae* als sog. Exotoxin produziert und hemmt in eukaryoten Zellen durch Blockierung der Translation während der Elongationsphase die Proteinbiosynthese. Es besteht aus den Untereinheiten A (DT-A) und B (DT-B), welche über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind (Greenfield et al. 1983). Das DTx wird durch Rezeptor-vermittelte Endozytose in die Zelle transportiert. Dabei bindet DT-B mit dem zellulären Diphtherietoxin-Rezeptor (DTR), einem Heparin-bindenden epidermalen Wachstumsfaktor (EGF) ähnlichen Wachstumsfaktor (hbEGF) (Naglich et al. 1992). Während der späten Phase der Endozytose bewirkt das saure Milieu des Endosoms die Entlassung der DT-A-Untereinheit ins Zytosol (Sandvig and Olsnes 1980), wo es die ADP-Ribosylierung des Elongationsfaktors 2 katalysiert, was in der Inhibition der Proteinbiosynthese mündet (Honjo et al. 1968). Die Hemmung der Proteinbiosynthese führt dazu, dass sowohl mitotisch als auch entdifferenzierte Zellen den programmierten Zelltod (Apoptose) initiieren (Miyake et al. 2007). Apoptotische Zellen induzieren keine proinflammatorische Immunreaktion, so dass die durch DTx ausgelöste Depletion der Zellen das *Steady State* des Immunsystems nicht beeinträchtigen (Bennett et al. 2005). Dabei reicht ein einziges Molekül der Untereinheit A im Zytoplasma aus, um eine eukaryote Zelle zu zerstören

(Yamaizumi et al. 1978). Die Resistenz muriner Zellen gegenüber dem DTx im Kontrast zu humanen Zellen ist durch die schwächere Affinität des Nager-hbEGF gegenüber dem DTx zu begründen, welche bei Nagern 10^5 -mal geringer ist. Diese weisen einen Unterschied in der Abfolge der Aminosäuren in der extrazellulären Region des DTR auf, welcher die DT-B bindet (Pappenheimer et al. 1982). Das von Jung entwickelte transgene Mausmodell beruht auf einem vom Affen stammenden transgenkodierenden DTR-GFP (grünes fluoreszierendes Protein)-Fusionsprotein, welches unter der Kontrolle des murinen CD11c-Promoters steht (Brocker et al. 1997).



Abb. 2: CD11c-Promoter sowie das transgenkodierende DTR-GFP-Fusionsprotein (Jung et al. 2002)

Diese Fusion führt zu einer Kopplung der Genexpression des CD11c-Oberflächenmoleküles und dem DTR-GFP. Durch diese Kopplung wird nun sowohl der Diphtherietoxin-Rezeptor als auch das GFP-Molekül bei Expression des CD11c-Oberflächenmoleküls exprimiert.

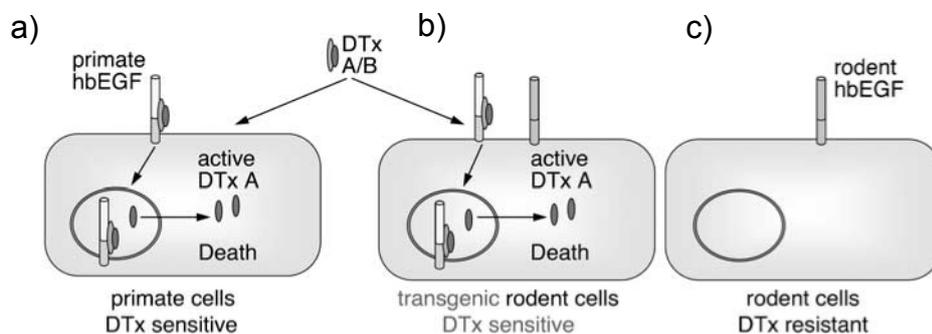


Abb. 3: Darstellung der unterschiedlichen DTx-Sensibilität in Abhängigkeit vom Rezeptor der Zelle (Sapoznikov and Jung 2008)

- a) normale Primatenzelle mit hbEGF-Rezeptor, der die Sensitivität der Zellen gegenüber DTx hervorruft
- b) durch Gentransfer veränderte murine Zelle, welche durch transgenen DTR bei DT-Applikation die Apoptose initiiert
- c) hbEGF-Rezeptor einer unveränderten murinen Zelle, welche durch Abwesenheit/Fehlen hochaffiner DTR eine natürliche Resistenz gegenüber dem DTx aufweist

Die Toxizität des DTx ist somit genauestens auf die Rezeptor-vermittelte Endozytose limitiert, so dass eine zellspezifische Depletion der Zellen ermöglicht wird, die den transgenen DTR tragen und bei DTx-Applikation in die Apoptose übergehen. Ausgenommen die $CD11c^{negative-low}$ -epidermalen Langerhanszellen, welche die Hochregulierung erst bei der Reifung durchführen,

exprimieren alle murinen Untergruppen dendritischer Zellen das CD11c-Molekül (Jung et al. 2002). FACS- und Immunhistochemische-Analysen zeigen EGFP-Expression und DTx-abhängige Depletion CD11c^{high}-dendritischer Zellen in Milz, Lymphknoten, Lunge, Leber und in der *Lamina propria* sowie in speziellen Makrophagenpopulationen der Alveolen, metallophilen Makrophagen und Marginalzonenmakrophagen der Milz (Jung et al. 2002; Probst et al. 2005; van Rijt et al. 2005; Bar-On and Jung 2010). Die murine CD11c-Expression ist dabei weitestgehend auf dendritische Zellen begrenzt, kommt jedoch auch auf aktivierten intraepithelialen Lymphozyten und auf CD8⁺-T-Lymphozyten vor (Huleatt and Lefrançois 1995). Durch die Verwendung der Durchflusszytometrie auf die Zellpopulationen verschiedener Organsysteme kann die gewünschte Wirkung der DTx-Applikation sichergestellt und überprüft werden, um die Möglichkeit von Falschaussagen zu verhindern.

Tab. 1: Toxinsensitivität mononuklearer Phagozyten in CD11c-DTR-Mäusen (modifiziert nach Bar-On and Jung 2010)

Organ	DTx-sensitiv	DTx-resistent
Milz	Konventionelle/ klassische DZ (cDZ) (inkl. CD4 ⁺ -, CD8 ⁺ - und doppelt-negative-cDZ) Metallophile Makrophagen und Marginalzonen Makrophagen	Plasmazytoide DZ (pDZ) zu 80 % aus Monozyten entstandene CD11c ^{int} -DC, Makropagen der roten Pulpa
Knochenmark	F4/80 ⁺ -Knochenmark-DZ	Perivaskuläre Makrophagen
Lunge	CD11c ⁺ CD11b ⁺ -DZ, CD11c ⁺ -alveolare Makrophagen	
Intestinale <i>Lamina propria</i>	CD11c ^{high} CD11b ⁺ -DZ CD11c ^{high} CD11b ⁻ -DZ	CD11c ⁻ CD11b ⁺ -Makrophagen
Haut		Langerhans-Zellen

Jung et al. beschrieben, dass die durch die DTx-induzierte Depletion dendritischer Zellen zwei Tage anhielt, bevor sich das DZ-Kompartiment wieder regenerierte (Jung et al. 2002). Ähnliches legte Probst dar, der ansteigende DZ-Zahlen erneut nach 42 Stunden detektieren konnte (Probst et al. 2005). Nach 66 Stunden war die Zellzahl wieder vergleichbar mit der von nicht depletierten Tieren. Während eine einmalige DTx-Applikation keine pathologischen Symptome hervorruft, bewirkt die wiederholte DTx-Applikation ein Sterben der DTR-transgenen Mäuse. Dies ist vermutlich auf die Expression des DTR auf nicht hämatogenen, strahlenresistenten Zellen zurückzuführen, da gezeigt werden konnte, dass diese transgenen Mäuse auch nach Wildtyp-Knochenmarktransfer bei wiederholter DTx-Injektion starben (Probst et al. 2005; Zaft

et al. 2005). Durch die beschriebene Generierung von CD11c-DTR-Chimären, bei denen die CD11c-DTR-Expression auf hämatopoetische Zellen limitiert ist, können dendritische Zellen nun sowohl kontinuierlich als auch zeitspezifisch depletiert werden (vgl. 2.3.4.1). Die in den verschiedenen Fachzeitschriften publizierten Diphtherietoxinkonzentrationen reichten im Durchschnitt von 4 ng pro Gramm Körpergewicht der Mäuse bis zu 250 ng pro Maus (entspricht 12,5 ng/g Körpergewicht).

1.4 Ziel der Arbeit

Während zum gegenwärtigen Zeitpunkt umfangreiche Informationen darüber vorliegen, welche Autoimmunreaktionen im Endstadium der nervalen Destruktion bei der Multiplen Sklerose initiiert werden, sind die vorausgehenden Mechanismen, welche zur Entstehung und zum Ausbruch dieser Erkrankung führen, weiterhin ungenügend geklärt.

Dabei bietet eine intensivere Erforschung dendritischer Zellen, welche eine herausragende Bedeutung in der Initiierung wie auch in der Aufrechterhaltung der Immunantwort aufweisen, nicht nur eine wichtige Grundlage beim Verständnis der Autoimmunerkrankung, sie könnte zudem zukünftige Therapiemöglichkeiten maßgeblich beeinflussen. Derzeit gibt es wichtige Anhaltspunkte, welche die Rolle der DZ in der MS beschreiben. Sowohl im Blut als auch in der Rückenmarksflüssigkeit von MS-Patienten konnten bisher erhöhte Werte an dendritischen Zellen detektiert werden (Huang et al. 1999; Pashenkov et al. 2001). Genauere Überprüfungen im Tiermodell offenbarten zudem einen Zusammenhang zwischen der Gegenwart und Aktivität dendritischer Zellen sowohl mit dem Schweregrad der EAE (Greter et al. 2005; Zozulya et al. 2009) als auch der Anzahl an MS-Plaques im Menschen (Serafini et al. 2006). Dabei wird deutlich, dass nicht nur die unterschiedlichen Aktivitätszustände und „Reifegrade“ der Zellen eine wichtige Rolle spielen, sondern zudem der zeitliche Abschnitt, in welchem sich die Immunantwort befindet, entscheidenden Einfluss auf die Funktion der DZ ausübt.

Die Verwendung sog. *Knockout*-Tiere ermöglichte in den hier aufgeführten Versuchen eine zeitlich gezielte, zellspezifische Depletion verschiedener DZ-Subpopulationen und daraus folgend eine Einordnung der sich abzeichnenden unterschiedlichen Funktionen.

Ziel dieser Arbeit war es, sowohl den Effekt einer spezifischen, konditionellen Depletion dendritischer Zellen in einzelnen Phasen der EAE genauer zu untersuchen, um so Rückschlüsse auf die unterschiedlichen Funktionen der Zellen während der Krankheitsphasen gewinnen zu

können, als auch die notwendigen Faktoren der effizienten Kostimulation in der Interaktion zwischen DZ und T-Zellen zu identifizieren.

Die zentrale Arbeitshypothese dieser Arbeit basiert dabei auf der Annahme, dass – in Abhängigkeit zur jeweiligen Phase der Immunantwort – dendritische Zellen über die variable Modulierung der T-Zell-Interaktion den Differenzierungsweg naiver T-Zellen beeinflussen und somit wesentlichen Einfluss auf den Verlauf der Immunreaktion nehmen.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Laborartikel

2.1.1 Puffer und Lösungen

PBS		PAA Laboratories, Pasching, Österreich
FACS-Puffer	PBS 0,5 % bovines Serumalbumin (BSA)	Serva, Heidelberg
Saponin-Puffer	PBS 0,5 % BSA 0,5 % Saponin	Roth, Karlsruhe
MACS-Puffer	PBS 0,5 % BSA 2 mM EDTA (Ethylendiamintetraacetat)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Mausmedium	RPMI 1640 1 % HEPES 1M 10 % fetales Kälberserum (FCS) hitzeinaktiviert für 30 Minuten bei 56 °C 10.000 U Penicillin 10 mg/ml Streptomycin 2 mM L-Glutamin	Gibco Invitrogen, Karlsruhe Gibco Invitrogen, Karlsruhe Biochrom, Berlin Sigma-Aldrich, Steinheim Sigma-Aldrich, Steinheim Sigma-Aldrich, Steinheim
Waschmedium	RPMI 1640 1 % HEPES 1M 5 % FCS 100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin	
Iscove's Mod Dulbecco's Medium (IMDM)	2 mM L-Glutamin 25 mM HEPES	
Lysis-Puffer	PBS 1 % KHCO ₃ 8,29 % NH ₄ Cl 37,2 % Na ₂ EDTA	Merck, Darmstadt Roth, Karlsruhe
Paraformaldehyd (PFA)	4 %, 0,1 M PBS, pH 7,2 – 7,4	Roth, Karlsruhe

2.1.2 Peptide

MOG ₃₅₋₅₀ MEVGWYRSPFSRVVHLYRNGK	Pepceuticals, Nottingham, UK
OVA ₃₂₃₋₃₃₉ ISQAVHAAHAEINEAGR	Pepceuticals, Leicester, UK

2.1.3 Zytokine

Name		Konzentration	Herkunft
TGF-β	human, recombinant	2 µg	R & D Systems, Wiesbaden
IL-2	human, recombinant	100.000 U/l	Chiron Therapeutics, Hayward, USA
IL-6	murin, recombinant	5 µg	R & D Systems, Wiesbaden
IL-12	murin, recombinant	10 µg/ml	R & D Systems, Wiesbaden
IL-23	murin, recombinant	10 µg	R & D Systems, Wiesbaden

2.1.4 Antikörper und Sekundärfarbstoffe

Murine FACS Oberflächenantikörper

Name	Klon	Konzentration	Herkunft
α-m-CD4-Biotin	/	100 µg/ml	Caltag/Invitrogen, Karlsruhe
α-m-CD4-FITC	RM4-5	0.5 mg/ml	BD Bioscience, Heidelberg
α-m-CD4 AF 647	/	100 µg/ml	Caltag/Invitrogen, Karlsruhe
α-m-CD4 AF 700	RM4-5	0.2 mg/ml	BD Bioscience, Heidelberg

Material und Methoden

α -m-CD11b APC	/	100 μ g/ 0.5 ml	Caltag/Invitrogen, Karlsruhe
α -m-CD11c Biotin	HL3	0.5 mg/ml	BD Bioscience, Heidelberg
α -m-CD25 APC	PC61	1 mg/ml	BD Bioscience, Heidelberg
α -m-CD25 Biotin	eBio7D4	50 μ g/ml	eBioscience, San Diego, USA
α -m-Iab PE	11-5.2	0.2 mg/ml	BD Bioscience, Heidelberg

MACS Antikörper (magnetische Mikropartikel)

Name	Herkunft
α -m-CD90.2 MB	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
α -m-CD62L MB	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
CD4 ⁺ -T-Zell-Isolationskit	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach

Murine FACS Intrazellulärantikörper

Name	Klon	Konzentration	Herkunft
α -m-Fc γ III/II Rezeptor (CD16/CD32)	2.4G2	5 μ g/ml	BD Bioscience, Heidelberg
α -m-FoxP3	Fjc-16a	0,2 mg/ml	eBioscience, San Diego, USA
α -m-IL10-PE	JES5-16E3	2 μ g/ml	BD Bioscience, Heidelberg
α -m-IL10-APC	JES5-16E3	2 μ g/ml	BD Bioscience, Heidelberg
α -m-IL17-PE	TC11-18H10.1	1 μ g/ml	BD Bioscience, Heidelberg
α -m-INF γ -FITC	XMG1.2	5 μ g/ml	eBioscience, San Diego, USA
α -m-INF γ -PE	XMG1.2	2 μ g/ml	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
PI	/	0,25 μ g/ml	BD Bioscience, Heidelberg
α -m-TNF α -APC	MP6-XT22	2 μ g/ml	BD Bioscience, Heidelberg
Anti-Maus CD3	SK7	0,5 mg/ml	BD Bioscience, Heidelberg
Anti-Maus CD28	37-51	0,5 mg/ml	BD Bioscience, Heidelberg
α -m-Perforin APC	eBioMAK-D	2 μ g/ml	eBioscience, San Diego, USA

Sekundärantikörper

Name	Klon	Konzentration	Herkunft
SA-APC	/	1 μ g/ml	BD Bioscience, Heidelberg
SA-PE	/	1 μ g/ml	BD Bioscience, Heidelberg
SA-PerCP	/	1 μ g/ml	BD Bioscience, Heidelberg

2.1.5 Sonstige Reagenzien und Chemikalien

Agarose	Merck, Darmstadt
<i>Aqua ad injectabilia</i> (Wasser für Injektionszwecke)	Braun, Melsungen
<i>Aqua bidestillata</i> (2-fach destilliertes Wasser)	Braun, Melsungen
Brefeldin A	Sigma-Aldrich, Steinheim
Complete Freund's Adjuvants (CFA)	Difco, Detroit, USA
DMSO	Sigma-Aldrich, Steinheim
DNAse	Sigma-Aldrich, Steinheim
DTx	List Biological Lab., Inc., California, USA
Enrofloxacin (Baytril®)	Beyer, Leverkusen
Ethanol (70 % zu Desinfektionszwecken)	Merck, Darmstadt
Glucose (in verschied. Konz.)	Braun, Melsungen
Ionomycin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Isofluran	Abbot, Wiesbaden
Ketamin	Curamed, Karlsruhe
„Killernarkose“ (Rompun 2 % 250 μ l, Ketamin 50 mg/ml 5 ml, NaCl 0,9 % 25 ml)	
Kollagenase	Roche, Grenzach-Wyhlen
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Ra	Difco Laboratories, Detroit, USA
NaCl 0,9 %	Braun, Melsungen
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Percoll	Sigma-Aldrich, Steinheim
Pertussistoxin (PTx)	List Biological Laboratories, Campell, USA
Phorbol-Myristat-Acetat (PMA)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Saccharose	Merck, Darmstadt
Trypanblau (0,4 %)	Biochrom, Berlin
Xylazine (Rompun® 2 %)	Bayer AG, Leverkusen

2.1.6 Sonstige Materialien

Chirurgiebesteck	Aesculap, Tuttlingen
Einfriermedium „ <i>Tissue-Tek O.C.T Compound</i> “	Sakura Finetek Europe, Zoeterwoude, Niederland
Eindecklösung „ <i>Neo-Mount</i> “	VWR Int. GmbH, Darmstadt
Zentrifugenröhrchen „ <i>Falcon tubes</i> “ 15 und 50 ml	Becton Dickinson, Tuttlingen
Kanülen, Spritzen	Braun, Melsungen
Einfrierröhrchen „ <i>Kryo tubes</i> “	Nunc, Roskilde, Dänemark
MACS Separationssäulen, Magneten und Ständer	Miltenyi Biotech GmbH, Bergisch Gladbach
Objektträger Superfrost Plus	Menzel GmbH & Co KG, Braunschweig
24, 48 und 96 Lochplatten, Petrischalen	Becton Dickinson, Heidelberg
Pipettenspitzen	Biozym, Hessisch Oldendorf
Reaktionsgefäße „ <i>safe lock tubes</i> “	Eppendorf AG, Hamburg
Xylol „ <i>Neo-Clear</i> “	VWR International GmbH, Darmstadt
Zellsieb (70 µm und 100 µm Porengröße)	BD Bioscience, Heidelberg

2.1.7 Geräte

Durchflusszytometer BD FACS Canto II	BD Bioscience, Heidelberg
Eppendorf Zentrifuge 5416 und 5417R	Eppendorf AG, Hamburg
Inkubatoren	Binder GmbH, Tuttlingen
Lichtmikroskop	Leica, Heidelberg
Forschungsmikroskop BX51	Olympus, Hamburg
Megafuge 1S-R	Heraeus Kendro, Langenselbold
Neubauerzählkammer	Brand, Wertheim
Pipetten	Eppendorf AG, Hamburg
Pipettierhilfe Pipetus	Hirschmann Laborgeräte, Herrenberg
Schnellschnitt-Kryostat „ <i>CM1900</i> “	Leica Microsystems GmbH, Nussloch
Sterilbank, BDK	BDK Sonnenbühl-Genkingen
Stickstofftank	Messer, Sulzbach
Waage (für Chemikalien)	Mettler, Gießen
Wasserbad	Medingen, Wiesloch
Zahnradpumpe „ <i>BVP-Z</i> “	ISMATEC Laboratoriumstechnik GmbH, Wertheim-Mondfeld

2.1.8 Verwendete Software

FACSDiva(TM) Version 6.1.2	BD Bioscience, Heidelberg
FlowJo 9.0	Tree Star Inc., USA
MagnaFire	Olympus, Hamburg
Graphpad Prism 5	Graphpad Software Inc., USA
SPSS Statistics	SPSS, Chicago, USA
Word, Excel 2007	Microsoft, Unterschleißheim

2.2 Tiermodell

Alle durchgeführten Versuche wurden unter der Genehmigungsnummer für Tierversuche G0029/08 und G0090/09 durchgeführt und unterlagen den Rahmenbedingungen der tierschutzrechtlichen Bestimmungen des Landes Berlin. Die Tiere der verschiedenen Tiermodelle wurden unter pathogenfreien Bedingungen in speziellen klimatisierten Tierhaltungen mit einem 12:12-Hell-Dunkel-Rhythmus gehalten. Diese Tierhaltung unterliegt den üblichen Standardbedingungen (individuell belüftete Makrolonkäfige, pelletiertes Mausfutter, Einstreu und Wasser) des Neurowissenschaftlichen Forschungszentrums an der Charité zu Berlin und wird dort von geprüften Versuchstierpflegern betreut.

2.2.1 C57BL/6

Die Tiere des Mausstammes C57BL/6 wurden von Charles River Sulzfeld in Deutschland bezogen und dienen im Standard-Tiermodell immunologischen Fragestellungen. Durch die Übertragung enzephalitogener T-Zellen (passiv) oder durch die Injektion von Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein (MOG₃₅₋₅₅-Peptid MEVGWYRSPFSRVVHLYRNGK) in Lösung mit Mykobakterien und Freundschem Adjuvant (Wasser-in-Öl-Emulsion) subkutan an der Schwanzbasis der Tiere (aktiv) mit anschließender intraperitonealer Injektion von Pertussistoxin zum Zeitpunkt der Immunisierung und 48 Stunden später lässt sich eine experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis im ZNS der Tiere hervorrufen. Das MOG₃₅₋₅₅-Peptid ist ein transmembranes Glykoprotein der Ig-Superfamilie und wird überwiegend auf der Oberfläche der Oligodendrozytenmembran exprimiert. MOG-induzierte EAEs rufen in C57BL/6-Mäusen einen chronisch nicht remittierenden EAE-Verlauf hervor (Mendel et al. 1995a).

2.2.2 2d2 (C57BL/6-Tg(Tcra2D2,Tcrb2D2)1Kuch/J)

Die Tiere des 2d2-Mausstammes (Erstbeschreibung durch Bettelli (C57BL/6-Tg(Tcra2D2,Tcrb2D2)1Kuch/J) mit C57BL/6-Mausstamm-Hintergrund besitzen spezifisch für das MOG₃₅₋₅₅-Peptid transgene T-Zell-Rezeptoren (TZR), welche durch die Valpha3.2- und Vbeta11-Expression definiert sind (Bettelli et al. 2003). Die MOG-spezifischen transgenen T-Zellen werden nicht ausselektiert und sind funktionell kompetent. Die Mehrzahl der Mäuse mit 2d2-TZR-Thymozyten exprimieren mittlere bis hohe Werte des transgenen T-Zell-Rezeptors, was auf eine effiziente positive Selektion der transgenen T-Zellen hinweist. Die Mehrheit der CD4⁺-Splenozyten exprimieren den transgenen TZR. Kultivierte Splenozyten erkennen und reagieren auf das gesamte MOG und die spezielle Sequenz MOG₃₅₋₅₅, jedoch nicht auf das Ovalbumin (OVA). Standard-EAE-Induzierungsprotokolle bewirken eine typische EAE in 2d2-TZR-Mäusen und bieten damit die Möglichkeit, die Rolle der MOG-spezifischen, autoreaktiven T-Zellen in der EAE zu betrachten.

2.2.3 CD11c-DTR

Dieses Mausmodell (Erstbeschreibung durch Jung) ist bei immunologischen Fragestellungen hinsichtlich der Funktion dendritischer Zellen von besonderer Bedeutung (Jung et al. 2002). Die CD11cDTR-GFP-Maus (B6.FVB-Tg(Itgax-DTR/EGFP)57Lan/J) ist ein Maus-Modell, das von Jung et al. entwickelt wurde, um den Effekt einer systematischen Depletion dendritischer Zellen zu untersuchen (vgl. 1.3.2).

2.3 Zellbiologische Methodik

2.3.1 Prinzipien

Grundsätzlich wurde das Arbeiten mit Zellen unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Oberflächen und Materialien, welche mit Zellen in Kontakt kamen, wurden zuvor desinfiziert; Präparationsbestecke wurden zudem abgekocht und anschließend in 70 % Ethanol gelagert. Um annähernd keimfreie Bedingungen herzustellen, wurden im Umgang mit Zellen Sterilbänke verwendet, welche einem regelmäßigen Reinigungszyklus unterlagen (Desinfektion, UV-Licht-Bestrahlung). Zellen, welche außerdem über einen bestimmten Zeitraum in Inkubation gehalten wurden, unterlagen konstanten Bedingungen (37 °C, 95 % Luftfeuchte und einer CO₂-Konzentration von 5 %).

2.3.2 Magnetische Zellsortierung

Die magnetische Zellsortierung (*magnetic activated cell sorting*, MACS) der Firma Miltenyi Biotech beruht im Allgemeinen auf der spezifischen Antikörper-Antigen-Bindung (Miltenyi et al. 1990). Hierzu werden kleine magnetische Partikel an einen bestimmten Antikörpertyp gekoppelt, welcher Antigenstrukturen auf den Oberflächen der Zielzellen erkennt. Somit gehen magnetisch markierte Antikörper nur Bindungen mit den Zellen ein, welche die erforderlichen Oberflächenstrukturen bzw. die entsprechenden Antigene aufweisen. Wird nun die Zelllösung mit unmarkierten und markierten Zellen über eine Säule gegeben, die einem starken Magnetfeld ausgesetzt ist, verbleiben nur die magnetisch markierten Zellen in dieser Säule, während ungebundene Zellen die Säule ungehindert passieren. Sobald dieser Säule das magnetische Feld entzogen wird, kann die Fraktion der Zellen, die den Antikörper gebunden hat, separat gewonnen werden.

2.3.3 Durchflusszytometrie

2.3.3.1 Prinzip

Die Durchflusszytometrie (*fluorescence activated cell sorting*, FACS) bietet die Möglichkeit, anhand der Ermittlung der von Laserstrahlen hervorgerufenen Absorption und Reflexion Informationen über Zellart, Expression von Oberflächenmolekülen sowie deren intrazelluläre Zytokinexpression zu gewinnen. Dabei wird eine Zellsuspension durch eine Kapillare gesaugt, so dass einzelne Zellen perlschnurartig nacheinander gereiht im Sensormodul des Durchflusszytometers einen Laserstrahl passieren. Aufgrund ihrer heterogenen Struktur verursachen Zellen unterschiedliche Streuungen des Lichtes, anhand derer man auf die Größe

bzw. das Volumen der Zellen sowie auf ihre Granularität schließen kann. Diese hängt neben der Größe und Struktur des Zellkerns auch von der Menge der intrazellulär gelagerten Vesikel ab. Gleichzeitig bietet die Durchflusszytometrie die Möglichkeit, Oberflächenmoleküle (z. B. Moleküle der CD-Klassifizierung) sowie intrazellulär vorliegende Zytokine oder Proteine zu markieren. Die darzustellenden Strukturen werden entweder direkt oder indirekt durch fluoreszierende Antikörper markiert, welche durch ihre Lichtemission detektiert werden können. Die Intensität des emittierenden Lichtes ist dabei proportional zur Menge der angeregten Fluorochrommoleküle und damit proportional zur Expression der durch die Fluorochrome markierten zellulären Moleküle. Durch die Verwendung von Filtern und verschiedenfarbigen Lasern können die Emissionsbereiche der verwendeten Fluorochrome unterschieden werden, so dass mehrere Fluorochrome mit unterschiedlichen Wellenlängenabsorptionsmaxima verwendet werden können.

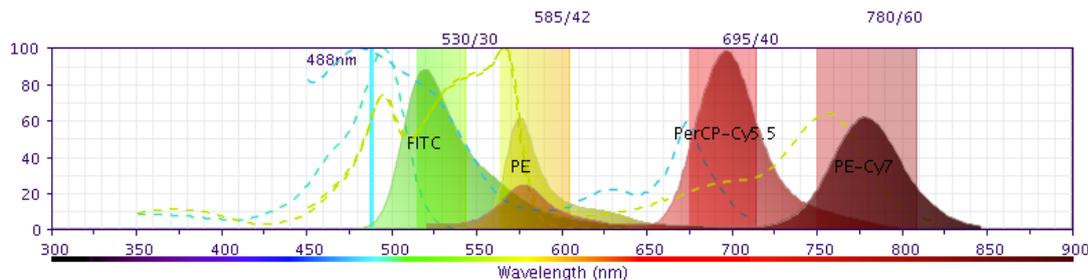


Abb. 4: Mögliche Fluorochrome der Firma BD mit ihren zugehörigen Absorptionsmaxima (*BD Fluorescence Spectrum Viewer*)

2.3.3.2 Oberflächenfärbung

Für die Oberflächenfärbung wurde eine Zellzahl von $1 - 3 \times 10^6$ Zellen in ein 2-ml-Eppendorfgefäß überführt, das verbleibende Restvolumen mit FACS-Puffer aufgefüllt und für fünf Minuten bei 550 g und 4 °C zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen, das Zellpellet am Boden des Reaktionsgefäßes in 50 µl FACS-Puffer aufgenommen und anhand des im Folgenden dargestellten Färbeschemas die Oberflächen- sowie die Intrazellulärfärbung durchgeführt:

Das Gesamtfärbvolumen von 100 µl ergab sich aus folgenden Volumina:

1. 10 µl Zellsuspension + 50 µl FACS-Puffer + 20 µl Block (verdünnt) + 20 µl 1. Antikörper (verdünnt)
2. 10 µl Zellsuspension + 70 µl FACS-Puffer + 20 µl 2. Antikörper (verdünnt)

Abb. 5: FACS-Färbeschema

Durch Hinzugabe von 20 µl Block, bestehend aus 0,75 µg/ml α-m-Fc-Fragment, wurde sichergestellt, dass die unspezifischen Antikörper-Bindungsstellen blockiert wurden und nur zielgerichtete Bindungen erfolgten. Dieser Mix wurde dann bei 4 °C für zehn Minuten im Dunkeln inkubiert. Ohne einen erneuten Waschschrift wurden 20 µl des 1.-Antikörper-Mix hinzugegeben und wieder für zehn Minuten bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Falls die Färbung mit einem 2. Antikörper erforderlich war, wurde der Mix mit FACS-Puffer aufgefüllt, zentrifugiert, in 70 µl FACS-Puffer aufgenommen und 20 µl des Sekundärantikörpermix hinzugegeben, inkubiert und gewaschen, um dann in 300 µl Puffer aufgenommen zu werden. Bei den verwendeten Fluorophoren wurden unterschiedliche Konzentrationen verwendet, wobei vorwiegend eine 1:200- oder 1:400-Verdünnung zum Einsatz kam.

2.3.3.3 Intrazellulärfärbung

Die normale Zytokinproduktion der Zellen ist je nach Aktivierungsgrad der Zelle unterschiedlich und unter Umständen schwer zu messen. Um eine ausreichende Konzentration an intrazellulären Zytokinen zu erhalten, wurde ein Stimulus mit den Endkonzentrationen Anti CD3 3 µg/ml/Anti-CD28 2,5 µg/ml mit sterilem PBS angesetzt, auf einer 48- oder 96-Lochplatte ausplattiert und im Kühlschrank über Nacht aufbewahrt. Dieser Stimulus regt die Zellen zur Zytokinproduktion an und bewirkt somit ein erhöhtes Zytokinaufkommen im Zellinnern. Am kommenden Morgen wurden dann sowohl $2 - 3 \times 10^6$ Zellen in eine Vertiefung mit Stimulus als auch in eine Vertiefung ohne Stimulus geben und anschließend für vier Stunden inkubiert. Nach Ablauf von zwei Stunden wurde in jede Vertiefung mit Zellen 50 µl eines Brefeldin-A-Mixes hinzugegeben. Dieser enthielt 1 µl Brefeldin A, welches in 50 µl sterilem PBS verdünnt worden war. Brefeldin A blockiert den intrazellulären Transport vom Golgi-Apparat zur Zellmembran und führt so zu einer Anreicherung der sonst sezernierten Zytokine im Zellinnern. Im Anschluss an die Inkubation wurden die Zellen in 1,5-ml-Eppendorfgefäße überführt, eine Oberflächenfärbung durchgeführt und abschließend mit Paraformaldehyd (PFA) fixiert. Um die Durchlässigkeit der Zellen für die anschließende Intrazellulärfärbung zu erhalten, wurden die Zellen in Saponinlösung gewaschen, welches die Zellmembran permeabilisiert. Zur Aufrechterhaltung der Permeabilität während der weiteren Färbeschritte wurden alle folgenden Färbeschritte ebenso in Saponinpuffer durchgeführt. Um eine Bindung der Antikörper an unspezifische Antigene zu unterbinden, war eine erneute Blockierung mit 0,75 µg/ml α-m-Fc-Rezeptor notwendig. Daran anschließend wurden die gewünschten Färbeschritte identisch zur Oberflächenfärbung

durchgeführt. Die Inkubation während der Färbeschritte wurde hier jedoch für insgesamt 20 Minuten durchgeführt.

2.3.3.4 *Lebend-Tod-Färbung durch Propidiumjodid*

Zu Zwecken der Differenzierung zwischen vitalen und toten Zellen wurde die Lebend-Tod-Färbung durch Propidiumjodid durchgeführt. Im Gegensatz zu lebenden Zellen, welche eine intakte Zellmembran aufweisen, besitzen zu Grunde gegangene Zellen keine Barriere mehr gegen zum Beispiel kationische Farbstoffe wie Propidiumjodid (PI) oder Trypanblau und sind für diese durchlässig. Im Rahmen des Zellunterganges wird die Zellmembran so stark zerstört, dass PI passieren kann und an doppelsträngigen Strukturen wie DNA und rRNA bindet. Entscheidend ist hierbei die kurze Anfärbedauer, in der PI sich in toten Zellen anzureichern beginnt. So kann im Durchflusszytometer eine Differenzierung zwischen vitalen und toten Zellen erreicht werden. PI absorbiert Energie des Lichtes der Wellenlänge 488 nm des Argonlasers.

2.3.3.5 *FACS-Auswertung*

Bei der Auswertung der FACS-Daten wurde das Durchflusszytometeranalyseprogramm FlowJo der Firma Tree Star Inc. verwendet. Je nach Fragestellung wurden die Zielzellen aus dem gesamten Zellpool durch sog. *gating* anhand der Oberflächenmolekülexpression selektiert und ausgewählt betrachtet, um zum Beispiel Aussagen zum prozentualen Anteil an der Gesamtzellpopulation, der absoluten Zellzahl oder der Expressionsbreite bestimmter Moleküle innerhalb der Gruppe treffen zu können.

2.3.4 Generierung der Chimären

2.3.4.1 *CD11c-DTR-GFP*

Um langfristige Versuche an DZ-depletierten Mäusen durchführen zu können, wurden CD11c-DTR-GFP-Chimären generiert (Jung et al. 2002; Bar-On and Jung 2010). Empfängertiere mit dem C57BL/6J-Hintergrund wurden zweifach für jeweils fünf Minuten mit einer subletalen Strahlendosis von 10.50 Gray bestrahlt, um nach Ablauf von sechs bis acht Stunden Ruhezeit über einen Zelltransfer Knochenmarkzellen von entsprechenden Spendertieren (1. CD11c-DTR und 2. C57BL/6J (Wildtypkontrolle)) zu erhalten. Das hierfür verwendete Präparationsbesteck wurde für fünf Minuten im kochenden Wasser sterilisiert und in Alkohollösung während der Präparation aufbewahrt. Die Versuchstiere wurden durch zervikale Dislokation getötet, mit Ethanol desinfiziert und auf einer Unterlage fixiert. Anschließend wurde das Bauchfell durch

einen medianen Schnitt eröffnet und durch zwei weitere Schnitte – ausgehend von der Inguinalregion bis hin zur Pfote – die Haut über den Hinterbeinen freigelegt. Dabei wurde mit besonderer Sorgfalt die Penetration der Bauchhöhle vermieden, um das Risiko einer Kontamination zu minimieren. Das gesamte Fell der Beinregion von Hüfte bis Pfote wurde entfernt, der Femurkopf an der *Articulatio coxae* luxiert und durch Durchtrennung der Hüftmuskulatur aus der Hüftpfanne gelöst. Nach der gelenknahen Abtrennung der Pfoten folgte die Überführung der Hinterbeine in eine frische Petrischale unter der sterilen Arbeitsbank. Für die folgenden Schritte wurde frisch sterilisiertes Präparationsbesteck verwendet.

Die Muskulatur wurde vollständig vom Knochen entfernt und der Femur an der *Articulatio genus* von der Tibia getrennt. Die Femur- bzw. Tibiaknochen wurden für die nächsten Schritte in frische Petrischalen überführt. Die Knochenmarkshöhlen der einzelnen Knochen wurden metaphysennah eröffnet und mit PBS-Lösung aus einer 5-ml-Spritze durchspült. Dieser Schritt wurde so häufig wiederholt, bis sich die Rotfärbung des Knochenmarkraumes aufhellte und keine weiteren roten Partikel mehr ausgespült werden konnten. Die Petrischale wurde mit kaltem MACS-Puffer ausgespült, die Knochenmarkszellen resuspendiert und in ein 50-ml-Falconröhrchen überführt und zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen, das Zellpellet aufgelockert, das Falconröhrchen abermals mit 50 ml MACS-Puffer aufgefüllt, erneut zentrifugiert (im Folgenden als „waschen“ bezeichnet) und die Zellen gezählt. Hierzu wurde das Pellet je nach erwarteter Zellzahl in 10–30 ml MACS-Puffer aufgenommen, 10 µl der Zellsuspension mit 90 µl Trypanblau gemischt (im Verhältnis 1:10) und auf eine Neubauerzählkammer aufgetragen. Unter dem Lichtmikroskop konnten dann nur die lebenden Zellen, also Zellen, welche kein Trypanblau aufgenommen hatten, in 16 Feldern eines Quadrats ausgezählt werden (n).

Zur Berechnung der Gesamtzellzahl wurde die gezählte Zellzahl mit dem Verdünnungsfaktor, dem Volumen, in dem sich die Zellsuspension befand, sowie dem Kammerfaktor 10^4 multipliziert (Gesamtzahl = n x Verdünnungsfaktor x Volumen x 10^4).

Die Zellen, die während der Spülung der Knochenmarkshöhle gewonnen werden konnten, sind Teil der Entwicklungsreihen der Erythropoese, Granulopoese, Lymphopoese, Thrombozytopoese und Monozytopoese. Die Verwendung des MACS-Zellsortierungssystems der Firma Miltenyi Biotech ermöglicht dabei eine Separation der unterschiedlichen Zelltypen voneinander. In diesem Fall wurde eine CD90.2-Depletion durchgeführt, um eine sogenannte *graft-versus-host*-Krankheit (Transplantat-Wirt-Reaktion) zu unterbinden. Das Oberflächenantigen CD90.2 wird

auf Thymozyten, peripheren T-Zellen und zu geringem Teil auch auf frühen hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark exprimiert.

Die Zellen wurden nach dem Zählen in eiskaltem MACS-Puffer aufgenommen und gewaschen. Anschließend wurde das Zellpellet in 90 µl MACS-Puffer pro 10^7 Zellen aufgenommen und 10 µl CD90.2 Mikropartikel pro 10^7 Zellen hinzugegeben. Diese Lösung wurde 15 Minuten bei 4 °C inkubiert. Nach Ablauf der Zeit wurden die Falconröhrchen mit MACS-Puffer auf 50 ml aufgefüllt und gewaschen. Zur Vorbereitung wurden die Säulen mit jeweils 3 ml Puffer äquilibriert. Das Zellpellet wurde mit 500 µl Puffer pro 10^8 Zellen resuspendiert und anschließend wurden bis zu maximal 300×10^6 Zellen über eine Säule gegeben. Der Durchfluss wurde in 15 ml auf Eis gelagerten Falconröhrchen aufgefangen und mit Puffer gewaschen. Die Zellen, welche den magnetischen Antikörper gebunden hatten, wurden verworfen. Es folgten ein Zellzählschritt und abermaliges Waschen mit Mausmedium. Die Zellen wurden dann in Mausmedium aufgenommen und bis zum Zeitpunkt des Zelltransfers bei 4 °C aufbewahrt.

Pro Empfängertier wurde ein Volumen von 150 µl, welches zwischen $12 - 20 \times 10^6$ Zellen der Spendertiere enthielt, intravenös in eine der drei Schwanzvenen der Maus injiziert. Nach dem Zelltransfer wurden die Tiere in frisch desinfizierten Makrolonkäfigen untergebracht, welche zuvor mit autoklaviertem Streu ausgelegt worden waren. Von diesem Zeitpunkt an bekamen die Mäuse über einen Zeitraum von mindestens vier Wochen mit 0,01 % Enrofloxacin (Baytril®) versetztes Trinkwasser. Nach Ablauf von insgesamt sieben Wochen wurden die Tiere in die verschiedenen Versuche eingeführt.

2.3.4.2 *CD80/86^{-/-}- und MHC II^{-/-}-Knockout-Chimären*

Zur Generierung der *Knockout* (K.o., ^{-/-})-Chimären wurden die Zellen aus den Hinterläufen der Mausgruppen a) MHC-II^{-/-} sowie der Gruppe b) CD80/86^{-/-}, wie unter 2.3.4.1 beschrieben, gewonnen und durch das MACS-Verfahren isoliert. Hier bekamen die Empfängertiere 50 % CD11c-DTR-GFP-Zellen sowie a) 50 % der isolierten MHC II^{-/-}-Zellen oder b) 50 % der isolierten CD80/86^{-/-}-Zellen. Die totale Zellzahl entsprach der, die bei den reinen CD11c-DTR-GFP-Chimären transferiert wurde ($12-20 \times 10^6$).

2.3.4.3 *Wildtyp-Kontrolle*

Um eventuell auftretende artifizielle Alterationen durch die DTx-Applikation leichter zu detektieren, wurden zusätzlich Wildtyp (WT)-Chimären generiert. Hierzu wurde das Knochenmark normaler C57BL/6-Tiere nach dem unter 2.3.4.1 beschriebenen Verfahren isoliert

und in Tiere gleichen Hintergrundes transferiert. Auch hier lag die Zellzahl zwischen $12 - 20 \times 10^6$ Zellen.

2.3.5 Verfahren zur Zellgewinnung

2.3.5.1 Antigenpräsentierende Zellen aus der Milz

Die durch zervikale Dislokation getöteten Mäuse wurden mit Ethanol desinfiziert, auf einer Unterlage fixiert und im Anschluss mittels eines medianen Längsschnittes am Bauchfell das Peritoneum freigelegt. Durch einen diagonalen Schnitt – ausgehend von der Sternumspitze entlang dem Rippenbogen – wurde die Bauchhöhle eröffnet, die Milz freipräpariert, entnommen und in 15 ml Waschmedium aufbewahrt.

Die im weiteren Verlauf durchgeführten Arbeiten wurden unter der sterilen Arbeitsbank und bei 4°C durchgeführt. Um die Zellen aus dem Milzgewebe gewinnen zu können, wurde mit Hilfe der Rückseite eines Spritzenstempels die Milz durch ein $100\ \mu\text{m}$ -maschiges Nylonsieb gerieben. Die dadurch entstandene Einzelzellsuspension wurde in 50 ml Medium aufgenommen, bei $550\ \text{g}$ für fünf Minuten zentrifugiert, der Überstand verworfen und das entstandene Zellpellet resuspendiert (im Folgenden als Waschschrift bezeichnet). Um eine reine Leukozytensuspension zu generieren, wurde das Zellpellet in 10 ml hypoosmolarem Lysispuffer resuspendiert, mit 5 ml Waschmedium aufgefüllt und umgehend zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen und abermals ein Waschgang durchgeführt. Aufgrund der geringeren osmolaren Stabilität der Erythrozyten im Vergleich zu Leukozyten werden die roten Blutkörperchen zerstört, während weiße Blutkörperchen intakt bleiben. Nach dem Zählen der Zellen wurden diese in MACS-Puffer gewaschen und eine CD90.2-MACS-Sortierung durchgeführt (vgl. 2.3.4).

2.3.5.2 Antigenpräsentierende Zellen aus den Lymphknoten

Je nach Fragestellung wurden Lymphknoten aus den verschiedenen Regionen (inguinal, mesenterial und/oder axial) freipräpariert und entnommen. Mit Ausnahme der vernachlässigbaren Zellyse unterschied sich der weitere Ablauf der Zellgewinnung aus den Lymphknoten gegenüber dem bei der Milz nicht. Sowohl bei der Gewinnung der APZ aus der Milz als auch aus den Lymphknoten wurden die Tiere, deren APZ später in In-vitro-Experimenten Verwendung fanden, in Gruppen (PBS-Vehikel vs. DTx-Vehikel) eingeteilt. Den Tieren der DTx-Gruppe wurde 18 Stunden vor Entnahme der jeweiligen Organe $360\ \text{ng}$ DTx (gelöst in $200\ \mu\text{l}$ PBS) intraperitoneal appliziert. Mäuse der PBS-Gruppe hingegen bekamen das gleiche Volumen an reiner PBS-Lösung injiziert. Nach Isolierung der antigenpräsentierenden

Zellen folgte eine Bestrahlung mit insgesamt 30 Gray. Diese Bestrahlung hat zur Folge, dass die Zellteilung der kultivierten Zellen nicht mehr vollzogen wird.

2.3.5.3 Naive T-Zell-Sortierung

Die Arbeitsschritte zur Gewinnung naiver T-Zellen erfolgten bis zum Punkt der MACS-Sortierung nach dem gleichen Schema, welches auch zur Gewinnung der APZ eingesetzt wurde. Hierbei wurden Milz und/oder Lymphknoten verwendet. An Stelle der CD90.2-Sortierung findet jedoch bei der Gewinnung von naiven T-Zellen eine CD4⁺-T-Zell-Sortierung statt. Dieses Verfahren führt zu einer sog. negativen Selektion durch Depletion aller nicht CD4⁺-Zellen, welche durch die Bindung magnetischer Antikörper in der magnetischen Säule verbleiben. Hierzu werden die Zellen in einem Volumen von 40 µl MACS-Puffer pro 10⁷ Zellen aufgenommen und 10 µl Biotin-Antikörper-Cocktail pro 10⁷ Zellen hinzugefügt. Dieser Cocktail beinhaltet Biotin-konjugierte monoklonale Antikörper gegen CD8a, CD11b, CD45R, DX5 und Ter-119. Nachdem durch leichtes Schwenken der Lösung eine gute Durchmischung sichergestellt worden war, wurden die Zellen für 10 Minuten im Kühlschrank inkubiert. Nach Ablauf der Zeit wurden 30 µl Puffer sowie 20 µl der Anti-Biotin-Mikropartikel pro 10⁷ Zellen hinzugegeben. Wieder wurde die Lösung geschwenkt und dann für 15 Minuten bei 4 °C inkubiert. Die weiteren Schritte zur Trennung der Zellen mit und ohne Antikörperbindung erfolgten wie unter Punkt 2.3.3 beschrieben. Auch hier befanden sich die Zielzellen, welche keinen Antikörper gebunden hatten, in der Zellsuspension, die ungehindert die magnetische Säule passieren konnte. Nach Zentrifugation wurde das Zellpellet Zellzahl-unabhängig in 960 µl MACS-Puffer gelöst, 40 µl CD62L Mikropartikel hinzugegeben und für 15 Minuten bei 4 °C inkubiert. Das L-Selectin-Oberflächenmolekül (CD62L) wird v. a. von naiven T-Zellen exprimiert (Hengel et al. 2003). Nach abgeschlossener Inkubation wurde das Falconröhrchen mit MACS-Puffer aufgefüllt und zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen, das Zellpellet in 1 ml MACS-Puffer aufgenommen und über eine Säule gegeben. Um die CD62L⁺-der CD4⁺-T-Zellen, welche sich nun in der Säule befanden, zu erhalten, wurden 2 x 5 ml MACS-Puffer durch die Säule gepresst und in einem 15-ml-Falconröhrchen aufgefangen. Es folgte ein weiterer Zählschritt sowie die Überprüfung des Reinheitsgehaltes per FACS-Färbung (vgl. 2.3.3.2). Bestand eine Reinheit von mehr als 97 %, wurde mit den Zellen weiterverfahren. Traf dies nicht zu, wurde die Zellsuspension über eine weitere Säule gegeben.

2.3.5.4 ZNS-Verdau

Um Verunreinigung mit Erythrozyten bei der Gewinnung von Lymphozyten aus dem ZNS zu vermeiden, wurde die Blutbahn der Tiere mit PBS ausgespült. Zu diesem Zweck wurde den Tieren gewichtsbezogen eine tödliche Narkoselösung (sog. Killernarkose) injiziert. Sobald das Tier keine Schmerzreflexe mehr zeigte, wurde es mit Ethanol besprüht, auf einer Unterlage fixiert und mit Hilfe einer desinfizierten Schere ein medianer Bauchschnitt vollzogen, welcher die Bauchhöhle eröffnete. Weitere Schnitte an Rippenbogen und Zwerchfell ermöglichten den Zugang zur Thoraxhöhle und das Herz konnte freipräpariert werden. Anschließend wurde eine Spritzenkanüle in den linken Ventrikel eingeführt und mit einer Klemme fixiert. An diese Nadel war ein Pumpsystem angeschlossen, welches mit einer konstanten Geschwindigkeit von 35 Umdrehungen pro Minute (U/min) ein Flüssigkeitsvolumen von 15 ml pumpte. Es folgten die Eröffnung des rechten Vorhofs und die Spülung des gesamten Körperkreislaufes mit 20 ml PBS-Lösung. Als Kontrolle einer erfolgreichen Perfusion diente die Entfärbung der Leber, die sich visuell gut darstellen ließ. Nach Abschluss der Perfusion folgte sowohl das Freipräparieren der Zielstrukturen als auch die Eröffnung von Schädelhöhle und Wirbelkörperkanal. Danach fand die Entnahme von Rückenmark und Gehirn mit Überführung in 5 ml IMDM, vorliegend in 15-ml-Falconröhrchen, und die abermalige Überführung der Strukturen in Petrischalen statt, wo sie mit einem Skalpell zerkleinert wurden. Die Gewebepartikel wurden dann in 5 ml IMDM in 15-ml-Falconröhrchen überführt und für fünf Minuten im Wasserbad bei 37 °C vorgewärmt. Im Anschluss daran wurden 50 µl Kollagenase (5 mg/50 µl, 363 U/mg), 50 µl DNase (1000 U/50 µl) sowie 50 µl Kollagenase/Dispase (1 mg/ml) hinzugeben. Um optimale Bedingungen für die Enzymaktivität zu gewährleisten, wurden die Röhrchen in einem zuvor desinfizierten Rotator für 25 Minuten auf höchster Stufe im Inkubator untergebracht. Nach Ablauf der Zeit wurde die Suspension durch ein Nylonsieb gerieben, mit frischem IMDM-Medium gewaschen, in 50-ml-Falconröhrchen überführt und bei 550 g für fünf Minuten zentrifugiert. In 15-ml-Falconröhrchen wurden 5 ml einer 70 % Percolllösung vorgelegt, während die gewaschenen Zellen in einer 40 % Percolllösung aufgenommen wurden. Danach folgte die vorsichtige Übersichtung der 70 % Percolllösung mit der 40 % Percolllösung. Die Röhrchen wurden nun für 30 Minuten bei 700 g ohne Bremse zentrifugiert. Die Lymphozyten, die sich aufgrund ihrer Größe im Dichtegradienten in der Interphase wiederfinden, wurden abpipettiert, in Waschmedium gewaschen, gezählt und dann in Mausmedium aufgenommen. Anschließend folgte die zuvor beschriebene Stimulation der Zellen sowie Oberflächen- und Intrazellulärfärbungen.

2.3.5.5 Milz-Verdau

Der Milzverdau mit Kollagenase ermöglichte es, die dendritischen Zellen aus der Extrazellulärmatrix zu lösen. Hierzu wurde den Tieren vor einer PBS-Spülung der Gefäße (s. o.) die Milz entfernt, in ein 15-ml-Falconröhrchen mit 5 ml IMDM-Medium überführt und für einige Minuten im Wasserbad erwärmt, um eine optimale Wirkungstemperatur des Enzyms zu gewährleisten. Milz und Medium wurden anschließend in eine Petrischale überführt und 50 µl Kollagenase (5 mg/50 µL; 363 U/mg) unter Zuhilfenahme von 1-ml-Insulinspritzen in die Milz injiziert. Bei korrekter Injektion wurde eine leichte Vergrößerung sowie Entfärbung der Milz sichtbar. Durch mehrmaliges Nachspritzen mit dem IMDM-Medium und der Kollagenase aus der Petrischale wurde eine bessere Wirkung des Enzyms am Wirkort gewährleistet. Daran anschließend erfolgte die Zerkleinerung der Milz sowie die Überführung der Suspension in die ursprünglichen Röhrchen. Diese wurden dann bei laufendem Rotator im Inkubator für 25 Minuten inkubiert. Es schloss sich die oben aufgeführte Zellgewinnung mit Hilfe von Lyse und Sieb an. Auch hier wurde nach erfolgter Isolierung der Zellen eine Stimulation sowie Oberflächen- und Intrazellulärfärbung durchgeführt.

2.3.6 Zellkultur

2.3.6.1 Induktion von Th17-Zellen

Ziel dieser Zellkultur war es, 2d2-spezifische Th17-Zellen zu generieren. Hierzu wurden naive T-Zellen (vgl. 2.3.5.3) mit zuvor inkubierten APZ, welche mit dem spezifischen MOG₍₃₅₋₅₅₎-Peptid beladen worden waren, im Verhältnis von 1 : 5 – 1 : 10 in Kultur genommen. APZ wurden mit dem MOG₃₅₋₅₅-Peptid in einer Konzentration von 12,5 µg/ml auf einer 24-Lochplatte ausplattiert und für 30 Minuten inkubiert. Während dieser Zeit wurden die naiven T-Zellen mit 3 ng/ml huTGFβ, 20 ng/ml IL-23 und 20 ng/ml IL-6 in Lösung genommen und nach Ablauf der Zeit auf die vorliegenden APZ-Lochplatten pipettiert, wodurch eine Zellsuspension mit 6×10^6 Zellen auf 2 ml pro Vertiefung entstand. Diese Lochplatten wurden von nun an im Inkubator gelagert und die Proliferationsfortschritte der Zellkultur regelmäßig unter dem Mikroskop verfolgt. In Abhängigkeit von dem sich entwickelnden Zellrasen am Boden der Vertiefungen wurden die Zellen alle zwei bis drei Tage in frischem Mausmedium neu aufgeteilt. Dabei wurden 10 ng/mL IL-23 und 50 U IL-2 zugefügt, wobei versucht wurde, die IL-2-Konzentration niedrig zu halten. Zwischen Tag vier – sieben erfolgte eine Kontrolle der adäquaten Zytokinproduktion, um den Differenzierungsprozess der Th17-Linie zu verfolgen (vgl. 2.3.3.3). An den Tagen 7 und 14 erfolgte die 1. bzw. 2. Restimulation. Hierzu wurden die Zellen der

Lochplatten geerntet, gewaschen und dann gezählt. Wieder wurden neue APZ aus Mäusemilzen gewonnen, bestrahlt, mit MOG₃₅₋₅₅-Peptid präinkubiert und im Verhältnis von 3 : 1 – 5 : 1 mit T-Zellen in Kultur genommen. Den T-Zellen waren zuvor IL-23 (in der oben genannten Konzentration), 10 ng/ml IL-6 und 0,75 ng/ml TGF- β hinzugegeben worden. Die 2. Restimulation unterschied sich von der 1. lediglich in ihrer Zytokinkonzentration: Die 10 ng/ml IL-23-Konzentration wurde beibehalten, während nur 5 ng/ml IL-6 verwendet wurden. TGF- β wurde nicht mehr hinzugegeben. Drei Tage nach der 2. Restimulation wurden die Zellen wieder geerntet, wobei 1 ml der Zellsuspension vorsichtig abgenommen und verworfen wurde, bevor der restliche Milliliter gut resuspendiert und in ein 50-ml-Falconröhrchen überführt wurde. In dem zuvor abgenommenen Milliliter befanden sich vorwiegend tote Zellen und Zellfragmente, die bei dem folgenden Zelltransfer gestört hätten. Um eine hohe Reinheit an lebenden Zellen zu gewährleisten, wurde zusätzlich ein Gradient mit Histopaque durchgeführt. Pro Gradient wurde eine maximale Zellzahl von 100×10^6 Zellen verwendet. Hierzu wurden 5 ml der zuvor auf Raumtemperatur gebrachten Histopaquelösung in 15-ml-Falconröhrchen überführt und anschließend mit 5 ml der gewaschenen Th17-Zellsuspension langsam überschichtet. Es folgte eine bei Raumtemperatur ablaufende 20-minütige Zentrifugation mit 700 g ohne Abbremsen nach Ablauf der Zentrifugation, welche einen klar abzugrenzenden Zellring zwischen den beiden Lösungen hervorrief. Dieser Zellring repräsentierte die lebenden Zellen, wohingegen die toten Zellen als Zellpellet am Boden des Röhrchens abgesunken waren. Die lebenden Zellen wurden vorsichtig abpipettiert, in Waschmedium gewaschen und so lange kühl gelagert, bis sie nach einem weiteren Waschschrift in PBS in PBS-Medium aufgenommen werden konnten. Bei dem anschließenden Zelltransfer wurde eine maximale Zellzahl von 30×10^6 Zellen in einem Volumen von 150 μ l sterilem PBS pro Empfängertier injiziert (2.3.7.2).

2.3.6.2 Induktion von regulatorischen T-Zellen

T-Zellen und APZ wurden wie zuvor erläutert gewonnen und kokultiviert. Um nun eine FoxP3⁺-Treg-Kultur in vitro zu generieren, wurde TGF- β in den Konzentrationen 0 ng/ml, 0,3 ng/ml oder 3 ng/ml den Zellkulturen mit der jeweiligen Zellsuspension hinzugegeben. Zellen wurden an Tag 3, 6 und 9 geerntet und durch die oben beschriebene Zytokinfärbung (vgl. 2.3.3.3) die intrazelluläre Zytokinproduktion kontrolliert.

2.3.7 Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis

Um eine EAE in den Versuchstieren hervorzurufen, wurden in dieser Arbeit zwei unterschiedliche Verfahren angewandt:

2.3.7.1 Aktive EAE

Den Tieren wurden zu beiden Seiten der Schwanzbasis insgesamt 200 µl des Immunisats injiziert. Dieses Immunisat beinhaltete pro Maus 150 µg MOG₃₅₋₅₅Peptid, welches mit 500 µg *Mycobacterium tuberculosis* (H37Ra) in CFA (Volumenanteil 50 %) und PBS (Volumenanteil 25 %) gelöst war. Zudem erhielten die Tiere im Anschluss an die Immunisierung sowie 48 Stunden später eine intraperitoneale Injektion des Pertussistoxins (200 ng gelöst in 200 µl PBS). In Mäusen des Mausstammes C57Bl/6 kommt es in der Regel zwischen 11 bis 15 Tagen nach Immunisierung mit MOG₃₅₋₅₅ zu einem chronischen, nicht remittierenden, sekundär progredienten EAE-Krankheitsverlauf, der in einem ähnlichen Ausmaß in späten Phasen der MS zu sehen ist. Die klinischen Krankheitszeichen sind dabei von Tier zu Tier dieses Mausstammes reproduzierbar (Mendel et al. 1995b).

2.3.7.2 Passive EAE

Eine passive EAE wurde durch Übertragung enzephalitogener T-Zellen ausgelöst, welche zuvor in einer Kultur durch regelmäßige Restimulation generiert wurden (vgl. 2.3.6.1). Im Anschluss wurden den Rezipienten ca. 30×10^6 Zellen in 150 µl Zellsuspension in eine der drei Schwanzvenen injiziert. Auch hier wurde den Tieren zum Zeitpunkt des Zelltransfers sowie 48 Stunden später Pertussistoxin intraperitoneal appliziert.

2.3.7.3 DTx-Applikationsschema

Abhängig vom Versuchsdesign des jeweiligen Experimentes wurden den Tieren 12,5 ng Diphtherietoxin pro g Körpergewicht in 200 µl PBS in einem 48-Stunden-Intervall intraperitoneal appliziert, um eine Rekonstituierung des dendritischen Zellpools zu unterbinden. Dabei wurde zwischen den folgenden Applikationsformen unterschieden:

- a) von Beginn (einen Tag vor Immunisierung) bis Ende,
- b) von Beginn (einen Tag vor Immunisierung) bis Peak (Krankheitshöhepunkt wird hier als *peak* bezeichnet) sowie
- c) vom Krankheitspeak (ab einem Score von 1,5 – 2) bis zum Ende der EAE

2.3.7.4 Bewertung des Krankheitsgrades

Um den Krankheitsverlauf der Versuchstiere bestimmen zu können, wurden diese täglich auf ihre klinischen Symptome hin kontrolliert (sog. *Scoren*) und wie folgt numerologisch bewertet. Die hier für die klassische EAE verwendete Bewertungsskala steht im Einklang mit zuvor

publizierten Skalen (Ruddle et al. 1990; Kassiotis et al. 1999) und wurde, um genauere Krankheitsstadien voneinander zu unterscheiden, durch Unterpunkten erweitert (Stromnes and Goverman 2006a).

Die Bewertung atypischer Tiere wurde in Anlehnung an das Protokoll von Stromnes et al. wie folgt durchgeführt (Stromnes and Goverman 2006b).

Tab. 2: Klinische Bewertung des Krankheitsgrades von Mäusen mit Zeichen einer klassischen EAE

0	Keine detektierbaren Zeichen einer EAE
0,5	Parese des Mausschwanzes
1	Komplette Paralyse des Mausschwanzes
1,5	Komplette Paralyse des Mausschwanzes sowie eingeschränkter Drehreflex
2	Parese der Hinterläufe
2,5	Einseitige Paralyse eines Hinterlaufes
3	Vollständige Paralyse der Hinterläufe
3,5	Vollständige Paralyse der Hinterläufe sowie Vorderlaufparese *
4	Vollständige Paralyse der Hinter- wie auch Vorderläufe
4,5	Moribund
5	Tod

Tab. 3: Klinische Bewertung des Krankheitsgrades von Mäusen mit Zeichen einer atypischen EAE

1	Komplette Paralyse des Mausschwanzes, gekrümmtes Erscheinungsbild
2	Ataxie, ungepflegtes Fell
3	Schiefe Kopfposition, hypersensitives Verhalten, spastische Bewegungsabläufe
4	Massive propriozeptive Einschränkungen*
5	Moribund/Tod

* **Zusatz:** Mäuse, welche einen Krankheitsgrad von 3,5 oder höher aufwiesen, wurden aus dem Experiment entfernt und unter Berücksichtigung des Tierschutzes getötet

2.3.8 Wirksamkeit des transgenen CD11c-DTR-Modells

Um den depletierenden Effekt des Diphtherietoxins auf dendritische Zellen in den generierten transgenen Chimären zu überprüfen, wurden am 9., 15. und 22. Tag stichprobenartig die Milzen einiger Versuchstiere entnommen, Zellen isoliert und diese einer FACS-Analyse unterzogen. Hierbei wurde sowohl die CD11c-Expression als auch die GFP-Emission der Zellen kontrolliert. Dabei konnte an den Testtagen ein depletierender Effekt des DTx auf CD11c⁺GFP⁺-Zellen der Splenozyten detektiert werden, während Tiere mit der PBS-Behandlung keinen Effekt zeigten.

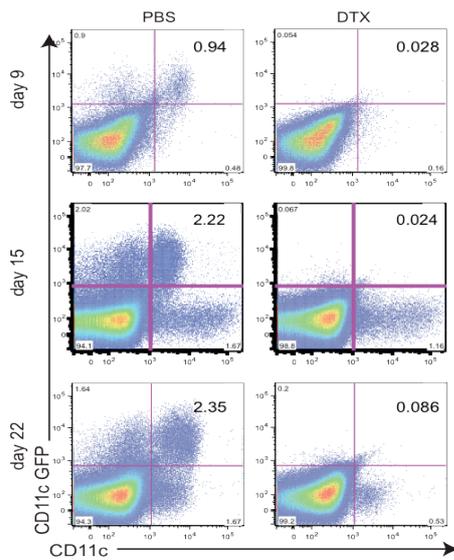


Abb. 6*: Tiere, die die DTx-Applikation einen Tag vor Immunisierung erhielten, wiesen während der gesamten Zeit des Versuches vernachlässigbare Werte an CD11c⁺GFP⁺-Zellen auf (Tag 9 = 0,028, Tag 15 = 0,024 sowie Tag 22 = 0,086). In Tieren mit PBS-Behandlung hingegen konnten an allen drei Tagen CD11c⁺GFP⁺-Zellen nachgewiesen werden (Tag 9 = 0,94, Tag 15 = 2,22, Tag 22 = 2,35) (*mit freundlicher Genehmigung von J. Werr).

Zusätzlich wurde der Effekt der DTx-Behandlung auf die Zellpopulation im Gehirn der Versuchstiere überprüft. Hierzu wurden am 15. Tag nach Immunisierung zusätzliche FACS-Analysen an Zellen von Gehirnen behandelter Versuchstiere durchgeführt. Auch hier wiesen Tiere der PBS-Gruppe annähernd 5 % CD11c⁺GFP⁺-Zellen an der Gesamtzellzahl auf, während Tiere der DTx-Gruppe unter 1 % blieben. Neben den CD11c-DTR-Chimären wurden zur Kontrolle auch C57BL/6-Chimären verwendet, um etwaige Alterationen des Chimärenmodells sowie der DTx-Applikation ausschließen zu können.

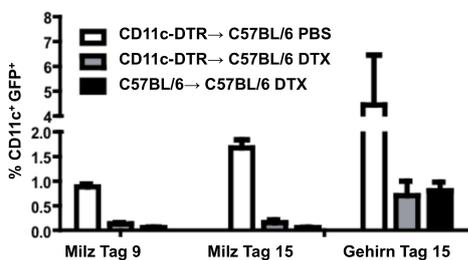


Abb. 7*: Graphische Darstellung des prozentualen Anteils sowie SEM der CD11c⁺GFP⁺-Zellen an der Gesamtzellpopulation in der Milz an Tag 9 und 15 sowie im Gehirn an Tag 15 der Gruppen CD11c-DTR DTx-, CD11c-DTR PBS-Tiere und C57BL/6 DTx-Wildtyp-Kontrolle (n = 6 Tiere pro Gruppe) (*mit freundlicher Genehmigung von J. Werr).

Um den in anderen Publikationen beschriebenen Effekt der Depletion durch DTx an $CD11c^+CD11b^+$ - und $CD11c^+CD8^+$ -Zellen zu überprüfen (Sapoznikov et al. 2007), wurden in behandelten Tieren FACS-Analysen durchgeführt. Hier zeigte sich die Wirksamkeit der Depletion neben $CD11c^{hi}$ -dendritischen Zellen sowohl bei $CD11c^+CD11b^+$ -Zellen als auch bei $CD11c^+CD8^+$ -Zellen.

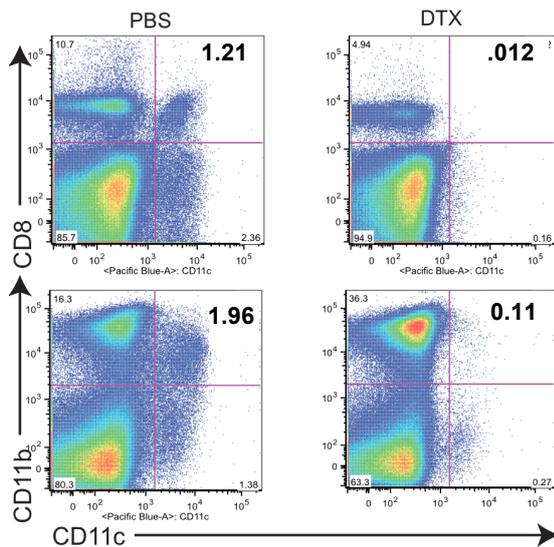


Abb. 8*: Zellpopulationen ($CD11c^+CD11b^+$ sowie $CD11c^+CD8^+$) der PBS-Tiere sind klar erkennbar; DTx-behandelte Tiere hingegen wiesen diese Zellpopulation nicht auf (*mit freundlicher Genehmigung von J. Werr).

2.4 Histologie

2.4.1 Generierung von Gewebeschnitten

Mäuse, die für histologische Zwecke verwendet werden sollten, wurden nach dem beschriebenen Verfahren mit PBS perfundiert und anschließend 120 ml 4 % Paraformaldehyd (PFA) durch den großen Körperkreislauf gespült (vgl. 2.3.5.4). Nachfolgend wurde der Kopf vom Rumpf getrennt und die Schädelhöhle mit zwei temporalen Schnitten durch das *Os occipitale* und *Os parietale*, beginnend am *Foramen magnum*, eröffnet und vorsichtig das Gehirn entnommen. Am Rumpf wurde dorsal das Fell entfernt und die Muskelfaszie über der Wirbelsäule eröffnet. Seitlich wurden die *Arcus vertebrae* beidseits über die gesamte Wirbelsäulenlänge eröffnet, das Rückenmark freipräpariert und entnommen. Die entnommenen Organe wurden für 24 Stunden in 4 % PFA im Kühlschrank gelagert. Anschließend wurden die Präparate eine Stunde im fließenden Wasser gespült und über Nacht in PBS eingelegt. An den folgenden Tagen wurden die Organe mittels aufsteigender Glukosereihe (15 – 30 %) entwässert. Darauf folgte die Einbettung der Organe in Einfriermedium („*Tissue-Tek*“) sowie die langsame Schockgefrierung

in flüssigem Stickstoff. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Organe bei -80 °C im Tiefkühlschrank gelagert. Vor einer anstehenden Färbung der Organe wurden im Schnellschnittkryostat Gewebeschnitte mit einer Schichtdicke von 10 µm hergestellt, durch Adhäsionskraft auf Glasobjekträger übertragen und für mindestens zwei Stunden luftgetrocknet. Anschließend folgte entweder die Färbung der Gewebeschnitte oder die Lagerung im Tiefkühlschrank.

2.4.2 Färbungen

2.4.2.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Zur besseren Differenzierung der verschiedenen Gewebestrukturen im mikroskopischen Bild wurde die Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung durchgeführt. Aufgrund seiner chemischen Eigenschaften färbt das Hämatoxylin/Hämalaun (basischer Hämalaun) alle sauren, basophilen Strukturen blau, was vor allem Zellkerne mit der darin enthaltenen Desoxyribonukleinsäure (DNA) und das raue endoplasmatische Retikulum (rER) betrifft. Das Eosin ist ein synthetischer saurer Farbstoff, der alle azidophilen/basischen (eosinophilen) Strukturen rot färbt. Dies betrifft in erster Linie Zellplasmaproteine. Nachdem die Objekträger mit den gefrorenen Gewebeschnitten 30 Minuten lang luftgetrocknet worden waren, folgte eine 10-minütige Inkubation in eiskaltem Methanol. Daran schlossen sich ein Waschschrift in destilliertem Wasser, ein 10-minütiger Färbeschrift in Hämatoxylin sowie ein erneuter Waschschrift für zwei Minuten an. Nachdem die Objekträger in einer Lösung aus 1-prozentiger Salzsäure (HCL) und 70-prozentigem Ethanol eingetaucht worden waren, folgten ein erneuter Waschschrift bei laufendem Leitungswasser und eine 0,5- bis 1-minütige Eosinfärbung. In der Folge wurde der Waschschrift unter fließendem Leitungswasser wiederholt und eine Spülreihe in aufsteigender Ethanolkonzentration (70 %, 96 % und 99 %) durchgeführt. Abschließend wurden die Objekträger in Xylol (Dimethylbenzene) getaucht und die Eindeckelung mit sog. Eindeckellösung („*Neo-Mount*“) durchgeführt.

2.4.2.2 Luxol Fast Blue

Die Luxol-Fast-Blue-Färbung dient der Charakterisierung von Myelin unter dem Lichtmikroskop. Dabei weist das Luxol eine spezifische Affinität zu dem Lipoprotein Neurokeratin des Myelins auf, das die Markscheide in einem starken Blau erscheinen lässt. Die äquilibrierten Gewebe/Objekträger wurden für drei Stunden in der vorgefertigten Luxol-Fast-Blue-Lösung bei konstanten 60 °C erwärmt. Daran anschließend folgte eine kurze Spülung in 95 % Ethanol sowie in destilliertem Wasser. Nach abschließender Fixierung in einer 0,05 %

Lithium-Karbonat-Lösung für fünf Sekunden wurde durch vorsichtiges Schwenken in 70 % Ethanol eine leichte Entfärbung erzielt, welche durch Eintauchen der Objektträger in *aqua bidestillata* (*aquabidest.*, 2-fach destilliertes Wasser) unterbrochen werden konnte. Diese Schritte, beginnend mit der Fixierung in Lithium bis zur Entfärbung, wurden so lange ausgeführt, bis sich ein eindeutiger Kontrast zwischen der blau erscheinenden *Substantia alba* und der farblos bis violett erscheinenden *Substantia grisea* einstellte. Im Anschluss fand eine 1-minütige Gegenfärbung mit Hämatoxylin statt sowie ein weiterer Waschschrift unter fließendem Leitungswasser und *aquabidest.* Auch hier wurden abschließend die oben beschriebene aufsteigende Ethanolreihe und das Eindeckeln mit Eindeckellösung durchgeführt. Die gefärbten Gewebeschnitte wurden unter dem Lichtmikroskop auf Zeichen der Zellinfiltration und Demyelinisierung untersucht. Fotografische Aufnahmen wurden im Anschluss daran bei Verwendung verschiedener Vergrößerungen an einem Olympus Forschungsmikroskop BX51 mit Hilfe der MagnaFireTM-Software angefertigt.

2.5 Statistische Datenanalyse

Die im Folgenden beschriebenen Ergebnisse der unterschiedlichen Versuche wurden durch die Verwendung sich wiederholender, vergleichbar durchgeführter statistischer Analyseverfahren generiert. Der Einfachheit halber wird von einer genauen Beschreibung der statistischen Auswertung jedes einzelnen Versuches abgesehen und stattdessen werden die Prinzipien im Allgemeinen erläutert.

Die Skala, die zur Bewertung der Krankheitsgrade in der EAE angewendet wird, ist eine Ordinalskala und weist demnach keine Gauß'sche Normalverteilung auf. Adäquate statistische Analyseverfahren sind folglich parameterfreie statistische Tests. Es kann zwar eine Aufstellung der Rangordnung mit Informationen über die Reihung bzw. Ordnung der Variablenwerte vorgenommen sowie der Median bestimmt werden, eine Aussage über die Abstände zwischen den Krankheitswerten ist jedoch nicht möglich, so dass theoretisch kein Durchschnittswert errechnet werden kann.

In dieser Arbeit werden für die Rangwerte der EAE dennoch „Durchschnittswerte“ – wie für den mittleren maximalen Krankheitswert – angegeben. Es handelt sich hierbei jedoch nicht um einen Durchschnitt im Sinne des arithmetischen Mittels. Vielmehr dient die Wiedergabe dieser Werte in der Durchschnittsanzeige bei Gruppenvergleichen innerhalb der ordinalen EAE-Skala dem Versuch, einen Differenzierungstrend sichtbar zu machen.

Um den Krankheitsverlauf der verschiedenen Gruppen in der EAE zu verdeutlichen, wurden die Mittelwerte sowie der Mittelwert des Standardfehlers der EAE-Scores (y-Achse) der Tiere innerhalb einer Gruppe gebildet und über den Zeitraum (x-Achse) des Versuches im Vergleich zueinander abgebildet. Im Rahmen der Varianzanalyse wurden die Mediane der Gruppen über den Zeitraum entweder im Mann-Whitney-U-Test (bei dem Vergleich zweier Gruppen an einem Tag miteinander) oder im Kruskal-Wallis-Test (bei dem Vergleich mehrerer Gruppen an einem Tag miteinander) verglichen.

Der Mann-Whitney-U-Test ist ein parameterfreies Verfahren, in welchem verglichen wird, inwieweit sich zwei unabhängige Stichproben hinsichtlich ihrer ordinalskalierten Variablen in ihrem Erwartungswert unterscheiden. Ähnlich dem Mann-Whitney-U-Test basiert der Kruskal-Wallis-Test auf der Ordinalskala, ermöglicht jedoch den Vergleich von mehr als zwei Gruppen.

Von einem signifikanten Unterschied wurde ab einem p-Wert von 0,05 und kleiner gesprochen und im weiteren Verlauf wie folgt abgekürzt:

$p > 0,05$ nicht signifikant (ns), $p = 0,01 - 0,05$ einfach signifikant *, $p = 0,001 - 0,01$ hoch signifikant ** und $p < 0,001$ höchst signifikant ***. P-Werte wurden hierbei bis auf die 3. Stelle nach dem Komma gerundet.

Die Inzidenzen zweier Gruppen wurden unter Verwendung des Exakten-Tests nach Fisher (exakter Chi-Quadrat-Test) verglichen. Dieser überprüft die Unabhängigkeit des gemeinsamen Auftretens zweier Merkmale.

Beim Vergleich des *mean max. scores* der Gruppen (mittlerer maximaler Krankheitswert) wurden nur die Scores erkrankter Tiere verwendet, während beim Vergleich des *mean scores* (mittlerer Krankheitswert) über die Zeit alle Tiere innerhalb dieser Gruppe integriert wurden. Auch hier kam der Mann-Whitney-U-Test zur Anwendung.

Um die kumulative Krankheitsaktivität der Tiere innerhalb einer Gruppe im Gruppenvergleich zu untersuchen, wurde die Fläche unter dem Kurvenverlauf (*area under the curve*, AUC) der Tiere einer Gruppe bestimmt und der Mittelwert gebildet. Dieses Verfahren ermöglicht es, eine Aussage über den Unterschied über den gesamten Zeitverlauf zu treffen. Im Vergleich der AUC zweier oder mehr Gruppen wurde der t-Test oder die einfaktorische Varianzanalyse (ANOVA) verwendet.

Der t-Test erlaubt die Überprüfung der Annahmen über Erwartungswerte einer oder zweier Stichproben aus normalverteilter Grundgesamtheit mit unbekannter Standardabweichung. Im Anschluss daran bietet die ANOVA die Möglichkeit, diese Überprüfung anhand mehrerer Gruppen durchzuführen.

Bei der Betrachtung der Zeit bis zum Krankheitsausbruch der Tiere (*time to disease onset*) wurde der Krankheitsausbruch als ein Score von ≥ 1 gewertet. Hier, wie auch bei der Betrachtung des Überlebens der Tiere über die Zeit, wurde bei dem Vergleich zweier Gruppen die Ereigniszeitanalyse (*Survival-Analyse*) mit dem Log-Rang (Mantel-Cox)-Test durchgeführt. Der Log-Rang-Test stellt das Standardverfahren in der Überlebenszeitanalyse für Gruppenvergleiche dar und gehört zu den parameterfreien Analyseverfahren.

Um prozentuale Anteile von Zellen bzw. absolute Zellzahlen miteinander zu vergleichen, kam erneut der t-Test (Betrachtung zweier Gruppen) bzw. die einfaktorielle Varianzanalyse (Betrachtung mehrerer Gruppen) zur Anwendung. Zur Berechnung des Unterschiedes zwischen sich verändernder TGF- β Konzentration in Abhängigkeit zweier unterschiedlicher Gruppen wurde die zweifaktorielle Varianzanalyse (*2-way-ANOVA*) eingesetzt. Die *2-way-ANOVA* erlaubt den Vergleich mehrerer Gruppen mit unterschiedlichen Merkmalen (hier variierende Zytokinkonzentration) untereinander.

3 ERGEBNISSE

3.1 Depletion dendritischer Zellen während der aktiven EAE

Die Rolle der dendritischen Zellen innerhalb antigenpräsentierender Zellen ist einzigartig hinsichtlich ihrer Fähigkeit des T-Zell-Primings naiver Zellen sowie in der Kreuzpräsentation endozytischer Peptide auf MHC-Klasse-I- und -II-Oberflächenmolekülen. DZ sind über ihre T-Zell-Interaktion in der Lage, eine Immunantwort zu initiieren sowie unter bestimmten Umständen zu unterdrücken bzw. abzuschwächen (Banchereau and Steinman 1998a; Menges and Rössner et al. 2002). Zudem konnte gezeigt werden, dass der Schweregrad der EAE mit der Gegenwart sowie mit dem funktionellen Status der dendritischen Zellen korreliert (Greter et al. 2005). Dabei zeigen dendritische Zellen sowohl die Fähigkeit, die Differenzierung in TH17-Zellen als auch in regulatorische T-Zellen zu unterstützen.

Ausgehend von der Arbeitshypothese dieser Arbeit, dass dendritische Zellen – in Abhängigkeit des vorliegenden Stadiums der Immunantwort – den Weg der T-Zell-Differenzierung wesentlich beeinflussen und somit einen entscheidenden Einfluss auf den Verlauf der Immunreaktion nehmen können, stellt sich die Frage, zu welchem Zeitpunkt DZ einen eher protektiven Effekt auf den Verlauf der EAE zeigen und wann eher einen proinflammatorischen.

3.1.1 Kontinuierliche Depletion DZ während der aktiven EAE

J. Werr untersuchte in seiner Doktorarbeit den Einfluss der DZ auf den Verlauf der aktiven EAE durch die kontinuierliche Depletion dendritischer Zellen, welche einen Tag vor Immunisierung mit MOG₃₅₋₅₅-Peptid begonnen wurde (unveröffentlichte Daten aus Voss, Siffrin, Werr et al.). Werr konnte dabei zeigen, dass im Gegensatz zur Kontrollgruppe durch die kontinuierliche Depletion dendritischer Zellen eine höhere Krankheitsinzidenz, ein vorzeitiges Einsetzen der Krankheitssymptome sowie ein fulminanterer Verlauf hervorgerufen wurden. Werr konnte zudem demonstrieren, dass die histologisch detektierten Läsionen im ZNS qualitative Ähnlichkeiten in beiden Gruppen aufwiesen und die für die EAE charakteristischen Zeichen der perivaskulären Zellinfiltrationen und -akkumulation sowie Demyelinisierung vorlagen. Interessanterweise konnte durch die FACS-Analysen des ZNS im Höhepunkt des Krankheitsverlaufes der mit DTx behandelten Tiere eine erhöhte Zellzahl an TH1- sowie TH17-Zellen nachgewiesen werden, während die Zellzahl der FoxP3⁺-Zellen reduziert war. Tiere, die nach der Immunisierung mit dem MOG-Peptid durch die PBS-Behandlung ein intaktes DZ-

Kompartiment aufwiesen, zeigten diese Veränderungen nicht und schienen im Gegenteil einen gewissen protektiven Effekt durch die dendritischen Zellen zu beziehen. Werr schlussfolgerte daraus, dass dieser so genannte proinflammatorische Übergang (*Shift*) durch die Depletion der dendritischen Zellen ausgelöst worden war und demnach eine mögliche Ursache für den fulminanteren Verlauf der mit DTx behandelten Tiere darstellen könnte.

Diese Hypothese bildete sowohl den Anstoß als auch die Grundlage für diese Dissertation.

Zur Kontrolle der aufgeführten Ergebnisse wurde der folgende Versuch in kleinerem Umfang wiederholt und stellt demnach den Ausgangspunkt der anschließenden Versuchsreihen dar (n = 7 PBS-Tiere, 6 DTx-Tiere, 7 WT-Tiere).

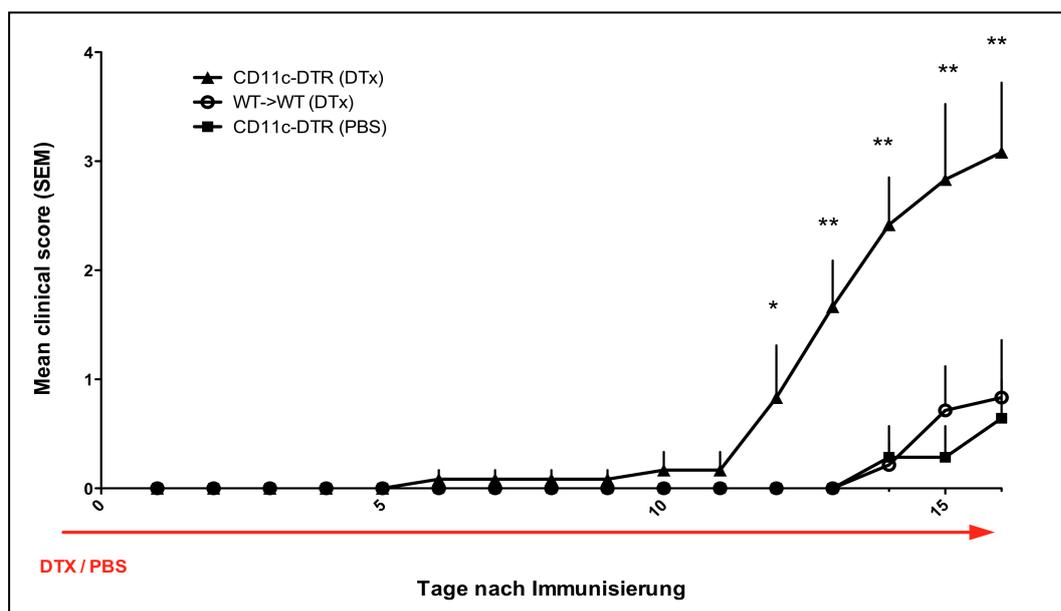


Abb. 9: Depletion dendritischer Zellen während des gesamten Versuchszeitraumes in den Versuchsgruppen CD11c-DTR DTx (n = 6), CD11c-DTR PBS (n = 7) und der C57BL/6 DTx-Wildtyp-Kontrolle (n = 7). Der Vergleich CD11c-DTR DTx- vs. PBS-Gruppe im Mann-Whitney-U-Test ergab an den markierten Tagen folgende Signifikanzen: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$

Die aktive EAE wurde in 13 CD11c-DTR→C57BL/6 -Chimären und in sieben Wildtyp-Chimären zur Kontrolle induziert (vgl. 2.3.7.1), welche einen Tag vor Immunisierung (Tag -1) bis zum letzten Tag (Tag 16) der EAE alle 48 Stunden behandelt und auf klinische Krankheitszeichen hin kontrolliert wurden. Der durchschnittliche Krankheitswert (*mean clinical score*) mit Standardfehler des Mittelwertes (\pm SEM) zeigte einen früheren Beginn sowie einen fulminanteren Verlauf der EAE in der DTx- (CD11c-DTR→ CD57BL/6 n = 6) im Vergleich zur PBS-Behandlungsgruppe (CD11c-DTR→ CD57BL/6 n = 7) und Wildtyp-Kontrollgruppe (CD57BL/6→ CD57BL/6 n = 7). Ab dem 12. Tag nach Immunisierung konnte bis zum Versuchsende am Tag 16 im Mann-Whitney-U-Test ein signifikanter Unterschied zwischen den

Krankheitswerten \pm SEM der DTx- und der PBS-Behandlungsgruppe nachgewiesen werden. Von einem Vergleich zwischen der Wildtyp-Kontrollgruppe und der DTx-Gruppe wurde aufgrund der Tatsache abgesehen, dass kein Unterschied zwischen PBS- und Wildtyp-Kontrollgruppe detektiert werden konnte ($p = 0,956$).

Tab. 4: p-Werte des Mann-Whitney-U-Tests an den aufgeführten Tagen der aktiven EAE im Vergleich zwischen der CD11c-DTR DTx- (n = 6) vs. CD11c-DTR PBS-Gruppe (n = 7)

Tag	12	13	14	15	16
p-Wert	0,026	0,003	0,004	0,004	0,006

Tab. 5: Weitere Informationen zur EAE „Behandlung von Beginn bis Ende“

Mäuse			Klinische EAE			
	Antigen	Behandlung	Inzidenz	median day of onset*	mean max. score*	mean score #
CD11c-DTR→ C57BL/6	MOG ₃₅₋₅₅	DTx	6/6 ^a (100 %)	12,5 (10; 14)	3,08 \pm 1,56	0,72 \pm 0,39
CD11c-DTR→ C57BL/6	MOG ₃₅₋₅₅	PBS	3/7 ^a (42,9 %)	16 (14; 16)	1,5 \pm 0,87	0,08 \pm 0,15
C57BL/6→ C57BL/6	MOG ₃₅₋₅₅	DTx	2/7 ^a (28,6 %)	14,5 (14; 16)	2,5 \pm 0	0,10 \pm 0,17

* beinhaltet nur erkrankte Tiere

beinhaltet alle Tiere des Experimentes

n Anzahl der Tiere

Die Inzidenz der CD11c-DTR DTx-Gruppe liegt mit 100 % wesentlich höher als die der PBS-Gruppe mit 42,9 % und der Wildtyp-Kontrolle mit 28,6 %, sie zeigte jedoch im Exakten-Test nach Fisher keinen signifikanten Unterschied zwischen der DC11c-DTR PBS- und DTx-Gruppe ($p = 0,07$). Der Median in der Kategorie „Tag des Krankheitsausbruches“ (*median day of onset*, ab einem Score von ≥ 1) liegt in der DTx-Behandlungsgruppe am Tag 12,5 und somit früher im Vergleich zur PBS-Kontrolle am Tag 16. Hier konnte im Log-Rang-Test ein signifikanter Unterschied im Vergleich „Zeitpunkt des Krankheitsausbruches“ beider Gruppen festgestellt werden ($p = 0,001$). Weiter konnte ein höherer Mittelwert des maximalen Krankheitswertes (*mean max. score*) sowie ein höherer mittlerer Krankheitswert (*mean score*) bei DZ-depletierten Mäusen im EAE Verlauf nachgewiesen werden. Die PBS- sowie Wildtyp-Kontrollgruppe zeigten hingegen vergleichbare Werte auf. Hinsichtlich des Überlebens der Tiere im Gruppenvergleich zwischen Tieren der CD11c-DTR DTx- (66 %) und PBS-Gruppe (100 %) konnte ein Unterschied nachgewiesen werden, welcher sich jedoch im Log-Rang-Test als nicht signifikant herausstellte.

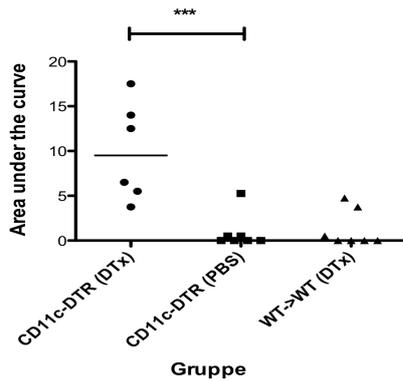


Abb. 10: Median der kumulativen Krankheitsaktivität im Verlauf der EAE (Gruppen: CD11c-DTR DTx (n = 6), PBS (n = 7) und WT (n = 7)). Dabei konnte in der einfaktoriellen Varianzanalyse eine signifikant höhere Krankheitsaktivität bei DTx-Tieren (n = 6) im Vergleich zur PBS-Gruppe (n = 7) ($p < 0,001$) sowie im Vergleich zur WT-Gruppe (n = 7) ($p < 0,001$) detektiert werden (nicht dargestellt). PBS- und WT-Gruppe zeigten im direkten Vergleich keinen signifikanten Unterschied ($p = 0,36$).

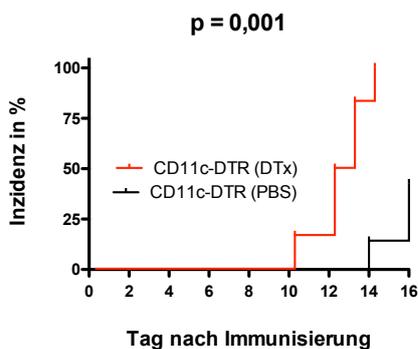


Abb. 11: Zeitraum bis zum Krankheitsausbruch der beiden Gruppen CD11c-DTR DTx (n = 6) und PBS (n = 7) in Prozent. Im Log-Rang (Mantel-Cox)-Test konnte ein **p-Wert** von **0,001** ermittelt werden. Hier wird zudem der frühere Anstieg sowie die 100-prozentige Inzidenz der DTx- im Vergleich zur PBS-Gruppe (42,9 %) deutlich.

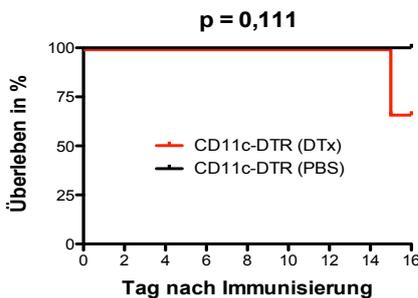


Abb. 12: Überleben der Tiere im Verlauf des Versuches. 100 % der CD11c-DTR PBS- (n = 7) sowie 66 % der CD11c-DTR DTx-Tiere (n = 6) waren am Tag 16 noch am Leben. Der p-Wert des Log-Rang (Mantel-Cox)-Tests lag bei $p = 0,111$.

Zusammenfassend konnten die oben aufgeführten Ergebnisse bezüglich der klinischen Daten reproduziert und bestätigt werden. Tiere mit intaktem dendritischem Zellkompartiment wiesen einen protektiven Effekt im Verlauf der EAE auf.

Ziel dieser Arbeit ist es, den Zeitraum des protektiven Effektes dendritischer Zellen während der aktiven EAE genauer zu untersuchen sowie besser einzugrenzen. Hierzu wurde eine Unterteilung der EAE in zwei Phasen vorgenommen:

1. Phase ist die sog. Initialisierungs- oder auch Primingphase, in der APZ durch Antigenpräsentation in Lymphknoten naive B- und T-Lymphozyten stimulieren und eine Immunreaktion initiieren. Durch Stimulation sind gereifte Lymphozyten daraufhin in der Lage, die Bluthirnschranke zu überwinden. Diese Phase umfasst grob den Zeitraum vom Tag der Immunisierung bis kurz vor dem Auftreten der ersten klinischen Krankheitszeichen.

2. Phase ist die sog. Effektorphase, in welcher gereifte T-Zellen im Zielorgan zu finden sind und ihren unterschiedlichen Funktionen in Abhängigkeit des vorliegenden T-Zell-Subtyps nachkommen. Diese Phase umfasst grob den Zeitraum ab dem Auftreten der ersten Krankheitszeichen der EAE.

3.1.2 Depletion DZ während der Initialisierungsphase der aktiven EAE

Um den protektiven Effekt dendritischer Zellen während der EAE genauer überprüfen zu können, wurde die Depletion einen Tag vor Immunisierung begonnen und bis zum Ausbruch der Erkrankung fortgesetzt. Hierzu wurden CD11c-DTR-Chimären per Zufall in Gruppen randomisiert und 24 Stunden nach Behandlung – mit entweder DTx oder PBS – immunisiert.

Als Ausbruch der EAE wurde ein Krankheitswert der Tiere zwischen einem Score von 1,5 – 2 gewertet. Dieser Auftakt konnte hier am Tag 15 der EAE identifiziert werden, woraufhin die Behandlung unterbrochen wurde. Das tägliche Überprüfen auf klinische Krankheitszeichen wurde weiterverfolgt.

Dieser Versuchsablauf ermöglicht es, die Funktion der dendritischen Zellen während der Anfangsphase der Immunantwort zu unterbinden, um sie dann zum Zeitpunkt der Effektorphase wieder entstehen zu lassen.

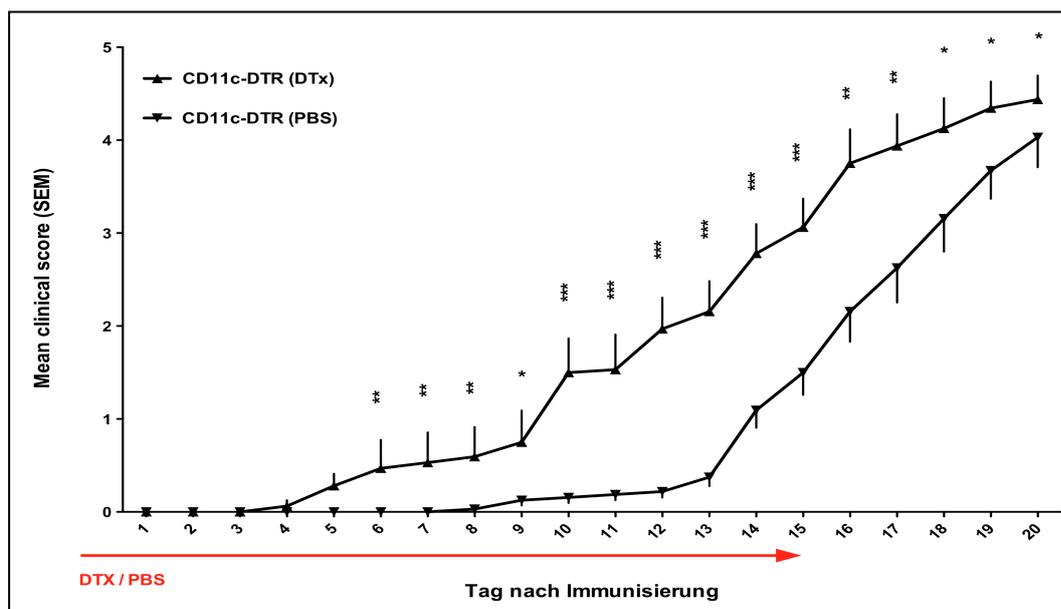


Abb. 13: Graphische Darstellung der DZ-Depletion von Beginn bis zum Krankheitsausbruch am Tag 15 der Versuchsgruppen CD11c-DTR DTx (n = 16) und CD11c-DTR PBS (n = 16). Der Vergleich CD11c-DTR DTx- vs. PBS-Gruppe im Mann-Whitney-U-Test ergab an den markierten Tagen folgende Signifikanzen:

* $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$

Die aktive EAE wurde in 32 CD11c-DTR→C57BL/6-Chimären induziert, welche einen Tag vor Immunisierung (Tag -1) bis zum Ende der EAE (Tag 15) alle 48 Stunden behandelt wurden. Der durchschnittliche Krankheitswert \pm SEM umfasst die Daten zweier gleich abgelaufener, unabhängiger Experimente und zeigte einen früheren Beginn sowie einen fulminanteren Verlauf der EAE in der DTx-Behandlungsgruppe (CD11c-DTR→C57BL/6 DTx n = 16) im Vergleich zu Tieren der PBS-Kontrollgruppe (CD11c-DTR→C57BL/6 PBS n = 16). Tiere der DTx-Gruppe zeigten einen Median in der Kategorie „Tag des Krankheitsausbruches“ von 10,5 und damit einen vier Tage früheren Beginn der Erkrankungsphase im Vergleich zur PBS-Behandlungsgruppe (Median am Tag 14,5).

Hinsichtlich der Inzidenz konnte kein Unterschied zwischen den Gruppen nachgewiesen werden. Der durchschnittliche Krankheitswert der DTx-Tiere ($1,81 \pm 0,80$) lag im Gesamtverlauf der EAE wesentlich höher als der der PBS-Gruppe ($0,97 \pm 0,40$). Im Mann-Whitney-U-Test konnte beim Vergleich der Krankheitswerte \pm SEM der DTx- gegenüber der PBS-Behandlungsgruppe ab dem 6. Tag nach Immunisierung ein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden.

Ergebnisse

Tab. 6: p-Werte an den aufgeführten Tagen der aktiven EAE im Vergleich der Behandlungsgruppen CD11c-DTR DTx (n = 16) vs. CD11c-DTR PBS (n = 16) im Mann-Whitney-U-Test

Tag	6	7	8	9	10–14	15	16	17	18	19	20
p-Wert	0,004	0,009	0,008	0,042	< 0,0001	0,001	0,003	0,005	0,013	0,021	0,025

Tab. 7: Weitere Informationen zur EAE „Behandlung von Beginn bis Ausbruch“

Mäuse			Klinische EAE			
	Antigen	Behandlung	Inzidenz	median day of onset*	mean max. score*	mean score #
CD11c-DTR→C57BL/6	MOG ₃₅₋₅₅	DTx	16/16 ⁿ (100 %)	10,5 (9; 15)	4,44 ± 1,03	1,81 ± 0,80
CD11c-DTR→C57BL/6	MOG ₃₅₋₅₅	PBS	16/16 ⁿ (100 %)	14,5 (13; 19)	4,03 ± 1,30	0,97 ± 0,40

* beinhaltet nur erkrankte Tiere

beinhaltet alle Tiere des Experimentes

n Anzahl der Tiere

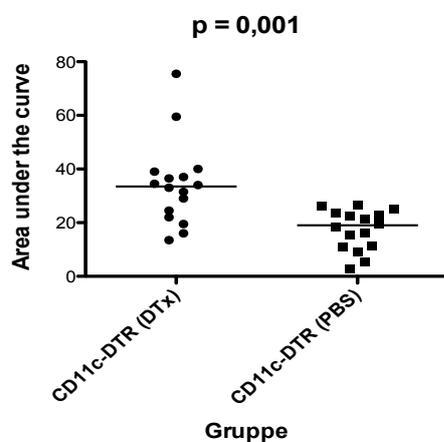


Abb. 14: Graphische Darstellung des Medians der kumulativen Krankheitsaktivität beider Behandlungsgruppen (CD11c-DTR DTx n = 16, CD11c-DTR PBS n = 16) im Verlauf der EAE. Wie schon im Kurvenverlauf kann hier ein erhöhter Gesamt-Krankheitswert im t-Test in der DTx- im Vergleich zur PBS-Gruppe gezeigt werden (**p = 0,001**).

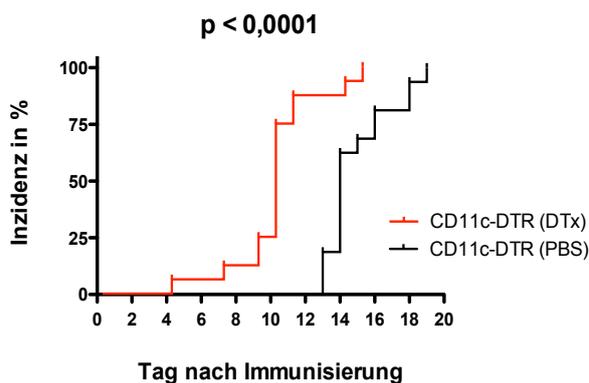


Abb. 15: Vergleich beider Behandlungsgruppen (CD11c-DTR DTx n = 16, CD11c-DTR PBS n = 16) in der Zeit bis zum Krankheitsausbruch über den Zeitraum der EAE. Hierbei stellt sich ein signifikant früherer Anstieg im Kurvenverlauf der DTx- gegenüber der PBS-Gruppe dar. Der im Log-Rang (Mantel-Cox)-Test ermittelte p-Wert betrug $p < 0,0001$.

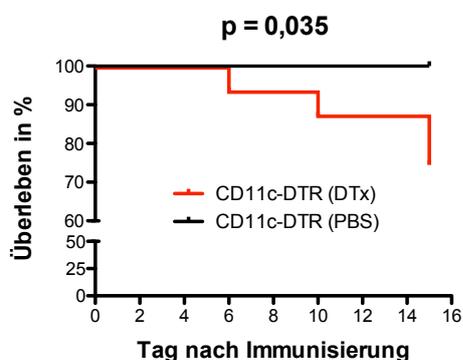


Abb. 16: Graphische Darstellung des Überlebens der Gruppen (CD11c-DTR DTx n = 16, CD11c-DTR PBS n = 16) in Prozent im Verlauf des Versuches. 100 % der PBS-Tiere sowie 75 % der DTx-Tiere waren am Tag 15 noch am Leben. Der p-Wert des Log-Rang (Mantel-Cox)-Tests lag bei $p = 0,035$.

3.1.2.1 Histologische Untersuchung der Versuchstiere

Um beweisen zu können, dass die aufgezeigten Unterschiede nicht auf eine andersartige Pathogenese zurückzuführen waren, wurden neben der statistischen Auswertung Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbungen sowie Luxol-Fast-Blue (LFB)-Färbungen von den angefertigten Gewebeschnitten der Mäuse beider Versuchsgruppen dieser EAE durchgeführt (vgl. 2.4). Bei der histopathologischen Kontrolle und Bewertung repräsentativer HE- und LFB-gefärbter Schnitte aus der lumbalen Rückenmarksregion (transversale Schnittführung) zeigten DTx- und PBS-Tiere qualitativ ähnliche Merkmale. Dabei wurden in der weißen Substanz Zeichen von Zellinfiltration und -akkumulation in der HE-Färbung sowie Zeichen von Demyelinisierung in der LFB-Färbung sichtbar.

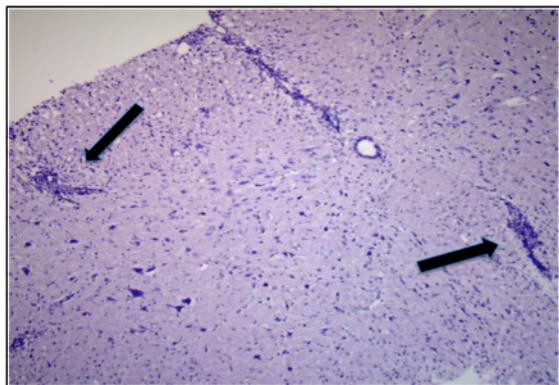


Abb. 17: HE-gefärbter Schnitt von einer mit **PBS** behandelten Maus in 10-facher Vergrößerung. Der Pfeil ist auf die violett erscheinende Zellinfiltration gerichtet, welche sich von der hell erscheinenden weißen Substanz abhebt (Transversalebene, lumbale Rückenmarksregion).

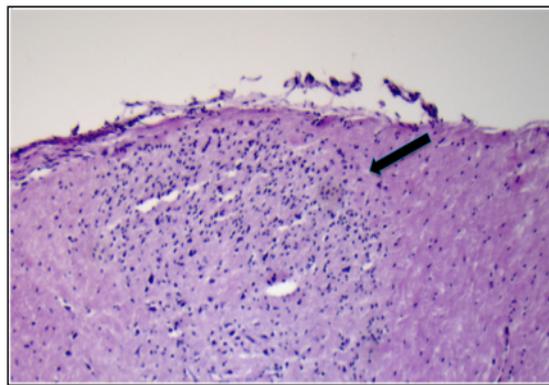


Abb. 18: HE-gefärbter Schnitt von einer mit **DTx** behandelten Maus in 10-facher Vergrößerung. Der Pfeil ist auf die violett erscheinende Zellinfiltration gerichtet, welche sich von der hell erscheinenden weißen Substanz abhebt (Transversalebene, lumbale Rückenmarksregion).

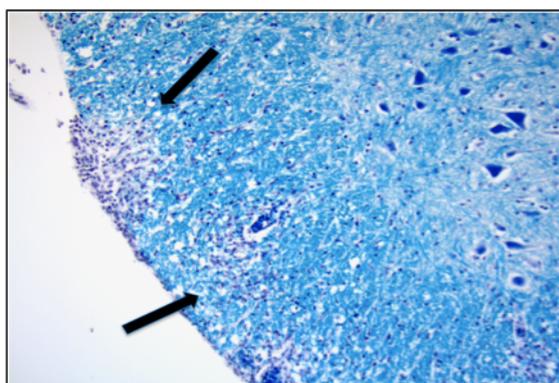


Abb. 19: LFP-gefärbter Schnitt von einer mit **PBS** behandelten Maus in 20-facher Vergrößerung. Die Pfeile zeigen hier auf die sich gräulich darstellende Demyelinisierungszone, welche mit Zellen durchsetzt vorliegt und sich von der blau erscheinenden weißen Substanz abhebt (Transversalebene, lumbale Rückenmarksregion).

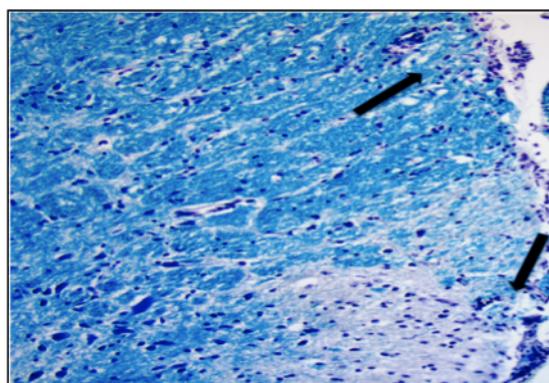


Abb. 20: LFP-gefärbter Schnitt von einer mit **DTx** behandelten Maus in 20-facher Vergrößerung. Die Pfeile zeigen hier auf die sich gräulich darstellende Demyelinisierungszone, welche sich von der blau erscheinenden weißen Substanz abhebt (Transversalebene, lumbale Rückenmarksregion).

3.1.3 Depletion DZ während der Effektorphase der aktiven EAE

Der protektive Effekt durch die Dendritischen Zellen während der Primingphase konnte in den zuvor beschriebenen Versuchen gesehen werden. Welchen Effekt würde jedoch eine Depletion während der Effektorphase hervorrufen?

Die Depletion nach abgelaufener Initialisierungsphase der Immunantwort ermöglicht es, die Auswirkung dendritischer Zellen nach dem T-Zell-Priming – in der Effektorphase (Phase 2) – zu untersuchen. Hierfür wurden die Tiere bei aufkommenden Krankheitswerten zwischen 1,5 – 2 in Gruppen mit entweder DTx- oder PBS-Behandlung randomisiert eingeteilt und zeitgleich alle 48 Stunden bis zum Versuchsabbruch behandelt.

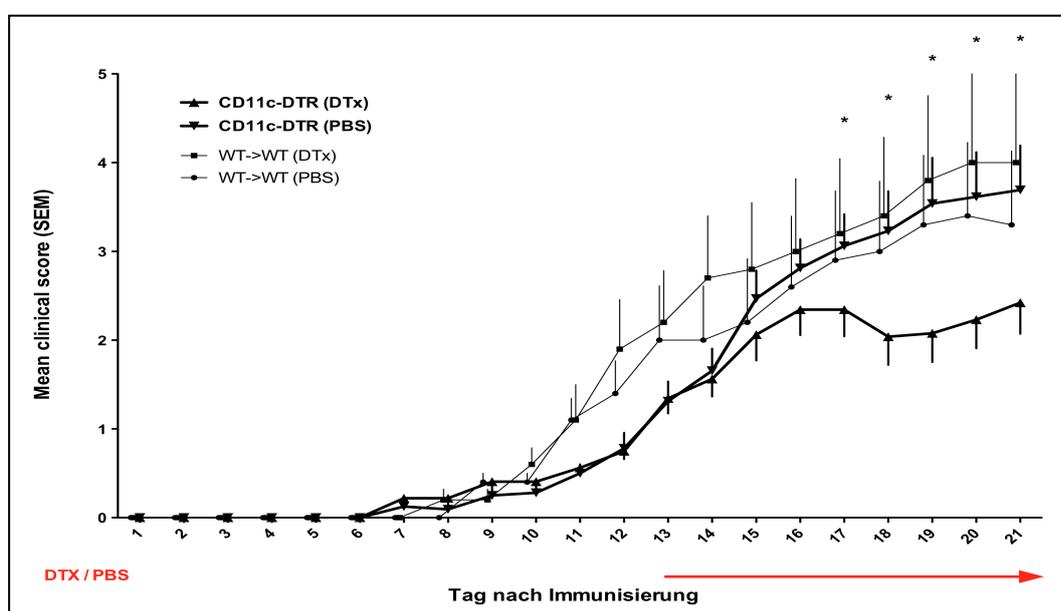


Abb. 21: Graphischer Verlauf der DZ-Depletion nach Ausbruch bis zum Ende der Erkrankung der Versuchsgruppen: CD11c-DTR DTx (n = 16) und PBS (n=16) sowie der C57BL/6-Kontrollgruppe DTx (n = 5) und PBS (n = 5). Zur besseren Übersicht wurden die Mittelwerte \pm SEM der Gruppe WT \rightarrow WT DTx um -0,1 und der Gruppe WT \rightarrow WT PBS um -0,2 verschoben. An den markierten Tagen wurde im Mann-Whitney-U-Test folgende Signifikanz nachgewiesen: * $p < 0,05$

Die aktive EAE wurde in 32 CD11c-DTR \rightarrow C57BL/6-Chimären und zur Kontrolle in zehn Wildtyp-Chimären C57BL/6 \rightarrow C57BL/6 induziert. Zum Zeitpunkt des Auftretens klinischer Krankheitszeichen (Tag 13) wurden die Mäuse anhand ihres Krankheitsgrades randomisiert in die Behandlungsgruppen CD11c-DTR DTx (n = 16), CD11c-DTR PBS (n = 16) sowie C57BL/6 DTX (n = 5) und C57BL/6 PBS (n = 5) eingeteilt und von diesem Zeitpunkt an alle 48 Stunden behandelt sowie auf klinische Krankheitszeichen untersucht. Der mittlere Krankheitswert (*mean clinical score*) \pm SEM umfasst die Daten zweier gleich abgelaufener, unabhängiger Experimente

und zeigt einen zeitgleichen Krankheitsausbruch bei allen Behandlungsgruppen sowie einen vergleichbar steilen Anstieg der Verlaufsgraphen. Ab Tag 17 konnte bis zum Versuchsende am Tag 21 im Mann-Whitney-U-Test ein signifikanter Unterschied zwischen mit DTx und PBS behandelten CD11c-DTR-Chimären gezeigt werden ($p < 0,05$).

Bei den CD11c-DTR-Chimären der DTx-Behandlungsgruppe kam es ab Tag 16 zu einer Unterbrechung der Progression im Verlauf der Erkrankung. In einzelnen Individuen der DTx-Behandlungsgruppe konnte sogar eine Verbesserung der klinischen Symptome detektiert werden. Am Tag 18 wurden jeweils drei Tiere der CD11c-DTR DTx- sowie der PBS-Behandlungsgruppe mit ähnlichem Krankheitsgrad aus dem Experiment entfernt und einer FACS-Zellanalyse unterzogen.

Tab. 8: Errechnete p-Werte an den jeweiligen Tagen der aktiven EAE

Tag	17	18	19	20	21
p-Wert	0,036	0,013	0,015	0,013	0,013

Tab. 9: Weitere Informationen zur EAE „Behandlung ab Ausbruch bis zum Ende“

Mäuse			Klinische EAE			
	Antigen	Behandlung	Inzidenz	median day of onset *	mean max. score *	mean score #
CD11c-DTR→C57BL/6	MOG ₃₅₋₅₅	DTx	14/16 ⁿ (87,5 %)	13 (7; 20)	2,81 ± 0,9	1,0 ± 0,56
CD11c-DTR→C57BL/6	MOG ₃₅₋₅₅	PBS	14/16 ⁿ (87,5 %)	13 (11; 15)	4,32 ± 1,06	1,31 ± 0,72
C57BL/6→C57BL/6	MOG ₃₅₋₅₅	DTx	4/5 ⁿ (80 %)	10,5 (10; 20)	5 ± 0	1,39 ± 0,78
C57BL/6→C57BL/6	MOG ₃₅₋₅₅	PBS	4/5 ⁿ (80 %)	11 (11; 16)	4,1 ± 0,89	1,33 ± 0,77

* beinhaltet nur erkrankte Tiere

beinhaltet alle Tiere des Experimentes

n Anzahl der Tiere

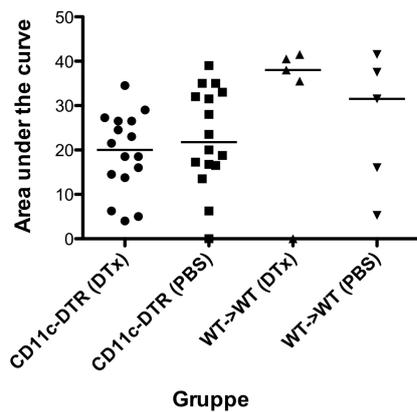


Abb. 22: Graphische Darstellung spiegelt den Median der kumulativen Krankheitsaktivität der Behandlungsgruppen CD11c-DTR DTx (n = 16) und PBS (n = 16) sowie der WT DTx (n = 5) und PBS (n = 5) im Verlauf der EAE wider. Dabei zeigt sich ein leichter, in der einfaktoriellen Varianzanalyse jedoch nicht signifikanter Unterschied zwischen den Behandlungsgruppen, wobei die CD11c-DTR DTx-Behandlungsgruppe den niedrigsten Wert aufweist.

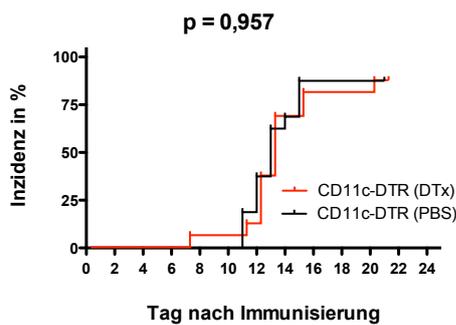


Abb. 23: Graphischer Verlauf des Zeitraums bis zum Krankheitsausbruch der CD11c-DTR DTx-(n = 16) und PBS-(n = 16) Behandlungsgruppen. Hier wird sowohl ein vergleichbarer Anstieg als auch die gleiche Inzidenz in beiden Gruppen deutlich. Der Log-Rang (Mantel-Cox)-Test ergab einen Wert von **p = 0,957**.

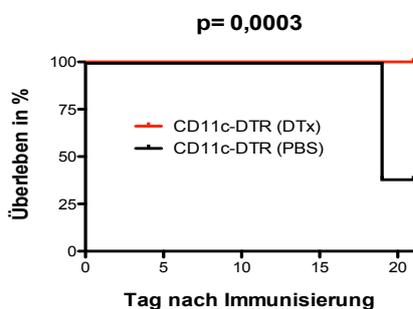


Abb. 24: Überleben der beiden Behandlungsgruppen während der EAE „Behandlung ab Ausbruch bis Ende“ in Prozent. Dabei lag das Überleben in der DTx-Gruppe bei 100 %, während Tiere der PBS-Gruppe nur zu 38,46 % überlebten. Der im Log-Rang (Mantel-Cox)-Test ermittelte p-Wert betrug **0,0003**.

Die Depletion der dendritischen Zellen während der Effektorphase führte also zu einem milderen EAE-Verlauf in der DTx-Behandlungsgruppe der CD11c-DTR-Chimären. Doch welchen Einfluss übt diese Depletion auf das Vorkommen anderer Zellen im Gehirn aus?

3.1.3.1 Durchflusszytometrische Analyse inflammatorischer ZNS-Infiltrate

Werr konnte in FACS-Analysen von Immunzellen aus inflammatorischen Infiltraten des ZNS während des Höhepunktes in der EAE „Behandlung von Beginn bis Ende“ eine ähnliche Verteilung an CD45⁺-, CD8⁺- sowie CD4⁺-T-Zellen in Gegenwart sowie in Abwesenheit dendritischer Zellen aufzeigen. Bei Betrachtung des Differenzierungsstatus aus dem ZNS isolierter CD4⁺-T-Zellen konnte durch die IFN- γ - und IL17-Expressionsanalyse ein erhöhtes Aufkommen an TH1- und TH17-Effektor-T-Zellen detektiert werden. In Verbindung mit der reduzierten regulatorischen FoxP3⁺-T-Zell-Zahl sprach Werr bei der Verschiebung der T-Zell-Differenzierung von einem proinflammatorischen Übergang, welcher für den fulminanteren Verlauf verantwortlich zu sein schien.

Um nun den milderen Verlauf der EAE nach Depletion dendritischer Zellen während der Effektorphase erklären zu können, wurden neben der Analyse der Krankheitswerte zusätzliche Analysen zur Differenzierung der inflammatorischen Zellinfiltration im ZNS durchgeführt. Hierzu wurden Mäusen (n = 3 pro Gruppe) das Rückenmark sowie das Gehirn entnommen und durch Aufbereitungsverfahren Immunzellen isoliert (vgl. 2.3.5.4). Durch FACS-Analysen konnten die unterschiedlichen Zellpopulationen voneinander differenziert betrachtet werden. Dabei fiel auf, dass weder eine Differenz in der Anzahl der CD4⁺-Zellen noch der CD4⁺-FoxP3⁺-Treg-Zellen im Gehirn nachgewiesen werden konnte. Sowohl die PBS- als auch die DTx-Behandlungsgruppe zeigte ähnliche Gesamtzellzahlen, so dass kein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden konnte.

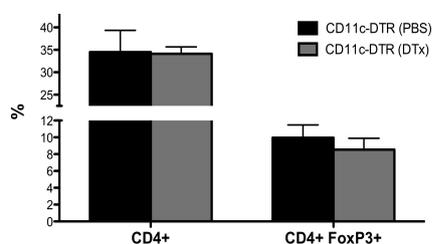


Abb. 25: Prozentualer Anteil (links) der CD4⁺- (DTx: 34.13 ± 1.534, PBS: 34.50 ± 4.857) sowie (rechts) der CD4⁺FoxP3⁺- (re.: DTx: 8.537 ± 1.345, PBS: 9.953 ± 1.519) Zellen an der gesamten isolierten Zellzahl aus dem aufbereiteten ZNS dreier Versuchstiere pro Gruppe. Aufgrund der geringen Anzahl an untersuchten Versuchstieren wurde hier auf weitere statistische Analysen verzichtet.

Bei der Betrachtung der IL17⁺- sowie der FoxP3⁺-Population beider Behandlungsgruppen in der Milz konnte eine leichte, nicht signifikante Erhöhung beider Populationen in den mit PBS behandelten Tieren aufgezeigt werden.

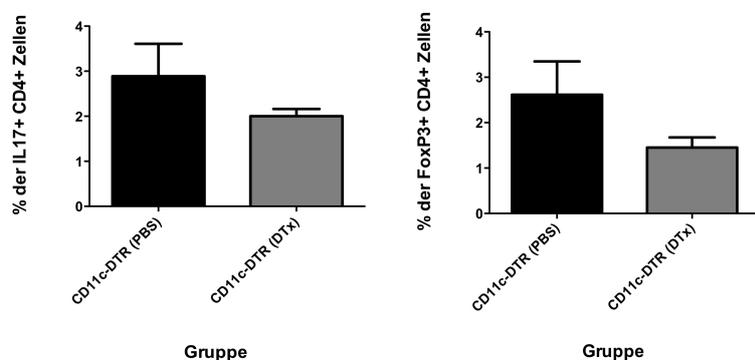


Abb. 26: Prozentualer Anteil an (links) IL17⁺-Zellen (PBS-Gruppe 2.890 ± 0.7182, DTx-Gruppe 2.003 ± 0.1586) sowie (rechts) prozentualer Anteil der FoxP3⁺-Zellen an den CD4⁺-Zellen (PBS-Gruppe 2.613 ± 0.7360, DTx-Gruppe 1.450 ± 0.2248), welche aus den Milzen dreier Tiere pro Gruppe gewonnen wurden.

Zudem war die Größe der TH17⁺-Zellpopulation der mit PBS behandelten Tiere im Vergleich zu den mit DTx behandelten Tieren bei der Untersuchung der ZNS-Immunzellen vergleichbar. Des Weiteren konnten in keiner der beiden Behandlungsgruppen IL-10-produzierende Zellen nachgewiesen werden.

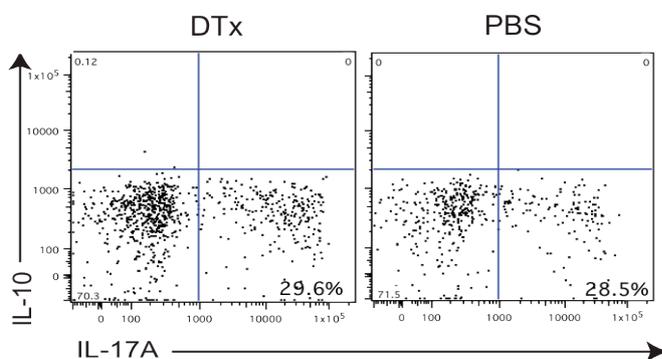


Abb. 27: FACS-Analyse IL-17A- sowie IL-10-produzierender Zellen im ZNS von drei Tieren beider Gruppen. Dabei beträgt der prozentuale Anteil der IL-17-produzierenden Zellen in der DTx-Gruppe 29.6 %, in der PBS-Gruppe 28.5 %. IL-10-produzierende Zellen konnten in keiner Behandlungsgruppe (n = 3) detektiert werden.

Da sowohl die protektiven Treg-Zellen als auch die schädlichen TH17⁺-Zellen in beiden Behandlungsgruppen ähnlich stark vertreten waren, lag der Verdacht nahe, dass der unterschiedliche klinische Verlauf bei den Versuchstieren beider Gruppen durch eine ungleiche DZ-Population innerhalb des ZNS zu erklären sei. Bei der FACS-Analyse der CD11c-GFP⁺-Zellen konnte eine Ungleichverteilung der dendritischen Zellen bestätigt werden. Tiere der PBS-

Gruppe wiesen im Durchschnitt einen siebenmal höheren prozentualen Anteil an dendritischen Zellen im ZNS auf (8,52 %) als Tiere der DTx-Gruppe (1,17 %).

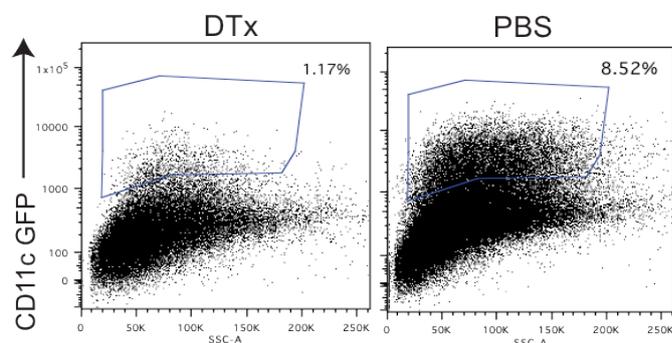


Abb. 28: FACS-Analyse von ZNS-Zellen der Behandlungsgruppen. Dabei wurde die Granularität der Zellen gegen die CD11c-GFP-Expression aufgetragen. Hier konnte ein Unterschied zwischen der PBS-Gruppe (n = 3, 8.52 %) im Vergleich zur DTx-Gruppe (n = 3, 1.17 %) aufgezeigt werden.

Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den Ergebnissen aus der passiven EAE, welche von J. Werr erzielt wurden. Durch den Transfer zuvor *in vitro* geprimter enzephalitogener T-Zellen konnte der Einfluss dendritischer Zellen auf sekundär lymphatische Organe während der Primingphase untersucht werden. Die enzephalitogenen T-Zellen (vgl. 2.3.6.1 sowie 2.3.7.2) wurden CD11c-DTR-Empfängerchimären mittels venöser Injektion übertragen. Beginnend einen Tag vor Zelltransfer bis Versuchsende, wurden die Tiere wie in der aktiven EAE mit entweder DTx oder PBS behandelt und der vorliegende Krankheitsgrad klinisch überprüft.

Werr konnte hier zeigen, dass es in Abwesenheit dendritischer Zellen in den mit DTx behandelten Tieren zu einer verringerten Krankheitsinzidenz sowie einem durchschnittlich verminderten Krankheitswert kam. FACS-Analysen zeigten hier, dass eine höhere Anzahl der transferierten TH17-Zellen in den Tieren nachgewiesen werden konnte, die ein intaktes DZ-Kompartiment aufwiesen. Zusätzlich konnten erhöhte Zellzahlen von regulatorischen T-Zellen in Gehirnen von Versuchstieren detektiert werden, welche DZ-Depletion aufwiesen.

3.1.3.2 Histologische Untersuchung der Versuchstiere

Um ausschließen zu können, dass die aufgezeigten Unterschiede auf eine andersartige Pathogenese zurückzuführen sind, wurden auch hier Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbungen sowie Luxol-Fast-Blue (LFB)-Färbungen von den angefertigten Gewebeschnitten durchgeführt (vgl. 2.4). Bei der histopathologischen Kontrolle und Bewertung repräsentativer HE- und LFB-gefärbter Schnitte aus der lumbalen Rückenmarksregion (transversale Schnittführung) zeigten DTx- und PBS-Tiere qualitativ ähnliche Merkmale. Dabei wurden Zeichen von Zellinfiltration

und -akkumulation in der HE-Färbung sowie Zeichen von Demyelinisierung in der LFP-Färbung in der weißen Substanz sichtbar.

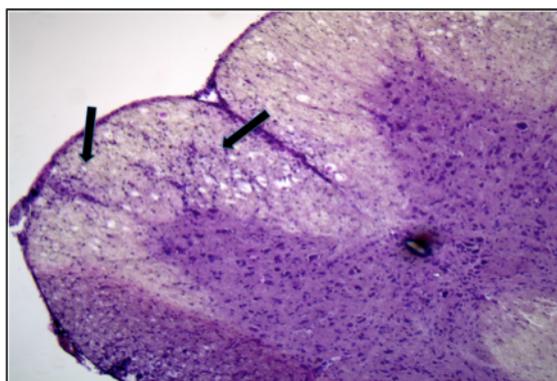


Abb. 29: HE-gefärbter Schnitt einer mit **PBS** behandelten Maus in 10-facher Vergrößerung. Der Pfeil ist auf die violett erscheinende Zellinfiltration gerichtet, welche sich von der hell erscheinenden weißen Substanz abhebt (Transversalebene, lumbale Rückenmarksregion).

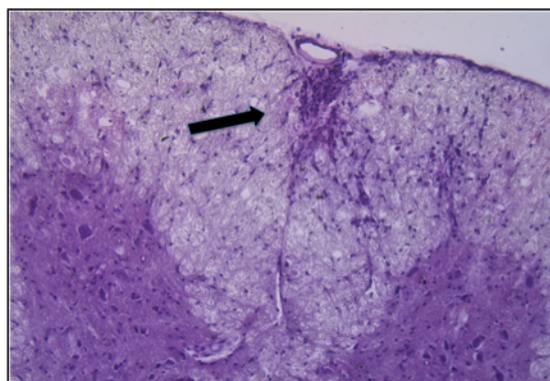


Abb. 30: HE-gefärbter Schnitt von einer mit **DTx** behandelten Maus in 20-facher Vergrößerung. Der Pfeil ist auf die violett erscheinende Zellinfiltration gerichtet, welche sich von der hell erscheinenden weißen Substanz abhebt (Transversalebene, lumbale Rückenmarksregion).

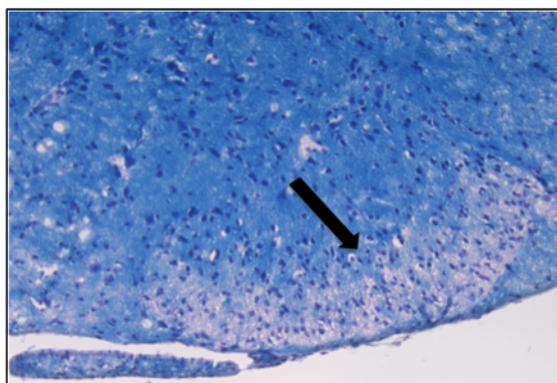


Abb. 31: LFP-gefärbter Schnitt von einer mit **PBS** behandelten Maus in 10-facher Vergrößerung. Der Pfeil zeigt hier auf die sich grülich darstellende Demyelinisierungszone, welche sich von der blau erscheinenden weißen Substanz abhebt (Transversalebene, lumbale Rückenmarksregion).

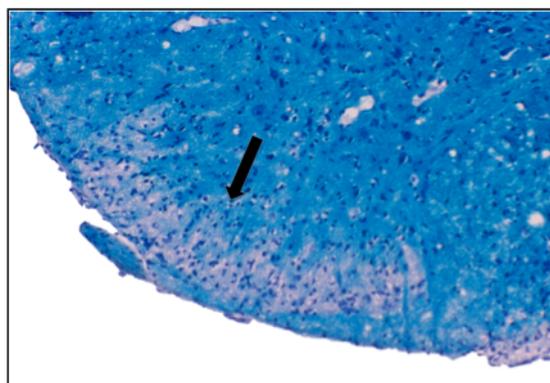


Abb. 32: LFP-gefärbter Schnitt von einer mit **DTx** behandelten Maus in 10-facher Vergrößerung. Der Pfeil zeigt hier auf die sich grülich darstellende Demyelinisierungszone, welche sich von der blau erscheinenden weißen Substanz abhebt (Transversalebene, lumbale Rückenmarksregion).

3.2 Krankheitsverlauf der *Knockout*-Chimären bei ausbleibender CD80/86-Kostimulation in der aktiven EAE

Anhand der Ergebnisse der aktiven EAEs konnte eine Verschlechterung der klinischen Krankheitszeichen bei Depletion dendritischer Zellen in der sog. Primingphase festgestellt werden, während die Depletion nach Krankheitsausbruch einen milderen EAE-Verlauf hervorrief. Die Interaktion zwischen dendritischen Zellen und T-Zellen ist durch einen umfassenden Komplex an Rezeptoren und Komolekülen gekennzeichnet, welche diese Zellen in eine einzigartige wechselseitige Beziehung zueinander stellt (Hubert et al. 2007). Neben den MHC-Klasse-Molekülen exprimieren dendritische Zellen u. a. B7-1 (CD80)- und B7-2 (CD86)-Moleküle auf ihrer Zelloberfläche, welche mit CD28- oder CTLA-4-Oberflächenmolekülen auf T-Zellen interagieren und somit zum Beispiel Einfluss auf die Induzierung von Effektor- oder Suppressorfunktionen in T-Zellen nehmen können.

Interessant war hierbei, ob der protektive Effekt der dendritischen Zellen in der Frühphase der Immunantwort auf einem antigenspezifischen Mechanismus beruhte oder durch kostimulatorische Moleküle hervorgerufen wurde. Um diesen Mechanismus näher untersuchen zu können, wurden MHC-II^{-/-}- sowie CD80/86^{-/-}-*Knockout*-Chimären generiert (2.3.4.2).

Durch die DTx-Applikation bei diesen *Knockout*-Chimären konnten dendritische Zellen generiert werden, welche das normale CD11c-Oberflächenmolekülrepertoire exprimierten, ausgenommen

a) CD80/86-kostimulatorische Moleküle (50 % CD11c-DTR+ 50 % CD80/86^{-/-}-Chimären)

oder

b) MHC-II-antigenspezifische Moleküle (50 % CD11c-DTR+ 50 % MHC-II^{-/-}-Chimären).

Hierzu wurden die verschiedenen Gruppen wie zuvor beschrieben, beginnend einen Tag vor Immunisierung bis zum Ende der EAE, alle 48 Stunden mit DTx oder PBS behandelt sowie auf klinische Krankheitszeichen hin untersucht.

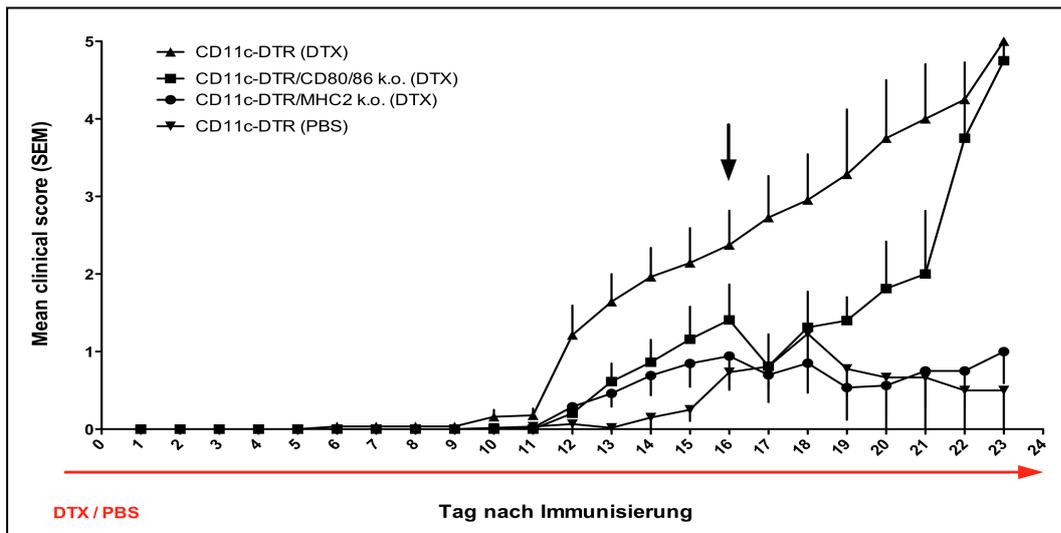


Abb. 33: Graphischer Verlauf der *Knockout*-Chimären nach Immunisierung sowie DZ-Depletion der Behandlungsgruppen während des Gesamtverlaufes der EAE: CD11c-DTR DTx (n = 14), CD11c-DTR PBS (n = 15), CD11c-DTR//CD80/86^{-/-} DTx (n = 11) und CD11c-DTR//MHC-II^{-/-} DTx (n = 13). Ein Teil der Tiere wurde an Tag 16 aufgearbeitet (siehe Pfeil →).

Aktive EAE wurde in insgesamt 63 Chimären induziert, von denen 29 reine CD11c-DTR→C57BL/6-Chimären waren (n = 14 CD11c-DTR DTx, n = 15 CD11c-DTR PBS), 10 Wildtyp-Kontroll-Chimären C57BL/6→C57BL/6 (n = 5 DTx, n = PBS) sowie 24 *Knockout*-Chimären (n = 11 CD11c-DTR//CD80/86^{-/-}, n = 13 CD11c-DTR//MHC-II^{-/-}). Hierbei wurde auf die Darstellung der Wildtyp-Kontrolle aus Gründen der Übersichtlichkeit verzichtet.

Die mittleren klinischen Krankheitswerte (*mean clinical scores*) ± SEM umfassen die Daten dreier gleich abgelaufener, unabhängiger Experimente und zeigen einen früheren Krankheitsausbruch der CD11c-DTR-Chimären, welche unter DTx-Behandlung standen (Tag 10), während die anderen Behandlungsgruppen zu einem vergleichbaren Zeitpunkt erste klinische Krankheitssymptome sowie einen ähnlichen Anstieg der Kurven zeigten. Beeindruckenderweise demonstrierten Tiere der MHC-II-*Knockout*-Gruppe sowie Tiere der CD11c-DTR PBS-Gruppe mit PBS einen ähnlichen Kurvenverlauf. Hier kam es in beiden Behandlungsgruppen im Versuchsverlauf zu einer Progression der Krankheitsdynamik.

Diese Tatsache deutet auf einen nicht antigenspezifischen protektiven Effekt der dendritischen Zellen hin. Bemerkenswerterweise beeinträchtigte die konditionelle Depletion der kostimulatorischen Moleküle CD80/86 aus dem Kompartiment der dendritischen Zellen deren Fähigkeit, den Krankheitsausbruch zu verhindern.

In der Anfangsphase zeigten diese Tiere einen im Vergleich zu den CD11c-DTR (DTx)-Chimären milderen Krankheitsverlauf, der sich aber bei voranschreitender Versuchsdauer an die Krankheitskurve der CD11c-DTR DTx-Tiere anglich.

Dieser leichte Unterschied kann auf die Expression der CD80/86^{+/+}-Oberflächenmoleküle anderer APZ zurückgeführt werden, welche in der Primingphase verminderte Zellzahlen aufwiesen. Interessanterweise konnte im Mann-Whitney-U-Test ein signifikanter Unterschied nicht nur zwischen der CD11c-DTR DTx- und der PBS-Gruppe nachgewiesen werden, sondern auch zwischen den CD11c-DTR//CD80/86^{-/-} DTx- und CD11c-DTR PBS-Tieren.

Dabei zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen der CD11c-DTR DTx- und PBS-Gruppe über den gesamten Verlauf des Versuches (differierend dabei über den Zeitverlauf, vgl. Tab. 10), während bei dem Vergleich zwischen der CD11c-DTR//CD80/86^{-/-} DTx- und CD11c-DTR PBS-Behandlungsgruppe signifikante Unterschiede nur temporär detektiert werden konnten (vgl. Tab.11).

Tab. 10: p-Werte des Mann-Whitney-U-Tests der CD11c-DTR DTx- (n = 14) verglichen mit der CD11c-DTR PBS-Behandlungsgruppe (n = 15) an den aufgeführten Tagen:

Tag	12	13 – 15	16	17	18	19	20	21	22	23
p-Wert	0,0003	< 0,0001	0,001	0,002	0,011	0,014	0,018	0,018	0,013	0,009

Tab. 11: p-Werte des Mann-Whitney-U-Tests CD11c-DTR//CD80/86^{-/-} DTx- (n = 11) verglichen mit CD11c-DTR PBS-Behandlungsgruppe (n = 15) an den aufgeführten Tagen:

Tag	12	13	14	15	19	22	23
p-Wert	0,048	0,001	0,002	0,009	0,049	0,013	0,001

Tab. 12: Weitere Informationen zur EAE „Knockout-Chimären“

Mäuse			Klinische EAE			
	Antigen	Behandlung	Inzidenz	median day of onset*	mean max. score*	mean score #
CD11c-DTR→C57BL/6	MOG ₃₅₋₅₅	DTx	13/14 ⁿ (92,86 %)	12 (10; 17)	4 ± 1,21	1,70 ± 0,77
CD11c-DTR→C57BL/6	MOG ₃₅₋₅₅	PBS	11/15 ⁿ (73,32 %)	16 (14; 20)	2,05 ± 0,72	0,25 ± 0,40
CD11c-DTR//CD80/86 ^{-/-} →C57BL/6	MOG ₃₅₋₅₅	DTx	10/11 ⁿ (90,1 %)	16,5 (13; 20)	3,75 ± 1,32	1,05 ± 0,52
CD11c-DTR//MHC-II ^{-/-} →C57BL/6	MOG ₃₅₋₅₅	DTx	9/13 ⁿ (69,23 %)	18 (12; 23)	2 ± 1	0,37 ± 0,49
C57BL/6→C57BL/6	MOG ₃₅₋₅₅	DTx	6/10 ⁿ (60 %)	14,5 (13; 18)	2,83 ± 1,81	0,74 ± 0,79

* beinhaltet nur erkrankte Tiere

beinhaltet alle Tiere des Experimentes

n Anzahl der Tiere

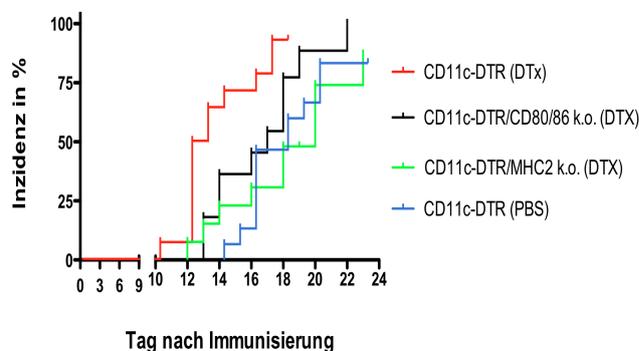


Abb. 34: Zeitraum bis zum Krankheitsausbruch der Gruppen CD11c-DTR DTx (n = 14) und PBS (n = 15) sowie CD11c-DTR//CD80/86^{-/-} (n = 11) und CD11c-DTR//MHC-II^{-/-} (n = 13) über den Zeitraum der EAE. Hier zeigte sich ein früherer Krankheitsausbruch der mit DTx behandelten CD11c-DTR-Chimären, welcher im Vergleich zu allen anderen Gruppen eine Signifikanz aufwies (vgl. Tab. 13). Vom Vergleich der übrigen Gruppen untereinander wurde aufgrund der Tatsache abgesehen, dass diese Gruppen Überschneidungen im Graphenverlauf aufzeigten.

Tab. 13: p-Werte des Log-Rank-Testes bei der Betrachtung des Zeitraumes bis zum Krankheitsausbruch über den Zeitraum der EAE. Im Gesamtvergleich aller Gruppen konnte eine Signifikanz von **p 0,0016** nachgewiesen werden.

Gruppen im Vergleich	p-Wert
CD11c-DTR (DTx) vs. CD11c-DTR (PBS)	0,005
CD11c-DTR (DTx) vs. CD11c-DTR//MHC-II ^{-/-}	0,002
CD11c-DTR (DTx) vs. CD11c-DTR//CD80/86 ^{-/-}	0,025

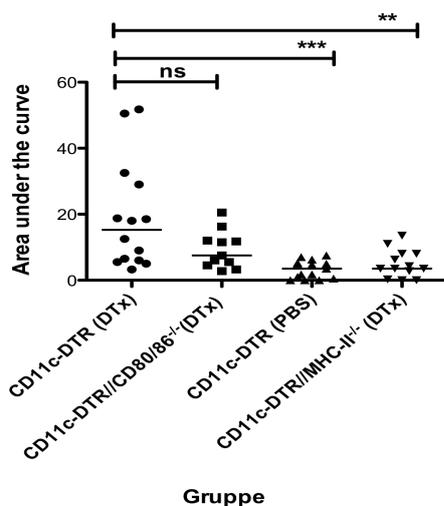


Abb. 35: Graphische Darstellung spiegelt den Median der kumulativen Krankheitsaktivität der Gruppen: CD11c-DTR DTx (n = 14) und PBS (n = 15) sowie CD11c-DTR//CD80/86^{-/-} (n = 11) und CD11c-DTR//MHC-II^{-/-} (n = 13) im Verlauf der EAE wider. Dabei zeigen sich in der einfaktoriellen Varianzanalyse signifikante Unterschiede zwischen den CD11c-DTR DTx- und PBS-Tieren (***) sowie den MHC-II^{-/-}-Tieren (**). Im Vergleich der CD80/86^{-/-}- und CD11cDTR DTx-Gruppe wurde kein signifikanter Unterschied gesehen.

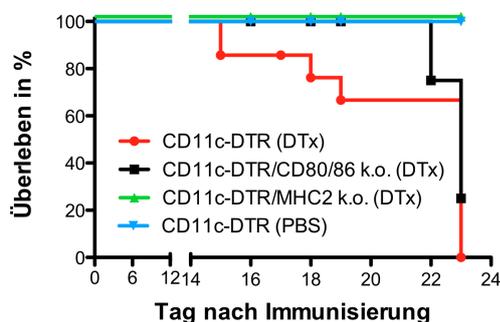


Abb. 36: Überleben in Prozent der Behandlungsgruppen CD11c-DTR DTx (n=14) und PBS (n=15) sowie CD11c-DTR//CD80/86^{-/-} (n = 11) und CD11c-DTR//MHC-II^{-/-} (n = 13) in der EAE. Von weiteren Berechnungen wurde hier abgesehen, da Tiere während des Verlaufs der EAE zur Durchführung von Zellanalysen entfernt wurden.

3.2.1 Verminderte FoxP3⁺CD4⁺-Zellen in Milz und ZNS bei CD80/86^(-/-)

Die Bewertung der Krankheitswerte der unterschiedlichen Behandlungsgruppen zeigte einen protektiven Effekt dendritischer Zellen, welcher durch die kostimulatorischen Oberflächenmoleküle CD80 und CD86 vermittelt zu sein schien. Um diesen Verdacht weiter zu untersuchen, wurden die IL17⁺- und FoxP3⁺-T-Zell-Zahlen in Milzen sowie innerhalb des ZNS der Versuchstiere bestimmt. Hierfür wurden am Tag 15 nach Immunisierung die Milz, das Gehirn sowie das Rückenmark randomisierter Versuchstiere entnommen und auf ihre FoxP3⁺CD4⁺-Zellen untersucht.

Interessanterweise wiesen Versuchstiere der CD80/86^(-/-)-Gruppe eine beeinträchtigte FoxP3⁺CD4⁺-Zellpopulation in der Milz auf, während Tiere der MHC-II^(-/-)-Gruppe – die während der EAE einen ähnlichen protektiven Effekt der dendritischen Zellen gezeigt hatten wie die PBS-Behandlungsgruppe – hier nun vergleichbare Treg-Zellzahlen aufwiesen, wie mit PBS behandelte CD11c-DTR-Chimären. Diese Ergebnisse weisen auf eine protektive Bedeutung der kostimulatorischen Moleküle bei der Stimulation regulatorischer T-Zellen durch dendritische Zellen während der Primingphase in der aktiven EAE hin.

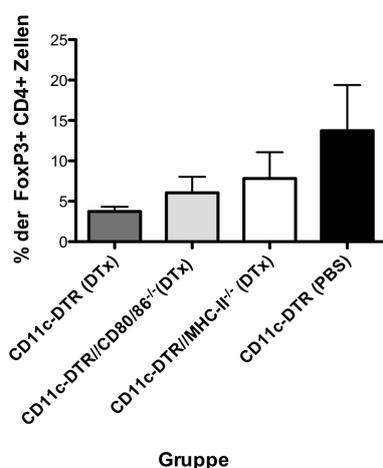


Abb. 37: FACS-Analysedaten des prozentualen Anteils der FoxP3⁺CD4⁺-Zellen aus Milzen (n = 6 pro Gruppe aus zwei gleich abgelaufenen, unabhängigen Experimenten) der Versuchstiere am Tag 16 nach Immunisierung. Dabei weisen Tiere der PBS-Gruppe ähnliche Werte wie Tiere der MHC-II^(-/-)-Gruppe auf, während die CD11c-DTR DTx- und die CD80/86^(-/-)-Gruppe verminderte Werte zeigen. In der einfaktoriellen Varianzanalyse konnte jedoch keine Signifikanz im Vergleich der Behandlungsgruppen festgestellt werden.

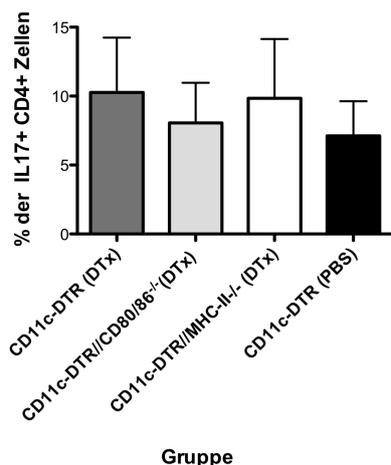


Abb. 38: FACS-Analysedaten des prozentualen Anteils der IL17⁺CD4⁺-Zellen aus Milzen (n = 6 pro Gruppe aus zwei gleich abgelaufenen, unabhängigen Experimenten) der Versuchstiere am Tag 16 nach Immunisierung. Dabei konnte zwischen den Behandlungsgruppen in der einfaktoriellen Varianzanalyse kein Unterschied detektiert werden.

Bei der Untersuchung der Zellzahlen innerhalb des ZNS wiesen Tiere der MHC-II^{-/-}-Gruppe eine erhöhte FoxP3⁺CD4⁺-Zellpopulation im Vergleich zu allen anderen Gruppen auf. Jedoch wiesen Tiere der PBS-Behandlungsgruppe unerwarteterweise wie Tiere der CD11c-DTR DTx- sowie der CD80/86^{-/-} DTx-Gruppe eine verringerte FoxP3⁺CD4⁺-Zellzahl auf, was in Beziehung zur geringen Anzahl der untersuchten Tiere gestellt werden sollte.

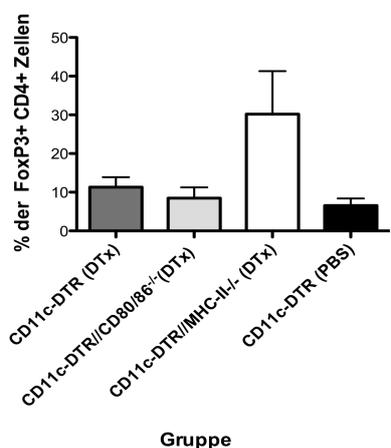


Abb. 39: FACS-Analysedaten des prozentualen Anteils der FoxP3⁺CD4⁺-Zellen aus dem ZNS der Versuchstiere am Tag 16 nach Immunisierung (n = 4 pro Gruppe aus zwei gleich abgelaufenen, unabhängigen Experimenten; aufgrund zu geringer Zellzahlen wurde die Zellsuspension dreier Tiere jeweils zusammengefügt/*gepoolt* und fließt jetzt als n = 1 in die Gesamtanzahl mit ein). Dabei konnte beim Vergleich der Behandlungsgruppen eine erhöhte FoxP3⁺-Zellzahl detektiert werden, welche jedoch im Gesamtvergleich der einfaktoriellen Varianzanalyse keinen signifikanten Unterschied zeigte **p = 0,0552**.

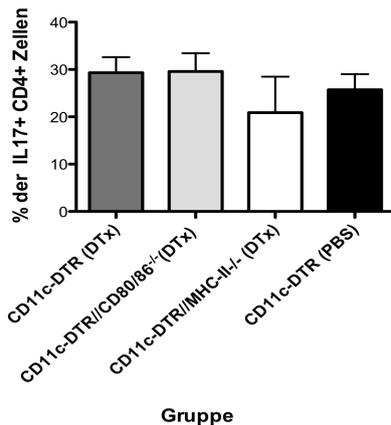


Abb. 40: FACS-Analysedaten des prozentualen Anteils der IL17⁺CD4⁺-Zellen aus dem ZNS (n = 4 pro Gruppe aus zwei gleich abgelaufenen, unabhängigen Experimenten) der Versuchstiere am Tag 16 nach Immunisierung. Dabei konnte kein signifikanter Unterschied in der einfaktoriellen Varianzanalyse, jedoch eine leichte Erhöhung der TH17⁺-Zellen in CD11c-DTR DTx- sowie CD80/86^{-/-}-Gruppe gezeigt werden.

3.2.2 Histologische Untersuchung der Versuchstiere

Um ausschließen zu können, dass die aufgezeigten Unterschiede auf eine andersartige Pathogenese zurückzuführen sind, wurden auch hier HE-Färbungen von den angefertigten Gewebeschnitte durchgeführt (vgl. 2.4). Bei der histopathologischen Kontrolle und Bewertung repräsentativer Schnitte konnten in beiden DTx-Gruppen (CD80/86^{-/-} und MHC-II^{-/-}) Zeichen von Zellinfiltration und -akkumulation in der HE-Färbung detektiert werden.

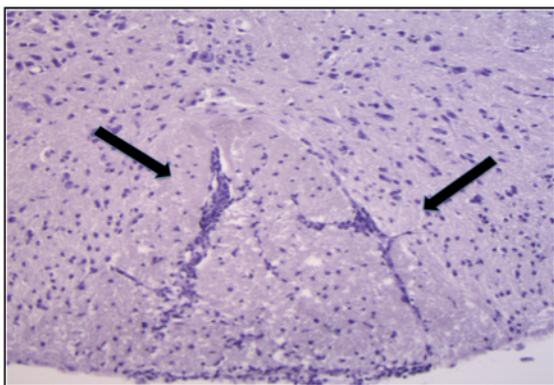


Abb. 41: HE gefärbter Schnitt von einer mit DTx-behandelten CD11c-DTR//CD80/86^{-/-}-Maus in 10-facher Vergrößerung. Die Pfeile sind auf die violett erscheinenden Zellinfiltrationen gerichtet, welche sich von der hell erscheinenden weißen Substanz abheben (Transversalebene, lumbale Rückenmarksregion).

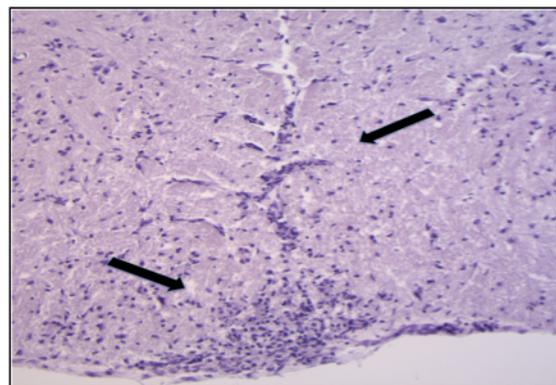


Abb. 42: HE gefärbter Schnitt von einer mit DTx-behandelten CD11c-DTR//MHC-II^{-/-}-Maus in 10-facher Vergrößerung. Die Pfeile sind auf die violett erscheinenden Zellinfiltrationen gerichtet, welche sich von der hell erscheinenden weißen Substanz abheben (Transversalebene, lumbale Rückenmarksregion).

3.3 In-vitro-FoxP3⁺-Generierungspotenzial dendritischer Zellen

In vivo konnten Hinweise auf eine protektive Bedeutung der kostimulatorischen Moleküle bei der Stimulation regulatorischer T-Zellen durch dendritische Zellen während der Primingphase in der aktiven EAE detektiert werden. Eine wesentliche Bedeutung in der Expansion FoxP3⁺-Zellen konnte in verschiedenen Veröffentlichungen dem Zytokin TGF- β nachgewiesen werden (Chen et al. 2003; Wahl and Wanjun 2005; Korn et al. 2007).

3.3.1 Erhöhte Treg-Induktionsrate bei steigender TGF- β -Konzentration

In den folgenden Versuchen sollte die FoxP3⁺-Zell-Expansion in Abhängigkeit der TGF- β -Konzentration untersucht werden. Hierfür wurde die Kapazität unterschiedlicher APZ-Populationen mit bzw. ohne dendritischen Zellanteil zur Induzierung FoxP3⁺-induzierter Treg-Zellen in Abhängigkeit von unterschiedlichen TGF- β -Konzentrationen miteinander verglichen. Wie unter 2.3.6.3 beschrieben, wurde der Zellsuspension – bestehend aus T-Zellen und APZ aus der Milz – eine TGF- β -Konzentration von a) 0 ng/ml, b) 0,3 ng/ml oder c) 3 ng/ml zugegeben und inkubiert. Hierbei wurde deutlich, dass in der PBS-Behandlungsgruppe (APZ aus der Milz mit intakter DZ-Population) eine Steigerung in der FoxP3⁺/CD25⁺-Expressionsrate bei zunehmender TGF- β -Konzentration erfolgte, welche in der DTx-Behandlungsgruppe nicht auftrat (DZ-depletierte APZ) (vgl. Abb. 43).

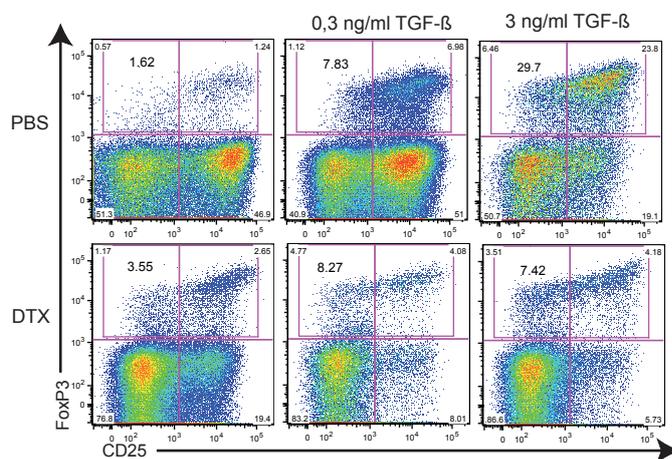


Abb. 43: FACS-Analysedaten zeigen den prozentualen Anteil der FoxP3- sowie die CD25-Expression der CD4⁺-Zellen bei steigender TGF- β -Konzentration in der DTx- und PBS-Behandlungsgruppe (prozentualer Anteil FoxP3⁺/CD25⁺-Zellen in der PBS-Gruppe bei 0 ng/ml TGF- β = 1,62 %, 0,3 ng/ml TGF- β = 7,83 % und 3 ng/ml TGF- β = 29,7 %; prozentualer Anteil FoxP3⁺/CD25⁺-Zellen in der DTx-Gruppe bei 0 ng/ml TGF- β = 3,55 %, 0,3 ng/ml TGF- β = 8,27 % und 3 ng/ml TGF- β = 7,42 %).

Dendritische Zellen wiesen in der Umgebung mit zunehmender TGF- β -Konzentration ein erhöhtes Potential auf, FoxP3⁺-regulatorische-T-Zellen zu generieren. Der gleiche Versuchsaufbau wurde für die Untersuchung der TGF- β -abhängigen Treg-Induktion durch APZ aus Lymphknoten verwendet. Auch hier wurden der Zellsuspension aus T-Zellen und APZ unterschiedliche Zytokinkonzentrationen zugesetzt, um daraufhin die Zellen auf ihre FoxP3⁺-Expression zu untersuchen. Interessanterweise konnte kein Unterschied beim Vergleich der Treg-Induktionsrate unter zunehmender TGF- β -Konzentration bei der Verwendung von APZ aus Lymphknoten der Tiere der DTx- und der PBS-Behandlungsgruppe detektiert werden.

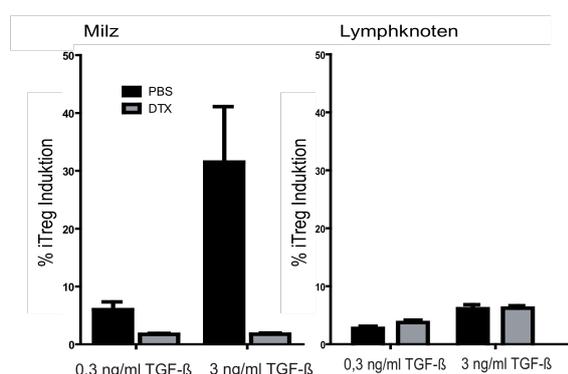


Abb. 44: Darstellung des prozentualen Anteils der FoxP3⁺-Zellen an CD4⁺-Zellen bei 0,3 ng/ml TGF- β und 3 ng/ml TGF- β aus APZ; Milz (links) und Lymphknoten (rechts).

3.3.2 Kostimulatorisch vermittelter protektiver Effekt dendritischer Zellen bei der FoxP3-Generierung

Um den Effekt der Treg-Induktion näher untersuchen zu können, wurde das Potential dendritischer Zellen mit entweder MHC-II^{-/-} oder CD80/86^{-/-} daraufhin untersucht, in wie weit aktivierte FoxP3⁺CD4⁺-Zellen in vitro generiert werden konnten.

Hierzu erhielten die Tiere der reinen CD11c-DTR-Chimären die Behandlung mit entweder DTx oder PBS einen Tag vor der Organentnahme. Am folgenden Tag fand die Entnahme der Milz statt, um durch die Zellisolation eine regulatorische T-Zell-Linie in Kultur zu generieren (vgl. 2.3.6.2). Hierbei wurden die verschiedenen Zellsuspensionen (CD11c-DTR DTx sowie PBS, CD80/86^{-/-} und MHC-II^{-/-}) hergestellt. Daran anschließend erfolgte die Herstellung eines Gemisches folgender Gruppen:

1. Gruppe: CD11c-DTR (DTx), **2.** Gruppe: CD11c-DTR (DTx) + CD80/86^{-/-} und CD11c-DTR (PBS) + CD80/86^{-/-}, **3.** Gruppe: CD11c-DTR (DTx) + MHC-II^{-/-} und CD11c-DTR (PBS) + MHC-II^{-/-} sowie **4.** Gruppe: CD11c-DTR (PBS).

Dabei wurde in den verschiedenen Gruppen jeweils die TGF- β -Konzentration zwischen 0 ng/ml, 0,3 ng/ml und 3 ng/ml variiert und die im Vorherigen beschriebene Zellgesamtzahl pro Vertiefung eingehalten. Nach drei Tagen in Kultur wurden die Zellen geerntet und einer FACS-Analyse unterzogen.

Wie erwartet konnten in allen Gruppen, welche die CD11c-DTR PBS-Zellen beinhalteten und somit intakte dendritische Zellen aufwiesen, bei ansteigender TGF- β -Konzentration höhere Konzentrationen an FoxP3⁺CD25⁺CD4⁺-Zellen nachgewiesen werden. In Zellsuspensionen, in denen CD11c-DTR (DTx)-Zellen enthalten waren und die mit Zellen aus den *Knockout*-Tieren vermischt wurden, kam der *Knockout* auf der Oberfläche dendritischer Zellen zum Tragen. Bei der Betrachtung der Gruppen, welche CD11c-DTR (DTx)-Zellen beinhalteten, gab es Unterschiede sowohl im Vergleich innerhalb der DTx-Gruppen als auch im Vergleich zur PBS-Gruppe.

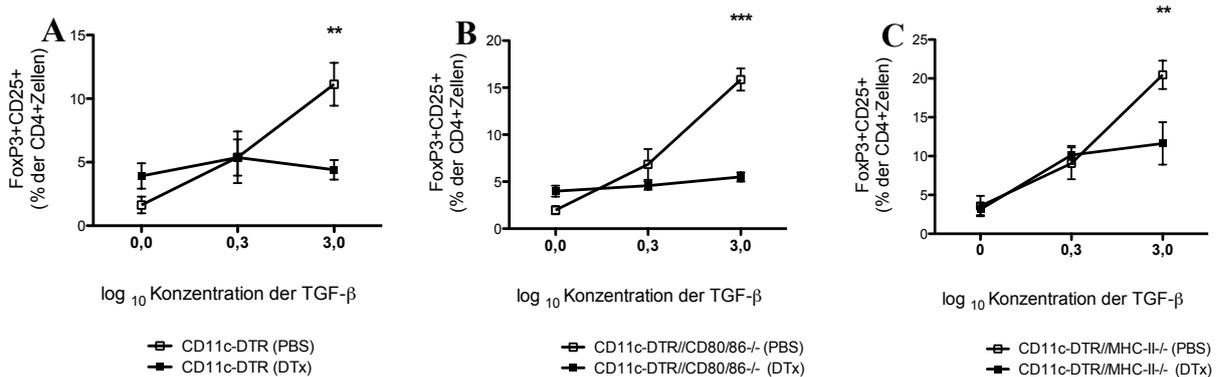


Abb. 45: Gegenüberstellung der unterschiedlichen *Knockout*-Gruppen

Teil A: FACS-Analysedaten des prozentualen Anteils der FoxP3⁺CD25⁺CD4⁺-Zellen in Abhängigkeit von der TGF- β -Konzentration in den CD11c-DTR-Chimären mit DTx- und PBS-Behandlung. Hier konnte bei 3 ng/ml TGF- β ein signifikanter Unterschied zwischen DTx- und PBS-Gruppe nachgewiesen werden ($p < 0,01$). **Teil B:** FACS-Analysedaten des prozentualen Anteils der FoxP3⁺CD25⁺CD4⁺-Zellen in Abhängigkeit von der TGF- β -Konzentration in den CD11c-DTR//CD80/86^{-/-}-Chimären. Hier konnte bei 3 ng/ml TGF- β ein signifikanter Unterschied zwischen DTx- und PBS-Gruppe nachgewiesen werden ($p < 0,001$). **Teil C:** FACS-Analysedaten des prozentualen Anteils der FoxP3⁺CD25⁺CD4⁺-Zellen in Abhängigkeit von der TGF- β Konzentration in den CD11c-DTR//MHC-II^{-/-}-Chimären. Hier konnte bei 3 ng/ml TGF- β ein signifikanter Unterschied zwischen DTx- und PBS-Gruppe detektiert werden ($p < 0,001$).

Bei der Betrachtung der reinen CD11c-DTR-Chimären mit entweder PBS- oder DTx-Behandlung konnte in der DTx-Gruppe nur ein minimaler Anstieg der FoxP3⁺CD25⁺CD4⁺-Zellen bei ansteigender TGF- β -Konzentration gesehen werden, während beim Vorkommen dendritischer Zellen in der PBS-Gruppe ein starker Anstieg beobachtet wurde.

In der Zellsuspension, in welcher dendritische Zellen keine CD80/86-Oberflächenmoleküle exprimierten (CD11c-DTR//CD80/86^{-/-} DTx), konnte abermals nur ein geringer Anstieg bei steigender TGF- β -Konzentration gesehen werden im Vergleich zur Zellsuspension, welche intakte dendritische Zellen aufwies (CD11c-DTR//CD80/86^{-/-} PBS).

Interessanterweise trat dieser Unterschied zwischen DTx- und PBS-Behandlung in der MHC-II^{-/-}-Zellsuspension nicht so eindrücklich in Erscheinung wie in den Gruppen zuvor. Hier konnte trotz fehlender MHC-Klasse-II-Moleküle auf dendritischen Zellen (CD11c-DTR//MHC-II^{-/-}-DTx) ein Ansteigen der FoxP3⁺CD25⁺CD4⁺-Zellen detektiert werden, welcher jedoch schwächer im Vergleich zur Kontrolle mit intakten dendritischen Zellen (CD11c-DTR//MHC-II^{-/-}-PBS) ausfiel. Zwar liegt der hier beschriebene In-vitro-Effekt nicht in vergleichbarer Ausprägung vor wie in den vorausgegangenen In-vivo-Daten; insgesamt können die Daten jedoch ähnlich eingeordnet werden und weisen dabei auf einen kostimulatorisch vermittelten protektiven Effekt dendritischer Zellen bei der FoxP3-Generierung hin.

4 DISKUSSION

Tiere der verschiedenen Mausmodelle, in denen die EAE induziert wird, weisen – ähnlich wie Patienten, die an einer MS erkranken – ein weites Spektrum an Heterogenität auf, in Bezug auf die Ausprägung klinischer Symptome, den Verlauf der Erkrankung und auch auf die Sensibilität, auf bestimmte Therapieschemata anzusprechen. In einer komplexen Erkrankung wie der Multiplen Sklerose, in der sowohl die Ursachen als auch die Pathogenese bis heute noch nicht vollkommen verstanden sind, ist es umso wichtiger, sich einer Bandbreite an Möglichkeiten zu bedienen, um die Fortschritte, welche in den vergangenen 20 Jahren in der Therapieentwicklung verzeichnet werden konnten, weiter auszubauen. Den Erkenntnissen aus EAE-Studien ist es letztendlich zu verdanken, dass den MS-Patienten seit 1996 die Medikamente Glatirameracetat, Mitoxantron und Natalizumab für die therapeutische Interventionen zur Verfügung stehen (Gold et al. 2006; Steinman and Zamvil 2006a).

Über die Modulation der unterschiedlichen T-Zell-Aktivierungszustände sind dendritische Zellen in der Lage, sowohl über protektive als auch inflammatorische Wirkungsweisen erheblichen Einfluss auf den Verlauf einer Immunreaktion zu nehmen. Doch inwieweit wird dieser Einfluss nur in bestimmten Phasen der Immunantwort ausgeübt? Die Untersuchung der Funktion dendritischer Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten des EAE-Krankheitsverlaufs stellt im Wesentlichen das zentrale Ziel dieser Arbeit dar. Durch ein besseres Verständnis grundlegender neuroimmunologischer Zusammenhänge im Tiermodell sollte ein kleiner Beitrag zur Entwicklung neuer klinisch-orientierter Therapien geleistet werden.

Die Aktivierung enzephalitogener, myelinreaktiver T-Zellen, welche eine weite Bandbreite an inflammatorischen Kaskadereaktionen auslöst und letztendlich in einer Demyelinisierung und in einem axonalen Zellverlust von Nervenfasern münden kann, wird als einer der wichtigsten Ausgangspunkte in der Entwicklung der Multiplen Sklerose angesehen. Dendritische Zellen nehmen dabei sowohl im Menschen als auch in Tiermodellen, wie der EAE, eine Schlüsselrolle in der Initiierung, der Aufrechterhaltung sowie in der Modulation der neuroinflammatorischen Kaskade ein und stellen einen wichtigen therapeutischen Angriffspunkt in der Behandlung der MS dar (Zozulya et al. 2010). Die Bedeutung antigenpräsentierender Zellen in der Regulierung neuroinflammatorischer Prozesse im ZNS konnte u. a. durch Erkenntnisse zum Wirkungsmechanismus zweier für die Therapie der Multiplen Sklerose zugelassener Medikamente (Glatirameracetat und Interferon- β) gezeigt werden (Weber et al. 2007; Prinz et al.

2008). Die Autoren belegen in den genannten Veröffentlichungen, dass die beiden Medikamente über die Beeinflussung myeloider Zellen (Monozyten und Makrophagen) zu einer Modulation der inflammatorischen Autoimmunreaktion führen.

4.1 Funktion dendritischer Zellen in Autoimmunerkrankungen

Die Entwicklung von Autoimmunerkrankungen wird normalerweise durch bestimmte Schutzmechanismen verhindert. Zum Einen werden potentiell gefährliche T-Zellen im Thymus durch die Hilfe antigenpräsentierender DZ aussortiert. Zum Anderen wird sowohl die Aufrechterhaltung der sog. peripheren Selbst-Toleranz als auch die Kontrolle der organspezifischen Autoimmunität durch die Suppression und Deletion autoreaktiver T-Zellen über die Interaktion dendritischer Zellen mit regulatorischen T-Zellen gewährleistet (Steinman and Nussenzweig 2002; Sakaguchi 2005). Durch Arbeiten an Tiermodellen konnte gezeigt werden, dass eine Störung dieses sensiblen Systems zum Ausbruch systemischer Autoimmunerkrankungen führen kann (Sakaguchi et al. 1985). Auch in der Multiplen Sklerose beim Menschen wurde ein Zusammenhang zwischen einer gestörten Treg-Balance und dem Krankheitsausbruch beschrieben (Viglietta et al. 2004). Das wechselseitige System, in welchem Toleranz fördernde regulatorische T-Zellen und proinflammatorische Th17-Zellen auf die gegenseitige Differenzierung Einfluss nehmen und somit den Schutz oder den Untergang von Zellen bewirken, verdeutlicht die Notwendigkeit eines besseren Verständnisses dieses sensiblen Gleichgewichts (Bettelli et al. 2006; Langrish et al. 2005).

Inwieweit die Interaktionen zwischen dendritischen Zellen und T-Zellen in Abhängigkeit zum Phänotyp der dendritischen Zellen stehen, ist gegenwärtig umstritten. Bisher war man der Ansicht, dass dendritische Zellen vor allem durch das Potenzial zur Induktion verschiedener T-Zellpopulationen in Abhängigkeit ihres Reifezustandes gekennzeichnet wären. Steinman und Nussenzweig gehen zu Beginn des 21. Jahrhunderts davon aus, dass unreife DZ im *Steady State* des Immunsystems – in der Abwesenheit Pathogen-assoziiertes molekularer Muster (PAMP), welche auf einem breiten Spektrum an Mikroorganismen exprimiert werden – das körpereigene „Selbst“ immunologisch definieren und somit die Induktion einer Autoimmunantwort durch periphere Toleranzentwicklung verhindern bzw. unterdrücken würden. Dies könnte durch die Deletion autoreaktiver Lymphozyten in der Peripherie oder während der Thymusselektion, aber auch durch die Induktion von regulatorischen T-Zellen durch DZ gewährleistet werden. DZ-Reifung geschieht nicht nur unter infektiösen Bedingungen, sondern kann auch bei nicht-infektiösen Schädigungen wie zum Beispiel nach einem Trauma nachgewiesen werden.

Gegenwärtig werden auch sog. *damage-associated molecular patterns* (DAMPs) – wie endogene intrazelluläre Moleküle und extrazelluläre Matrixmoleküle –, welche die Aktivierung von TLR hervorrufen, für die Induzierung einer inflammatorischen Genexpression verantwortlich gemacht. Sie informieren das Immunsystem sowohl über Gewebeschäden durch „sterile“ Verletzungen, z. B. bei einem Schlaganfall, oder auch über Gewebeläsionen, welche in Verbindung mit Entzündungsreaktionen entstehen (Piccinini and Midwood 2010).

Im Kontext von leicht-/geringgradigen bzw. nicht infektiösen Schädigungen des Körpers sind DZ in der Lage – abhängig vom betreffenden Organ –, die Immunantworten zu supprimieren. Diese DZ üben dabei eine regulatorische Modulationsfunktion aus und sind phänotypisch von unreifen DZ abzugrenzen (Zozulya et al. 2010). Sie exprimieren eine ausgeprägte Kombination an kostimulatorischen und koinhibitorischen Oberflächenmolekülen, welche zur peripheren Toleranz- und regulatorischen T-Zell-Entwicklung beitragen (Menges et al. 2002).

Von einer klaren Abgrenzung zwischen den Funktionen bei der Reifeentwicklung dendritischer Zellen wird zum gegenwärtigen Zeitpunkt jedoch Abstand genommen. Mittlerweile wird die Dichotomie des Reifungsprozesses dendritischer Zellen nicht mehr als Wandel von „Toleranzinduktion“ zu „proinflammatorischer Immunreaktion“ gesehen, wie es von Reis e Sousa beschrieben wurde (Reis e Sousa 2006). Albert und Mitarbeiter verdeutlichten zum Beispiel, dass DZ, welche funktionell wie auch phänotypisch „reifen“ DZ ähnelten, für die Toleranzentwicklung von CD8⁺-T-Zellen verantwortlich seien (Albert et al. 2001).

Unklar ist zudem, wann und wie weit dendritische Zellen eher protektiv oder destruierend auf den Verlauf der Neuroinflammation im ZNS einwirken. Zum Einen konnte gezeigt werden, dass sowohl die Heftigkeit der EAE als auch die Anzahl der Plaques in Läsionen von MS-Patienten mit dem Auftreten und dem funktionellen Status der dendritischen Zellen korreliert (Greter et al. 2005; Pashenkov et al. 2001). Gleichzeitig veröffentlichte die Gruppe um Hawinger Ergebnisse aus Studien, in denen dendritische Zellen, die in vivo mit dem MOG-Peptid beladen wurden, eine Form der peripheren T-Zell-Toleranz hervorriefen und somit den Ausbruch der EAE verhinderten (Hawiger et al. 2004). Laouar et al. beschrieben zudem eine Verstärkung der EAE-assoziierten T-Zell-Antwort bei Inaktivierung des TGF- β -Signalweges in dendritischen Zellen mit verstärkter inflammatorischer Reaktion im ZNS, erhöhten Zahlen an proinflammatorischen T-Zellen sowie dem Ausbleiben der typischen Remissionsphasen (Laouar et al. 2008). Die Inaktivierung dieses Signalweges hätte eine empfindliche Störung der Treg-DZ-Interaktion zur Folge, wodurch die beschriebene Verstärkung des EAE-Verlaufs erklärt werden könnte.

Ex-vivo-Untersuchungen können bei der Untersuchung komplexer Zusammenhänge im Organismus nur limitierte Aussagen über die vielschichtigen immunpathologischen Interaktionen liefern. Durch die Verwendung des CD11c-DTR-GFP-Modells in C57BL/6-Mäusen konnte in dieser Arbeit jedoch eine konditionelle Depletion dendritischer Zellen während unterschiedlicher Stadien des Krankheitsverlaufes der aktiven EAE in vivo durchgeführt werden, um die daraus resultierenden Auswirkungen zu verdeutlichen und besser verstehen zu können.

4.2 Auswirkung der DZ-Depletion

Die Antigenpräsentation dendritischer Zellen im *Steady State* bewahrt die Toleranz gegenüber dem eigenen Organismus durch die Überführung autoreaktiver T-Zellen in die Apoptose, die Induzierung des anergischen Zustandes oder durch die Expansion antigenspezifischer regulatorischer T-Zellen (Yamazaki et al. 2003). Kommt es jedoch zur Aktivierung dendritischer Zellen bei der Konfrontation mit immunreaktiven Komponenten wie TLR, Fc-Rezeptor-Signalen oder inflammatorischen Zytokinen wird eine Immunantwort als Abwehrreaktion eingeleitet (Steinman and Nussenzweig 2002). Die wichtige Funktion dendritischer Zellen in der Initiierung einer Abwehrreaktion gegenüber feindlichen Pathogenen würde die Vermutung begründen, ein Verlust dendritischer Zellen hätte ein Fehlen von Immunreaktionen zur Folge.

Im Jahr 2008 veröffentlichte die Gruppe um Jung die Ergebnisse einer Versuchsreihe mit Mäusen, welche kongenital einen Mangel an klassischen dendritischen Zellen (cDZ) aufwiesen. Überraschenderweise waren das T-Zell-Kompartiment, die T-Zell-Homöostase, die negative Selektion im Thymus sowie die Generierung von natürlichen regulatorischen T-Zellen durch das kongenitale Fehlen der DZ nicht beeinträchtigt. Überraschend war zudem, dass durch das Defizit an dendritischen Zellen ein myeloproliferatives Syndrom in den Tieren hervorgerufen wurde, das mit einem Übergang in Richtung myeloider Zellvermehrung mit zusätzlichen Zeichen der Zellinfiltration in nicht lymphoiden Organen – wie Nieren und Leber – sowie einer Lymphadenopathie einherging (Birnberg et al. 2008). Ohnmacht et al., welche einen ähnlichen Versuchsablauf durchgeführt hatten, beschrieben hingegen eine durch die fortwährende Depletion dendritischer Zellen hervorgerufene Zäsur in der CD4⁺-vermittelten T-Zell-Toleranzentwicklung, welche die Entwicklung spontaner Autoimmunreaktionen hervorrief (Ohnmacht et al. 2009). Ein Fehlen dendritischer Zellen von Geburt an würde demnach eine ganz andere Auswirkung auf das Immunsystem haben als anfänglich vermutet. Doch welche

Auswirkung hat eine zeitlich begrenzte Depletion dendritischer Zellen während einer EAE auf einen Organismus ohne kongenitale Veränderungen?

4.2.1 Verlust der immunregulatorischen Funktion dendritischer Zellen zu Beginn der aktiven EAE

Interessanterweise konnte in unserer Arbeitsgruppe in aktiven durch MOG₃₅₋₅₅-Peptid induzierten EAE-Versuchen gezeigt werden, dass es durch die Depletion dendritischer Zellen während der Initiierungs- bzw. Prägungsphase der autoreaktiven T-Zellen zu einer einseitigen Beeinträchtigung in der Generierung von induzierten Treg-Zellen kommt, während die Th17-Zellpopulation unbeeinflusst vorlag (unveröffentlichte Daten aus Voss, Siffrin, Werr et al.). Hier konnte ein Fehlen des sonst so charakteristischen Anstieges der induzierten Treg-Zahl in der Milz und nachfolgend im ZNS detektiert werden. Die konditionelle Depletion dendritischer Zellen während der durch MOG₃₅₋₅₅-Peptide induzierten aktiven EAEs verdeutlicht eine wichtige regulatorische Rolle dendritischer Zellen in vivo in der Generierung regulatorischer T-Zellen in der Peripherie, welche unter 3.1.1 bestätigt werden konnte. Durch die zielgerichtete Wirkung des DTx auf Zellen, welche das Oberflächenmolekül CD11c in erhöhtem Maße exprimieren, kann der protektive Effekt den klassischen DZ zugeschrieben werden. Plasmazytoide DZ, welche CD11c-Oberflächenmoleküle nur in relativ geringer Konzentration exprimieren, blieben demnach von der Depletion zum größten Teil verschont (vgl. 1.3.2, Tab. 1).

In der EAE, wie auch in der Multiplen Sklerose, korreliert der Schweregrad bzw. die Gradation der Erkrankung mit dem Ausmaß sowie dem Differenzierungsgrad der CD4⁺-T-Zellen. Gerade die als äußerst proinflammatorisch beschriebenen Th17⁺-T-Zellen werden für die immunologische Neuroinflammation verantwortlich gemacht (Hofstetter et al. 2007; McFarland and Martin 2007). Die Verschiebung im Treg-T-Effektorzellgleichgewicht zu Gunsten der proinflammatorischen Th17-Zellen im ZNS führte in Versuchen dieser Arbeit, wie auch bei J. Werr, zu einer fulminanteren Schädigung von neuronalen Strukturen im ZNS und resultierte in einem ausgeprägten Krankheitsverlauf mit erhöhter Mortalität.

Diese neuen Erkenntnisse finden dabei Angliederung an das Verständnis, dass DZ in der Lage sind, regulatorische T-Zellen in vitro zu stimulieren und dadurch die Entwicklung von Autoimmunerkrankungen inhibieren zu können (Tarbell et al. 2006). Yamazaki et al. konnten in verschiedenen Versuchsreihen die ausgeprägte Bedeutung dendritischer Zellen bei der Entstehung regulatorischer T-Zellen verdeutlichen. Das Wachstum CD25⁺CD4⁺-regulatorischer

T-Zellen ist dabei neben dem Vorhandensein von IL-2 auf die DZ-T-Interaktion angewiesen und maßgeblich bestimmt (Yamazaki et al. 2003). Bemerkenswerterweise zeigten sowohl unreife als auch reife DZ in vitro die Fähigkeit, aus FoxP3⁻-Vorläuferzellen unter der Zugabe von TGF- β antigenspezifische FoxP3⁺ regulatorische T-Zellen zu generieren (Yamazaki et al. 2007).

Interessanterweise belegt die Arbeit von Werr einen vorzeitigen Krankheitsausbruch bei Tieren mit kontinuierlicher DZ-Depletion, welcher auch unter 3.1.1 beschrieben wurde. Diese vorzeitige Reaktion des Immunsystems kann als Hinweis auf eine Rolle für die immunregulatorische Funktion von dendritischen Zellen, im Speziellen während der Prägungsphase naiver T-Zellen, sowie während des Differenzierungsprozesses in sekundär lymphatischen Organen gewertet werden. Eine Störung während dieser sensiblen Phase der Immunreaktion mit daraus resultierender Verschiebung des Gleichgewichtes von Toleranz fördernden Einflüssen in Richtung einer proinflammatorischen Immunreaktion würde sowohl eine erhöhte Inflammation durch Th17⁺-T-Zellen begründen als auch den fulminanteren Krankheitsverlauf erklären. Unsere Ergebnisse stehen dabei im Einklang mit der Arbeit von Darrasse-Jeze, der in Tiermodellen für chronische Darmerkrankungen und Diabetes mellitus Typ 1 ebenfalls die konditionelle Depletion von dendritischen Zellen untersuchte (Darrasse-Jèze et al. 2009). In In-vivo-Versuchen mit dem DTx-Modell konnte gezeigt werden, dass die Depletion dendritischer Zellen zu einer Reduktion von regulatorischen T-Zellen führte und dadurch das Auftreten von Autoimmunerkrankungen induzierte. Die Arbeitsgruppe erklärte sich diesen Verlust an regulatorischen T-Zellen nicht durch eine verminderte Treg-Produktion im Thymus, sondern vielmehr durch den Verlust an Interaktionen mit den fehlenden dendritischen Zellen in der Milz sowie den Lymphknoten. Im Gegenzug konnte über die Erhöhung der DZ-Zahl eine Zunahme in der Treg-Zellzahl detektiert werden. Diese Zunahme der Treg-Zellen, welche über DZ-Expansion hervorgerufen wurde und eine MHC-II-Expression auf DZ erforderte, konnte die Entwicklung eines Typ 1 Diabetes verhindern (Darrasse-Jèze et al. 2009). In weiteren Versuchen dieser Arbeitsgruppe konnte durch den DZ-abhängigen Rückgang an Treg-Zellen eine Steigerung in der Anzahl der proinflammatorischen T-Zellen – im Besonderen Interferon- γ - sowie Interleukin-17-produzierende T-Zellen – nachgewiesen werden, was auch in unseren Versuchen der Fall war.

Aufschlussreich waren zudem die Versuche von Isaksson zum Einfluss plasmazytoider dendritischer Zellen während der aktiven EAE. Diese Subpopulation dendritischer Zellen wurde in unseren Versuchen bei der Depletion ausgespart und primär die Funktion der

klassischen/konventionellen dendritischen Zellen (cDZ) analysiert. Die Gruppe um Isaksson depletierte die pDZ durch Antikörperapplikation mit anti-pDC-Ag-1 (anti-PDCA1)-mAb vor Immunisierung und Auslösung einer aktiven EAE mit dem MOG-Peptid in C57BL/6-Mäusen. Tiere ohne pDZ entwickelten mildere klinische Krankheitssymptome mit zusätzlich geringeren Th17-Zellzahlen in der Milz und zeigten zudem leichtere histopathologische EAE-Merkmale im Vergleich mit der Kontrollgruppe (Isaksson et al. 2009). Isaksson schrieb daraufhin den pDZ eine wichtige Ausübung ihrer Funktion während der Initialisierungsphase der EAE zu. Interessanterweise resultierte aus der Depletion eine Woche nach der MOG-Immunisierung ein fulminanteres Krankheitsgeschehen, was auf einen fördernden Effekt von pDZ in der MOG-induzierten Th17-Zellantwort während der EAE hindeutet.

Diese Beobachtung würde demnach auf einen gegenläufigen Effekt von cDZ und pDZ in den Anfangsphasen der EAE hinweisen. Während die Depletion der klassischen DZ in der Phase der Immunisierung mit MOG einen fulminanteren EAE-Krankheitsverlauf bewirkt und erst eine Depletion in der Phase des Krankheitsausbruches zu einer Verbesserung bzw. einer Verlangsamung in der Progression führt, scheint eine Depletion der pDZ in der Anfangsphase einen milderen Krankheitsverlauf hervorzurufen und die spätere Depletion eine Verschlechterung zur Folge zu haben.

4.2.2 Abbruch in der DZ-Depletion während des Krankheitsausbruches ohne protektive Auswirkung

Die Depletion DZ von Beginn einer aktiven EAE-Induzierung an verdeutlicht die Funktion dendritischer Zellen in der aktiven Regulierung des Treg-Th17-Gleichgewichtes während früher Stadien der T-Zell-Differenzierung. In der Prägungsphase enzephalitogener T-Zellen während aufkommender Neuroinflammation zeigen dendritische Zellen in sekundär lymphatischen Geweben eine Beteiligung in der Aufrechterhaltung der Immuntoleranz. Interessant war hierbei zu sehen, ob eine Unterbrechung in der Depletion dendritischer Zellen zu einem Zeitpunkt nach abgeschlossener T-Zell-Prägungsphase den anfänglich fulminanteren Effekt im EAE-Krankheitsverlauf revidieren würde.

Die Depletion vom Beginn der EAE-Induzierung bis zum Krankheitsausbruch bei einem durchschnittlichen Krankheitswert von 1,5–2 hatte vergleichbare Auswirkungen wie die Depletion DZ im gesamten EAE-Verlauf (vgl. 3.1.2). Es konnte hier sowohl ein verfrühter Krankheitsausbruch als auch ein höherer Durchschnittswert im maximalen Krankheitsgrad und

im Gesamtkrankheitsgrad sowie eine erhöhte kumulative Krankheitsaktivität detektiert werden. Eine Revidierung des fulminanten Verlaufes bzw. eine Abschwächung in der Krankheitsaktivität über den restlichen EAE-Verlauf konnte nicht nachgewiesen werden. Zwar verkleinert sich die Signifikanz im Vergleich des durchschnittlichen Krankheitswertes beider Gruppen an den unterschiedlichen Tagen v. a. im letzten Abschnitt des Versuches, dies ist jedoch auf eine verstärkte Krankheitsaktivität in der PBS-Behandlungsgruppe zurückzuführen, welche einen späteren Krankheitsausbruch verzeichnete. Die Entwicklung der EAE-Verlaufskurven der beiden Behandlungsgruppen (DTx vs. PBS) deutet dabei auf einen nicht revidierbaren Effekt durch die frühe Depletion dendritischer Zellen hin. Demnach ist der Eingriff in das Gleichgewicht zwischen Th17- und Treg-Zellen zu groß, als dass ein Wiederkehren dendritischer Zellen die mit aller Wahrscheinlichkeit nach erhöhten Th17-Zellzahl inhibieren könnte. Die wichtige Bedeutung in der Kontrolle autoaggressiver T-Zellen durch regulatorische T-Zellen konnte schon durch die Versuche von Lafaille beschrieben werden. Diese zeigten, dass trotz alleinigen Vorkommens transgener myelinspezifischer TZR ein spontaner Ausbruch der EAE durch die natürlich vorkommenden regulatorischen T-Zellen verhindert wurde. Sobald jedoch die physiologischen Kontrollmechanismen der T-Zell-Homöostase gestört würden, könnte es zum Ausbruch einer Autoimmunreaktion kommen (Lafaille et al. 1994). Der protektive Effekt, der durch die Induzierung antiinflammatorischer regulatorischer T-Zell-Typen über die Interaktion mit dendritischen Zellen entsteht und gerade zu Beginn einer Immunreaktion für die Regulierung und Modulierung der Zellantwort äußerst wichtig ist, bleibt nach DZ-Depletion aus. Somit würden die hochgradig proinflammatorisch wirkenden Th17-Zellen keine Inhibition mehr erfahren und dementsprechend wirken können. Durch die starke klinische Manifestation der ZNS-Schädigung musste der Versuch am 21. Tag unter Berücksichtigung der tierschutzrechtlichen Bestimmungen abgebrochen werden.

Ob eine eventuell frühere Unterbrechung in der DTx-Applikation eine divergente Auswirkung hinsichtlich des Krankheitsverlaufes mit sich bringen würde ist fraglich. Tischner et al. untersuchten in vivo die Interaktion regulatorischer T-Zellen mit enzephalitogenen T-Zellen im konfokalen Mikroskop und konnten dabei einen Zusammenhang zwischen dem Einfluss einer polyklonalen Expansion regulatorischer T-Zellen in sekundär lymphatischen Geweben und der Migration proinflammatorischer Zellen ins ZNS identifizieren. Nach Tischner liefert die Expansion der Treg-Zellen in sekundär lymphatischen Geweben einen wichtigen präventiven Beitrag bezüglich der Migration enzephalitogener Zellen ins ZNS (Tischner et al. 2006). Diese Aussage würde unsere eigenen Beobachtungen teilweise erklären.

Würde die Interaktion dendritischer Zellen und regulatorischer T-Zellen während der Prägungsphase beeinträchtigt, hätte dies negative Auswirkung auf die Expansionsrate der Treg-Zellen, was eine Zunahme in der ZNS-Migrationsrate durch proinflammatorische Zellen zur Folge hätte. Eine Unterbrechung der Depletion während der Effektorphase würde demnach fatale Auswirkungen nach sich ziehen, da nun wieder aufkommende DZ im ZNS in ihrer Antigenpräsentation gegenüber enzephalitogenen Zellen durch die unterbrochene DTx-Applikation nicht mehr behindert würden und somit eine autoaggressive Reaktion proinflammatorischer T-Zellen begünstigt werden könnte.

Für die Entwicklung einer inflammatorischen Reaktion innerhalb des ZNS bedarf es einer Restimulation enzephalitogener T-Zellen durch antigenpräsentierende Zellen. Denn auch zuvor aktivierte und expandierte T-Zellen sind nicht in der Lage, native Proteinzielstrukturen eigenständig zu erkennen (Slavin et al. 2001). Greter et al. konnten in Versuchen verdeutlichen, dass Mikroglia- und Astrozytenzellen, welche im ZNS als lokal vorkommende APZ fungieren, nicht unbedingt für die Entwicklung einer EAE notwendig sind. In Experimenten, in denen die MHC-Klasse-II-Expression auf CD11c⁺-DZ limitiert wurde, zeigte sich, dass die CD11c⁺-DZ alleine für die Antigenpräsentation autoreaktiver T-Zellen verantwortlich waren und so die ZNS-Inflammation und den klinischen Krankheitsausbruch steuerten (Greter et al. 2005). Eine Unterbrechung in der DTx-Applikation während der Effektorphase, also in der Phase, in der autoreaktive T-Zellen in das ZNS einwandern, würde zur Folge haben, dass dendritische Zellen wieder vermehrt auftreten, für die Antigenpräsentation zur Verfügung stehen und damit die neuroinflammatorischen Reaktionen begünstigen bzw. sogar verstärken könnten. Diese Hypothese findet Unterstützung in den Ergebnissen von Heppner et al. aus Versuchen an unterdrückter Mikrogliaaktivität, welche eine Repression in der Entwicklung einer EAE zur Folge hatte (Heppner et al. 2005). Auch hier könnten diese Ergebnisse durch eine verminderte Antigenpräsentation und damit abgeschwächte Stimulation aggressiver Immunzellen erklärt werden.

Ähnliches kann auch aus Versuchen der Gruppe um Whartenby abgeleitet werden. Diese beschreiben eine Abschwächung im EAE-Krankheitsverlauf von Mäusen, in denen während der Effektorphase des EAE-Verlaufs der FLT3-Signalweg unterbunden wurde (Whartenby et al. 2005). Die Stimulation hämatopoetischer Vorläuferzellen – welche den FLT3-Rezeptor (CD135) exprimieren – via FLT3-Ligand führt in vitro wie auch in vivo zu einer Expansion und Differenzierung dieser Vorläuferzellen in Richtung des DZ-Phänotypen. Die Inhibierung dieses

Signalweges während der Effektorphase der Immunreaktion, in der migrierte enzephalitogene T-Zellen im ZNS Strukturen angreifen und zerstören, führt zu einer abgeschwächten Entstehung dendritischer Zellen, was eine eingeschränkte Antigenpräsentation im ZNS und damit einen milderen EAE-Krankheitsverlauf erklären könnte.

Um voneinander abweichende Pathomechanismen als mögliche Ursache für die Andersartigkeit der EAE-Verläufe in den unterschiedlichen Versuchsgruppen auszuschließen, wurden sowohl von Tieren der PBS- als auch von Tieren der DTx-Behandlungsgruppe HE- und LFB-Färbungen der lumbalen Anteile der *Medulla spinalis* angefertigt und hinsichtlich der Merkmale Zellinfiltration und Demyelinisierung miteinander verglichen (Berard et al. 2010). Hierbei wurden Versuchstiere mit ähnlich stark ausgeprägten klinischen Symptomen ausgewählt, welche einen Krankheitswert zwischen zwei bis drei aufwiesen. In beiden Behandlungsgruppen wurden die allgemeinen Zeichen der Zellinfiltration vergleichbar stark ausgeprägt parameningeal vorgefunden. Zusätzlich konnten durch die LFB-Färbung demyelinisierte Bereiche v. a. in der Nähe des Hinterhorns identifiziert werden.

4.2.3 Auswirkung der DZ-Depletion im Krankheitsausbruch auf die Progression des Krankheitsverlaufs

Während in der Prägungsphase die ausschlaggebenden Mechanismen der Immunreaktion in sekundär lymphatischen Geweben ablaufen, ist in der Effektorphase die Restimulation autoreaktiver Zellen im ZNS durch erneute Präsentation der Antigenstrukturen durch APZ entscheidend. Klinische Symptome in der EAE bildeten sich erst dann aus, wenn T-Zellen, welche in der Lage sind, die BHS zu penetrieren, hinreichend durch APZ im ZNS reaktiviert werden (Kawakami et al. 2005). In Gegenwart differenzierter, enzephalitogener T-Zellen fungieren dendritische Zellen im ZNS (ZNS-DZ) unter proinflammatorischen Bedingungen im perivaskulären Raum als potente antigenpräsentierende Zellen (Greter et al. 2005; Bailey et al. 2007). Greter et al. konnten in Versuchen nachweisen, dass eine Erhöhung der Anzahl dendritischer Zellen via FLT3-Antikörper-Verwendung in einer Zunahme des Schweregrades in der EAE resultierte und damit die Bedeutung DZ hinsichtlich ihres Potentials zur Antigenpräsentation im ZNS hervorheben (Greter et al. 2005). Die Erkenntnis von Whartenby, dass über die Inhibierung des FLT-3-Signalweges eine Verbesserung im EAE-Krankheitsverlauf zu erreichen ist, deutet zusätzlich auf eine kritische Beteiligung myeloider dendritischer Zellen während der Antigenpräsentation im ZNS hin.

Wie würde sich demnach eine Depletion dendritischer Zellen in der akuten Phase des Krankheitsausbruches – in der Phase, in der aktivierte und expandierte autoreaktive T-Zellen die Zielstrukturen im Gehirn aufsuchen – verhalten?

Interessanterweise konnte nach DTx-Applikation zum Zeitpunkt des Ausbruchs der Erkrankung in der CD11c-DTR-DTx-Gruppe eine leichte Stagnation in der Progression des EAE-Krankheitsverlaufs festgestellt werden (vgl. 3.1.3). Die Depletion dendritischer Zellen ab Tag 13 rief eine Abflachung des Verlaufesgraphen der DTx-Gruppe hervor, die sich nach vier Tagen signifikant von den Verlaufesgraphen der Kontrollgruppen unterschied. Tiere der DTx-Behandlungsgruppe wiesen nach Abbruch des Versuches ein 100-prozentiges Überleben auf, welches sich im Vergleich zur PBS-Behandlungsgruppe mit knapp 39 % signifikant unterschied ($p = 0,0003$). Bemerkenswert war jedoch, dass es nicht nur zu einer Verlangsamung in der Progression der Krankheitssymptomatik kam, sondern gleichzeitig eine Verbesserung der klinischen Symptome in einigen Tieren beobachtet werden konnte. Diese zeigten vor DTx-Behandlung klare Zeichen einer Hinterbeinparese, welche jedoch nach einigen Tagen vollständig remittiert zu sein schien, da die zuvor gelähmten Hinterbeine wieder bewegt werden konnten.

Interessant war nun, durch welche Veränderung in der Immunreaktion diese Abschwächung des EAE-Verlaufs hervorgerufen wurde.

Bei der Analyse der verschiedenen Zellpopulationen in der Milz sowie im ZNS fiel auf, dass sowohl in der Milz als auch im ZNS minimale Abweichungen im prozentualen Anteil der Zellverteilung von $CD4^+$ -Treg- und -Th17-Zellen nachgewiesen werden konnten, diese jedoch zu geringgradig erschienen, als dass sie für die Veränderung im EAE-Verlauf verantwortlich sein konnten. In beiden Organen lag eine minimale Erhöhung der Th17- und Treg-Zellpopulation in der PBS-Behandlungsgruppe vor. Der einzige Unterschied, der bei den FACS-Analysen auffiel, war eine ausgeprägte Zunahme an ZNS-DZ in der PBS-Gruppe. Diese Zunahme deutet darauf hin, dass in etablierten neuroinflammatorischen Vorgängen dendritische Zellen einen direkten Beitrag zur Progression der klinischen Symptome leisten würden. Auch hier können die Versuche Greters und Whartenbys als mögliche Erklärung herangezogen werden.

In Anlehnung an die zuvor erörterten Veröffentlichungen (Greter et al. 2005; Bailey et al. 2007; Whartenby et al. 2005) würde die Reduktion dendritischer Zellen im ZNS der Tiere der DTx-Behandlungsgruppe eine Erklärung für den milderen EAE-Verlauf bzw. die Verlangsamung der

EAE-Progression liefern. Mögliche Gründe für eine abgeschwächte Neuroinflammation wären hier eine verringerte Antigenpräsentation und Restimulation der migrierten enzephalitogenen T-Zellen durch dendritische Zellen im ZNS. Während in der PBS-Behandlungsgruppe somit ein physiologisches Vorkommen an ZNS-DZ vorliegt und für die Antigenpräsentation proinflammatorischer Zellen zur Verfügung stehen würde, zeigen Tiere der DTx-Behandlungsgruppe verringerte Zellzahlen an ZNS-DZ, was eine Abschwächung in der Antigenpräsentation zur Folge haben dürfte.

Um auch hier voneinander abweichende Pathomechanismen als mögliche Ursache für die Andersartigkeit der EAE-Verläufe in den unterschiedlichen Versuchsgruppen auszuschließen, wurden von Tieren der PBS- sowie von Tieren der DTx-Behandlungsgruppe HE- und LFB-Färbungen der lumbalen Anteile der Medulla Spinalis angefertigt und hinsichtlich der Merkmale Zellinfiltration und Demyelinisierung miteinander verglichen (Berard et al. 2010). In beiden Behandlungsgruppen wurden die allgemeinen Zeichen der Zellinfiltration vergleichbar stark ausgeprägt parameningeal vorgefunden. Zusätzlich konnten durch die LFB-Färbung demyelinisierte Bereiche v. a. in der Nähe des Hinterhorns identifiziert werden.

Diese Erklärung findet Unterstützung in den Ergebnissen aus passiven EAE-Versuchen, welche in unserer Arbeitsgruppe erzielt wurden. J. Werr umging das *Priming* enzephalitogener T-Zellen zu Beginn einer Immunreaktion durch den Transfer zuvor in vitro stimulierter und expandierter enzephalitogener T-Zellen (unveröffentlichte Daten aus Voss, Siffrin, Werr et al.). Die enzephalitogenen T-Zellen (vgl. 2.3.6.1 sowie 2.3.7.2) wurden CD11c-DTR-Empfängerchimären mittels venöser Injektion übertragen. Beginnend einen Tag vor Zelltransfer bis Versuchsende wurden die Tiere, wie in der aktiven EAE, mit DTx bzw. PBS behandelt und der vorliegende Krankheitsgrad klinisch überprüft.

Werr konnte hier zeigen, dass es in Abwesenheit dendritischer Zellen bei mit DTx behandelten Tieren zu einer verringerten Krankheitsinzidenz sowie einem durchschnittlich verminderten Krankheitswert kam. FACS-Analysen zeigten zudem, dass eine erhöhte Anzahl der transferierten TH17-Zellen in den Tieren nachgewiesen werden konnte, die ein intaktes DZ-Kompartiment aufwiesen (PBS-Behandlungsgruppe). Zusätzlich konnten erhöhte Zellzahlen von regulatorischen T-Zellen in Gehirnen von Versuchstieren detektiert werden, welche DZ-Depletion aufwiesen (DTx-Behandlungsgruppe). Insgesamt scheint sich die Anwesenheit dendritischer Zellen in der Effektorphase der Immunreaktion, in der primär die Funktion zur

Antigenpräsentation im ZNS im Vordergrund steht, negativ auf den klinischen Krankheitsverlauf in der EAE auszuwirken.

4.3 Rolle der kostimulatorischen B7-Familie in der DZ-T-Zell-Interaktion

Die Folgen der Depletion dendritischer Zellen in der Initiierungsphase der Immunantwort zeigen sich in einer Störung der unter normalen Umständen ablaufenden Erhöhung regulatorischer T-Zellen und damit einer Beschleunigung der Progression des Krankheitsverlaufes der EAE. Doch über welchen Mechanismus kann die Verschlechterung der klinischen Symptome in DZ-depletierten Tieren erklärt werden? Spielen hierbei primär die antigenspezifischen MHC-Klasse-II-Komplexe oder eher kostimulatorische Faktoren der B7-Familie eine Rolle?

Die Interaktion zwischen dendritischen Zellen und T-Zellen ist durch einen umfassenden Komplex an Rezeptoren und Komolekülen gekennzeichnet, welcher diese Zellen in eine einzigartige wechselseitige Beziehung zueinander stellt (Hubert et al. 2007). Neben den MHC-Klasse-Molekülen stellen u. a. B7-1 (CD80)- und B7-2 (CD86)-Moleküle auf der Zelloberfläche dendritischer Zellen, welche mit CD28- oder CTLA-4-Oberflächenmolekülen auf T-Zellen interagieren, eine Möglichkeit dar, Einfluss auf die Induzierung von Effektor- oder Suppressorfunktionen in T-Zellen zu nehmen (Banchereau and Steinman 1998a; Zamvil and Steinman 1990). Dabei unterscheiden sich die Auswirkungen der beiden Oberflächenmarker auf T-Zellen nach Stimulation. Während die Bindung des CTLA-4-Oberflächenmoleküls durch B7-Moleküle dendritischer Zellen ein inhibierendes Signal vermittelt, welches eine entscheidende Funktion in der Herabregulierung der Immunantwort spielt, vermittelt die Bindung des CD28-Oberflächenmoleküls eher ein stimulierendes Signal, welches z. B. eine wichtige Rolle bei der Initiierung der Autoimmunreaktion in der EAE darstellt (Racke et al. 2000).

Die Bedeutung der Regulierung kostimulatorischer Moleküle dendritischer Zellen auf den Einfluss der Initiierung primärer T-Zell-Antworten wurde Ende der 80er Jahre beschrieben. Durch die Blockierung der B7-CTLA-4-Verbindung zwischen DZ und T-Zellen konnte die Gruppe um Larsen eine Inhibierung der DZ-induzierten T-Zell-Proliferation detektieren (Larsen et al. 1992). Interessanterweise zeigte die Gruppe um Chang in Versuchen mit B7-1- und B7-2-defizitären Mäusen die wichtige Bedeutung der B7-Kostimulation sowohl in der initialen Aktivierung und Expansion MOG-reaktiver T-Zellen als auch in der Effektorphase enzephalitogener T-Zell-Aktivierung im ZNS. In diesen Versuchen zeigten Tiere, welche keine

CD80/86-Oberflächenmoleküle exprimierten, keine oder nur geringgradige klinische Symptome verbunden mit reduzierten inflammatorischen Infiltraten in Gehirn und Rückenmark (Chen et al. 2003; Chang et al. 1999).

Kuchroo et al. war es möglich, durch die Verwendung gezielter Antikörper gegen entweder B7-1- oder B7-2-Oberflächenmoleküle differenzierte Aussagen bezüglich der Auswirkung des EAE-Verlaufs in Mäusen zu treffen. Hier zeigte sich ein unterschiedlicher Effekt bei der Anwendung von Anti-B7-1-Antikörpern, welche die Krankheitsinzidenz durch vermehrte Th2-Zell-Expansion verringerte, zu Anti-B7-2-Antikörpern, welche durch Th1-Induktion den Schweregrad des EAE-Ausmaßes verstärkten (Kuchroo et al. 1995).

Die Gruppe um Salomon hingegen konnte in Versuchen an Diabetes-Mäusen eine fulminante Verschlechterung in der Spontanentwicklung der Autoimmunerkrankung sowie eine Abnahme der immunregulatorischen CD4⁺CD25⁺T-Zellen in B7-1- und B7-2-*Knockout*-Tieren sichtbar machen. Diese Ergebnisse deuteten auf eine essentielle Beteiligung des CD28-B7-Signalweges in der Entwicklung und Homöostase regulatorischer T-Zellen bei der Kontrolle sich spontan entwickelnder Autoimmunerkrankungen hin (Salomon et al. 2000). Auch die Gruppe um Zeng konnte in Abwesenheit der B7-1- und B7-2-Oberflächenmoleküle einen dramatischen Rückgang in der Frequenz regulatorischer T-Zellen sowohl im Thymus als auch in Geweben in der Peripherie nachweisen. Weder B7-1- noch B7-2-Expression alleine waren ausreichend, um eine Entwicklung von regulatorischen T-Zellen zu unterstützen oder die periphere Homöostase regulatorischer T-Zellen hervorzurufen (Zeng et al. 2009). Eine mögliche Erklärung hierfür liegt in einer eingeschränkten Aktivierung konventioneller T-Zellen und damit ihrer IL-2-Produktion aufgrund eines CD28- oder B7-Mangels bzw. einer -Blockade, welche in der Konsequenz eine Reduzierung natürlicher Treg-Zellen aufgrund des IL-2-Mangels zur Folge hätte, wie in Versuchen von Setoguchi deutlich wurde (Setoguchi et al. 2005).

Aufschlussreich ist zudem, dass in In-vitro-Versuchen die Moleküle der B7-Kostimulation neben der Beeinflussung regulatorischer T-Zellen einen negativ regulierenden Effekt in der Entwicklung von Th17⁺-T-Zellen aufwiesen. Die CD28-Kostimulation reduzierte in vitro die Frequenz in der Proliferation IL-17-produzierender Zellen (Bouguermouh et al. 2009).

Die Rolle der kostimulatorischen Moleküle der B7-Familie in der Beeinflussung des EAE-Verlaufs vermittelt bisher jedoch kein einheitliches Bild und wird insgesamt kontrovers diskutiert. So konnte in mehreren Studien eine Verbesserung der klinischen Symptome nach

Ausschalten des kostimulatorischen Verlaufs während des Krankheitsausbruches detektiert werden (Salomon and Bluestone 2001). Salomon et al. erklärten sich diesen Effekt durch den Unterschied zwischen autoreaktiven und „normalen“ T-Zellen. Im Gegensatz zu T-Zellen, welche auf konventionelle körperfremde Pathogene reagieren, weist der T-Zell-Rezeptor autoreaktiver T-Zellen eine verminderte bzw. abgeschwächte Affinität gegenüber seinem Liganden auf. So würde eine Aktivierung autoreaktiver T-Zellen vermehrt von einer B7-CD28-Kostimulation abhängig sein, im Gegensatz zur Aktivierung von T-Zellen gegenüber fremden Pathogenen (Salomon and Bluestone 2001).

In einigen der genannten Versuche wurden *Knockout*-Modelle verwendet, in denen die gesamte CD80/86-Expression auf Zellen ausgeschaltet war. So wurden in den Versuchen von Chang et al. Tiere mit einem WT-B7-1^{-/-}B7-2^{-/-}-Hintergrund verwendet. Eine Aussage bezüglich der antigenspezifischen bzw. kostimulatorischen Stimulation, limitiert auf dendritische Zellen, war somit bisher problematisch.

4.3.1 Effekt dendritischer Zellen durch Kostimulation über B7-Moleküle

Um den Einfluss des antigenspezifischen MHC-Klasse-II- und des kostimulatorischen CD80/86-Effektes auf dendritische Zellen *in vivo* zu überprüfen, wurden in dieser Arbeit spezielle MHC-II^{-/-}- und CD80/86^{-/-}-*Knockouts* auf dendritischen Zellen durch die Verwendung des CD11c-DTR-Modells in Mäusen generiert. So konnte durch DTx-Applikation ein selektiv induziertes Defizit an

a) MHC-Klasse-II- bzw.

b) CD80/86-Molekülen

auf dendritischen Zellen hergestellt werden (vgl. 2.3.4.2). In der EAE zeigten die reinen CD11c-DTR-Chimären der DTx- und PBS-Behandlungsgruppe einen bis dato typischen EAE-Verlauf mit frühem und fulminantem Krankheitsausbruch sowie eine verstärkt ausgeprägte kumulative Krankheitsaktivität in Tieren, welche durch DTx-Applikation keine dendritischen Zellen mehr aufwiesen. Tiere der PBS-Gruppe zeigten einen milderen Krankheitsverlauf, verbunden mit einer geringeren kumulativen Krankheitsaktivität sowie einem 100-prozentigen Überleben. Im Vergleich der Zeitdauer bis zum Krankheitsausbruch zeigte sich, dass die DTx-Behandlungsgruppe der reinen CD11c-DTR-Chimären einen signifikanten Unterschied sowohl zur PBS-Kontrollgruppe als auch zu den mit DTx-behandelten MHC-II^{-/-}-Tieren aufwies. Bemerkenswerterweise zeigten bei der Analyse der EAE-Verläufe Tiere mit selektivem

MHC-II^{-/-}-*Knockout* auf der dendritischen Zellpopulation eine ähnliche klinische Krankheitsprogression wie CD11c-DTR-Chimären, welche mit PBS behandelt worden waren.

Dies würde auf einen nicht antigenspezifischen und folglich TZR-unabhängigen Effekt in der protektiven Wirkung dendritischer Zellen hinweisen. Eindrucksvoll war hierbei, dass im Gegenzug durch die konditionelle Ablation der kostimulatorischen Moleküle CD80/86 aus dem DZ-Kompartiment offensichtlich die Fähigkeit dendritischer Zellen beeinträchtigt wurde, die Entstehung bzw. den Ausbruch der Erkrankung zu verzögern oder sogar zu verhindern. Bei genauer Betrachtung zeigten Tiere dieser Gruppe einen im Vergleich zur CD11c-DTR-DTx-Behandlungsgruppe insgesamt milderen Verlauf, besonders während der Ausbruchphase der Erkrankung, welcher sich jedoch zum Versuchsende hin der CD11-DTR-DTx-Gruppe anglich. Ein Erklärungsansatz für diese Verzögerung in der Verschlechterung der klinischen Symptome liegt in der insgesamt reduzierten Anzahl an CD80/86-exprimierenden kompetenten APZ, da durch die Chimäregenerierung nur 50 % der normalerweise vorkommenden APZ vorlagen.

Die In-vivo-Ergebnisse stehen damit in Übereinstimmung mit der zuvor beschriebenen Veröffentlichung von Salomon et al. und würden den protektiven Effekt dendritischer Zellen während der Prägungsphase durch eine antigenunspezifische, kostimulatorische Stimulation dendritischer Zellen erklären. Die Arbeitsgruppe um Lin konnte durch die Verwendung eines CD28-spezifischen monoklonalen Antikörpers die besondere Bedeutung in der Expansion von Treg-Zellen verdeutlichen. Hier zeigte sich bei der Verwendung des CD28-spezifischen Antikörpers eine zum Teil 10-fache Verstärkung der in vivo wie auch in vitro ablaufenden Expansion regulatorischer T-Zellen (Lin and Hünig 2003).

4.3.2 Selektiver CD80/86-Knockout und verminderte FoxP3⁺CD4⁺-Zellen in Milz und ZNS

Zusätzlich zu den hier in vivo durchgeführten Versuchen wurde durch Ex-vivo-FACS-Analysen die prozentuale Verteilung von FoxP3⁺- und IL17⁺-Zellen an der CD4⁺-Zellpopulation in der Milz sowie im Gehirn von repräsentativen Tieren bestimmt. Dabei sollten die erhobenen Werte aufgrund der geringen Anzahl an aufgearbeiteten Tieren und damit der verminderten Gesamtzellzahl kritisch und nur richtungsweisend betrachtet werden.

In der Milz wird deutlich, dass durch den selektiven *Knockout* der CD80/86-Oberflächenmoleküle auf dendritischen Zellen der prozentuale Anteil von FoxP3⁺-Zellen an CD4⁺-Zellen beeinträchtigt wurde. Der MHC-Klasse-II-*Knockout* auf dendritischen Zellen

hingegen führte zu ähnlich hohen Werten, wie sie in der CD11c-DTR-PBS-Kontrollgruppe detektiert wurden (vgl. 3.2). Ein vergleichbares Bild liegt bei der Beschreibung dieser Zellverteilung im ZNS vor. Hier zeigten sich die höchsten prozentualen Werte von FoxP3⁺-Zellen an CD4⁺-Zellen in der MHC-Klasse-II^{-/-}-Gruppe, während die PBS-Gruppe allem Anschein nach aufgrund zu geringer Zellzahlen vergleichbare Werte wie die CD11c-DTR-DTx- und die CD80/86^{-/-}-Gruppe aufwies. Die Überprüfung des Anteils IL17⁺- an CD4⁺-Zellen zeigte weder in der Milz noch im ZNS der Tiere starke Abweichungen zwischen den Gruppen. Dies steht im Einklang mit der Erkenntnis, dass der über kostimulatorische Moleküle vermittelte protektive Einfluss dendritischer Zellen den Prägungsprozess schützender induzierter regulatorischer T-Zellen beeinflusst, während die Th17-Zellpopulation weitestgehend unbeeinflusst vorliegt.

4.3.3 CD80/86-abhängige Generierung FoxP3⁺-Zellen in vitro

In den unter 3.3.1 aufgeführten Versuchen konnte die zuvor beschriebene FoxP3⁺-Zellexpansion in Abhängigkeit von der TGF- β -Konzentration bestätigt werden (Chen et al. 2003). In den In-vitro-Versuchen wurde hier die Kapazität unterschiedlicher APZ-Populationen mit bzw. ohne dendritischen Zellanteil zur Induzierung FoxP3⁺-induzierter Treg-Zellen in Abhängigkeit von unterschiedlichen TGF- β -Konzentrationen (0, 0,3 und 3 ng/ml) untersucht. Hierbei wurde deutlich, dass APZ aus der Milz mit intakten dendritischen Zellen (PBS-Behandlungsgruppe) bei steigender TGF- β -Konzentrationen zu einer höheren Treg-Induktion fähig waren als DZ-depletierte APZ aus der Milz von DTx-Behandlungstieren. Eine Erklärung für die verminderte Treg-Induktion in Tieren ohne funktionsfähige dendritische Zellen konnte die Arbeitsgruppe um Travis leisten. In ihren Versuchen führte der konditionelle Mangel an TGF- β -aktivierendem Integrin $\alpha(v)8$ auf dendritischen Zellen zu einer Autoimmunität in Mäusen. Dieses Phänomen führten Travis et al. auf das Versagen dendritischer Zellen ohne Integrin $\alpha(v)8$ auf ihrer Oberfläche zurück, regulatorische T-Zellen zu induzieren (Travis et al. 2007).

Ähnliche In-vitro-Versuche führte Werr hinsichtlich der Th17-Zellinduktion durch. Dabei stellte sich heraus, dass, unabhängig von dem Vorkommen dendritischer Zellen, die Induktionsrate in den DZ-depletierten und DZ-undepletierten Gruppen vergleichbar war (unveröffentlichte Daten aus Voss, Siffrin, Werr et al.). Um nun auszuschließen, dass die beschriebenen Effekte auf eine andere Untergruppe als die der klassischen dendritischen Zellen zurückzuführen seien, verwendete Werr In-vitro-Kulturen, in denen DZ-depletierte APZ vorlagen, und verglich diese mit DZ-depletierten APZ-Kulturen, welche mit pDZ künstlich angereichert worden waren. Dabei

wiesen die Kulturen unabhängig von der pDZ-Konzentration ähnliche Ergebnisse auf, so dass eine Begründung für die Beeinflussung der Treg-Th17-Balance durch pDZ unwahrscheinlich sein dürfte.

Diese Ergebnisse unterstützen die Annahme, dass – während die Differenzierung in proinflammatorische Th17-Zellen unter DZ-Ablation weitestgehend unbeeinflusst bleibt – die Induktion regulatorischer T-Zellen sowohl *in vivo* als auch *in vitro* eingeschränkt wird.

In der vorliegenden Arbeit konnten durch *In-vivo*-Versuche Hinweise auf eine protektive Bedeutung der kostimulatorischen Moleküle bei der Stimulation regulatorischer T-Zellen durch dendritische Zellen während der Primingphase in der aktiven EAE verdeutlicht werden. Um diesen Effekt näher untersuchen zu können, wurde das Potential dendritischer Zellen sowohl mit MHC-II^{-/-} als auch CD80/86^{-/-} daraufhin untersucht, inwieweit aktivierte FoxP3⁺CD4⁺-Zellen *in vitro* generiert werden konnten.

Bei der Betrachtung der reinen CD11c-DTR-Chimären konnten die zuvor erhobenen Ergebnisse die Erkenntnis über eine DZ-abhängige FoxP3-Generierung bestätigen (vgl. 3.3.1). Während es bei einem Fehlen dendritischer Zellen zu keiner erwähnenswerten Steigerung im prozentualen Anteil von FoxP3⁺- an CD4⁺-Zellen bei steigender TGF-β-Konzentration kam, konnte eine deutliche Steigerung zwischen den einzelnen Steigerungsschritten bei vorliegendem DZ-Kompartiment verdeutlicht werden. Ein ähnliches Ergebnis konnte in der CD80/86^{-/-}-Gruppe nachgewiesen werden. Auch hier bewirkte eine Zunahme der TGF-β-Konzentration bei gleichzeitiger Abwesenheit dendritischer Zellen eine geringfügige Anhebung im FoxP3⁺-Anteil an CD4⁺-Zellen. Bemerkenswerterweise hatte der Mangel an DZ in der MHC-Klasse-II^{-/-}-Gruppe eine abweichende Auswirkung. In diesem Fall konnte nicht nur unter dem Einfluss dendritischer Zellen, sondern auch in deren Abwesenheit eine Steigerung im Anteil von FoxP3⁺- an CD4⁺-Zellen bei steigender TGF-β-Konzentration nachgewiesen werden. Zwar war diese Zunahme nur leicht ausgeprägt, sie weist dennoch mit den *in vivo* gewonnenen Erkenntnissen auf eine kostimulatorisch abhängige Beeinflussung der Treg-Zellpopulation hin.

4.4 Klinischer Ausblick und Relevanz

Die Bedeutung dendritischer Zellen in Abhängigkeit von ihrem eigenen Entwicklungsstatus, ihrem Ursprung aus einer Progenitorzelle, ihrer Gegenwart in unterschiedlichen Zytokinmilieus sowie ihrem Auftreten in verschiedenen Geweben innerhalb des Organismus ist unter neuroinflammatorischen Gesichtspunkten äußerst interessant.

Dendritische Zellen stellen eine heterogene Gruppe an Zellen dar, welche gegenwärtig in mehrere Subpopulationen mit unterschiedlicher Beschaffenheit an Oberflächenrezeptoren und verschiedenen Variationen in der Funktion unterteilt werden (Merad and Ginhoux 2007). Als „unreife“ Zellen überwachen sie die unterschiedlichsten Gewebe des Körpers, um nach der Aufnahme von körperfremden Pathogenen in sekundär lymphatische Organe einzuwandern und naive T-Zellen zu aktivieren. Gleichzeitig sorgen sie über die Präsentation körpereigener Antigene sowohl im Thymus als auch in der Peripherie für einen Zustand, der als Toleranz gegenüber dem „Selbst“ bezeichnet wird. Durch ihre Fähigkeit, Einfluss auf den Weg der Differenzierung naiver T-Zellen in Richtung proinflammatorische wie auch regulatorische T-Zellen zu nehmen, bilden sie eine wichtige Schaltstelle in der Initiierung und Aufrechterhaltung einer Immunantwort. ZNS-DZ weisen in Gegenwart differenzierter, enzephalitogener T-Zellen sowie im proinflammatorischen Milieu/Umfeld perivaskulärer Gewebe die Fähigkeit auf, als hochpotente antigenpräsentierende Zellen zu fungieren und dabei Einfluss auf das Krankheitsgeschehen der EAE zu nehmen (Greter et al. 2005; Bailey et al. 2007).

In der aktiven EAE laufen bedeutende Schritte jedoch schon im Voraus in den sekundär lymphatischen Geweben ab, bevor die eigentliche Effektorphase mit gezielter Immunantwort im Zielorgan eingeleitet wird. Die Initiierung einer wirksamen T-Zell-Antwort spiegelt dabei einen der wichtigsten Schritte der nachfolgenden Prozesse wider. Die Ergebnisse der beschriebenen Versuche deuten dabei sowohl auf eine wandlungsfähige, divergierende Funktion dendritischer Zellen in Abhängigkeit vom Organ – sekundär lymphatisch versus Zielgewebe – als auch von der momentanen Phase, in welcher sich die Immunantwort befindet – Prägungs- versus Effektorphase – hin. Während dendritische Zellen bei aufkommender Neuroinflammation wesentlich an der Aufrechterhaltung der immunologisch bedeutsamen „Selbst-Toleranz“ durch die Induktion der Expression regulatorischer T-Zellen beteiligt sind, initiieren und unterstützen ZNS-DZ durch Reaktivierung vollständig ausgebildeter autoaggressiver T-Zellen das Einsetzen bzw. den Ausbruch der Autoimmunreaktion. Dabei kann nicht nur zwischen dem Einfluss dendritischer Zellen aus lymphatischem Gewebe und Zielgewebe unterschieden werden. Die Arbeitsgruppe um Mosayebi konnte einen Unterschied in der Wirkung dendritischer Zellen aus der Leber im Vergleich zu DZ aus der Milz nachweisen. Tiere, in denen eine aktive EAE ausgelöst wurde und die zuvor mit MOG-Peptide beladene DZ aus Mäuselebern erhalten hatten, zeigten einen verzögerten Krankheitsausbruch sowie einen milderen Krankheitsverlauf im Vergleich zu Tieren, welche DZ aus Mäusmilzen erhalten hatten (Mosayebi and Moazzeni 2011).

Anhand der hier durchgeführten Versuche konnte ein wichtiger Beitrag zum Verständnis der janusähnlichen Funktion dendritischer Zellen während einer Immunreaktion geleistet werden. Dendritische Zellen weisen eine kostimulatorisch abhängige protektive Wirkungsweise in den sekundär lymphatischen Organen auf, welche einen entscheidenden Einfluss auf die Regulierung des Gleichgewichtes zwischen regulatorischen T-Zellen und T-Effektorzellen in den Phasen der Autoimmunreaktion ausübt, in denen die neuronale Immunantwort im ZNS initiiert wird.

Die Versuche am EAE-Modell führten zum Einen zu einem besseren Verständnis der genetischen Suszeptibilität in Autoimmunerkrankungen, zum Anderen zeigten sie wichtige Prozesse wie zum Beispiel der Lymphozytenwanderung in spezifische Gewebe auf (Steinman and Zamvil 2006b). Einerseits weisen genetisch hervorgerufene Veränderungen im Tiermodell – beispielsweise durch die Anwendung subletaler Strahlen zum Zweck eines Knochenmarktransfers – einen umfassenden Eingriff in die Physiologie des Organismus eines Lebewesens auf und können Veränderungen hervorrufen, die einzig auf die genetische Aberration zurückzuführen sind. Andererseits liefert die Modulierung bestimmter Gene, die in der Immunantwort eine Rolle spielen, durch *Knockout*- bzw. *Knockin*-Modelle die Möglichkeit, bestimmte komplexe Abläufe, wie die Regulierung des Zytokin-Chemokin-Gleichgewichts, die pathophysiologischen Abläufe einer Immunreaktion sowie den axonalen Untergang und die Regeneration so zu beeinflussen, dass eine Untersuchung einfacher umzusetzen ist. Die umsichtige und bedachte Anwendung des EAE-Modells stellt ein durchaus wertvolles Hilfsmittel bei der Entwicklung eines besseren und umfassenderen Verständnisses von immunpathologischen Abläufen und Optionen zu therapeutischen Interventionen bei der MS dar.

Die in dieser Arbeit aufgeführten Ergebnisse liefern wichtige Hinweise darauf, inwieweit dendritische Zellen durch die Induktion der unterschiedlichen T-Zell-Subtypen Einfluss ausüben und dadurch den Verlauf der Immunreaktion entscheidend beeinflussen können. Sie verdeutlichen damit einerseits die variable und wandlungsfähige Funktionsausübung dendritischer Zellen zu unterschiedlichen Augenblicken im Ablauf von Immunreaktionen und vermitteln andererseits die Komplexität der Rolle, welche dendritische Zellen in Erkrankungen wie der Multiplen Sklerose oder ihrem Pendant im Tiermodell – der EAE – einnehmen. Diese Erkenntnisse gilt es weiter zu erforschen, um künftig in der Lage zu sein, die protektive Rolle dendritischer Zellen im Kampf gegen Autoimmunerkrankungen, wie der Multiplen Sklerose, sinnvoll und effektiv zu nutzen.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Die Multiple Sklerose (MS) wird als eine heterogene, progressive Autoimmunerkrankung gesehen, welche durch die Beeinträchtigung axonaler und neuronaler Strukturen des Zentralen Nervensystems (ZNS) besonders bei jungen Erwachsenen eine wichtige Ursache für persistierende neurologische Defizite darstellt. Entwicklung und Ausbruch der MS wie auch ihr Pendant im Tiermodell, die experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis (EAE), stehen im Zusammenhang mit dem Vorkommen aktivierter, autoreaktiver myelinspezifischer T-Zellen. Die Komplexität dendritischer Zellen (DZ) – als hochwirksame antigenpräsentierende Zellen (APZ) – zeigt sich in ihrer Funktion, naive wie auch ausdifferenzierte T-Zellen zu aktivieren sowie in ihrer Wirkungsweise zu modulieren und dadurch den Verlauf einer Immunantwort wesentlich zu beeinflussen. Das Ziel dieser Arbeit war es, die scheinbar widersprüchliche dichotome Möglichkeit DZ zur Aktivierung sowohl Toleranz fördernder regulatorischer T-Zellen als auch Toleranz hemmender proinflammatorischer TH17-Zellen während unterschiedlicher Phasen der Immunreaktion näher zu analysieren. Durch die Verwendung generierter CD11c-DTR→CD57BL/6-Knochenmarkchimären – basierend auf dem transgenen CD11c-DTR-Modell der Maus – konnte hier durch Diphtherietoxin-Applikation der Einfluss der zeitlich gezielten konditionellen Depletion DZ auf den Krankheitsverlauf der EAE in vivo in Abhängigkeit zum Stadium der Immunantwort verdeutlicht werden. Die Depletion DZ während der Prägungsphase naiver T-Zellen führte zu einem verfrühten Einsetzen klinischer Symptome und in der Folge zu einem fulminanteren Krankheitsverlauf mit erhöhter Mortalität. Diese Veränderung konnte durch die Abnahme in der Induzierung regulatorischer T-Zellen (Treg) erklärt werden, welche sich in Abhängigkeit zur CD80/86-Expression auf peripheren DZ darstellte. Die Depletion DZ in der Effektorphase führte hingegen zu einer positiven Beeinflussung der Krankheitsprogression, unter der es in einigen Individuen sogar zu einer Remission ursprünglich aufgetretender Paresen kam. Bei gleichzeitig unveränderter Zellpopulation regulatorischer wie auch proinflammatorischer T-Zellen konnte dieser mildere Krankheitsverlauf auf eine Reduktion in der Population DZ im ZNS und eine daraus resultierende verminderte Antigenpräsentation gegenüber proinflammatorischen TH17-Zellen zurückgeführt werden. Diese Ergebnisse verdeutlichen die Vielfältigkeit in der Funktion dendritischer Zellen, während unterschiedlicher Stadien der Immunreaktion die T-Zell-Antwort divergent zu modulieren und damit die Immunreaktion maßgeblich zu beeinflussen.

Schlagwörter: EAE, Multiple Sklerose, dendritische Zellen

6 ABSTRACT

Multiple Sclerosis (MS) is a heterogeneous, progressive autoimmune disease, which affects axonal and neuronal structures of the central nervous system (CNS). It occurs predominantly in young adults and is considered an important cause of persistent neurological deficits within this age group. The outbreak and development of MS as well as its correlating animal-model – experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) – are both associated with activated auto-reactive myelin-specific T-cells. The complex function of dendritic cells (DC) as highly effective antigen-presenting cells (APC) is illustrated by their ability to activate naive and differentiated T-cells, as well as to substantially modulate these cells in their functionality. Consequently, they affect the development of the ensuing immune reaction. This study investigates the apparent dichotomous capacity of DC to activate both tolerance-inducing regulatory T-cells, as well as pro-inflammatory Th17 cells during the various phases of the inflammatory process. The application of Diphtheria toxin in CD11c-DTR→CD57BL/6 bone marrow chimeras, based on a transgenic CD11c-DTR mouse-model, demonstrates the effect of precise DC depletion on the progression of EAE in vivo in correlation with the respective stage of the inflammatory process. The depletion of DC during the formative phase of naive T-cells resulted in a premature onset of clinical symptoms, in a more severe course of the disease and in increased mortality rates. This effect was proven to be caused by a markedly reduced induction of regulatory T-cells, in close correlation with CD80/86 expression on peripheral DC. A depletion of DC during the effector phase, however, had a positive influence on the disease's progress, in some mice it even resulted in a remission of paralysis. A milder course of EAE and constant regulatory and pro-inflammatory T-cell populations were associated with reduced DC populations in the CNS, and subsequently decreased antigen presentation to pro-inflammatory TH17 cells. The results presented in this study will elucidate the capacity of DC to divergently modulate the T-cell response, and thus substantially influence different stages of the immune reaction.

Keywords: EAE, multiple sclerosis, dendritic cells

7 LITERATURVERZEICHNIS

- Akira S and Takeda K, 2004. Toll-like receptor signalling. *Nature Reviews. Immunology*, 4(7), 499–511.
- Albert ML, Jegathesan M and Darnell RB, 2001. Dendritic cell maturation is required for the cross-tolerization of CD8+ T cells. *Nature Immunology*, 2(11), 1010–1017.
- Bailey SL et al., 2007. CNS myeloid DCs presenting endogenous myelin peptides “preferentially” polarize CD4+ T(H)-17 cells in relapsing EAE. *Nature Immunology*, 8(2), 172–180.
- Banchereau J and Steinman RM, 1998a. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*, 392(6673), 245–252.
- Banchereau J and Steinman RM, 1998b. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*, 392(6673), 245–252.
- Bar-On L and Jung S, 2010. Defining in vivo dendritic cell functions using CD11c-DTR transgenic mice. *Methods in Molecular Biology*, 595, 429–442.
- Baxter AG, 2007. The origin and application of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Nature Reviews. Immunology*, 7(11), 904–912.
- Bennett CL et al., 2005. Inducible ablation of mouse Langerhans cells diminishes but fails to abrogate contact hypersensitivity. *The Journal of Cell Biology*, 169(4), 569–576.
- Berard JL et al., 2010. Characterization of relapsing-remitting and chronic forms of experimental autoimmune encephalomyelitis in C57BL/6 mice. *Glia*, 58(4), 434–445.
- Bettelli E et al., 2006. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature*, 441(7090), 235–238.
- Bettelli E et al., 2003. Myelin oligodendrocyte glycoprotein-specific T cell receptor transgenic mice develop spontaneous autoimmune optic neuritis. *The Journal of Experimental Medicine*, 197(9), 1073–1081.
- Birnberg T, Bar-On L, et al., 2008. Lack of conventional dendritic cells is compatible with normal development and T cell homeostasis, but causes myeloid proliferative syndrome. *Immunity*, 29(6), 986–997.
- Bouguermouh S et al., 2009. CD28 co-stimulation down regulates Th17 development. *PloS One*, 4(3), 5087.
- Brocker T, Riedinger M and Karjalainen K, 1997. 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. *The Journal of Experimental Medicine*, 185(3), 541–550.

- Carrier Y et al., 2007. Th3 cells in peripheral tolerance. I. Induction of Foxp3-positive regulatory T cells by Th3 cells derived from TGF-beta T cell-transgenic mice. *Journal of Immunology*, 178(1), 179–185.
- Chang TT et al., 1999. Studies in B7-deficient mice reveal a critical role for B7 costimulation in both induction and effector phases of experimental autoimmune encephalomyelitis. *The Journal of Experimental Medicine*, 190(5), 733–740.
- Charcot JM, 1868. Histologie de la sclérose en plaques. *Gazette Hôpitaux*(141), 554566.
- Chen et al., 2003. Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *The Journal of Experimental Medicine*, 198(12), pp.1875–1886.
- Compston A and Coles A, 2008. Multiple sclerosis. *Lancet*, 372(9648), 1502–1517.
- Dalton CM et al., 2004. Early development of multiple sclerosis is associated with progressive grey matter atrophy in patients presenting with clinically isolated syndromes. *Brain: A Journal of Neurology*, 127(Pt 5), 1101–1107.
- Darrasse-Jèze G et al., 2009. Feedback control of regulatory T cell homeostasis by dendritic cells in vivo. *The Journal of Experimental Medicine*, 206(9), 1853–1862.
- Dickstein JB, Moldofsky H and Hay JB, 2000. Brain-blood permeability: TNF-alpha promotes escape of protein tracer from CSF to blood. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 279(1), 148–151.
- Engelhardt B and Ransohoff RM, 2005. The ins and outs of T-lymphocyte trafficking to the CNS: anatomical sites and molecular mechanisms. *Trends in Immunology*, 26(9), 485–495.
- Ercolini AM and Miller SD, 2006. Mechanisms of immunopathology in murine models of central nervous system demyelinating disease. *Journal of Immunology*, 176(6), 3293–3298.
- Fontenot JD and Rudensky AY, 2005. A well adapted regulatory contrivance: regulatory T cell development and the forkhead family transcription factor Foxp3. *Nature Immunology*, 6(4), 331–337.
- Fox EJ, 2004. Mechanism of action of mitoxantrone. *Neurology*, 63(12 Suppl 6), 15–18.
- Freund J, Stern ER and Pisani TM, 1947. Isoallergic encephalomyelitis and radiculitis in guinea pigs after one injection of brain and Mycobacteria in water-in-oil emulsion. *Journal of Immunology*, 57(2), 179–194.
- Furlan R, Cuomo C and Martino G, 2009. Animal models of multiple sclerosis. *Methods in Molecular Biology*, 549, 157–173.
- Gold R, Linington C and Lassmann H, 2006. Understanding pathogenesis and therapy of multiple sclerosis via animal models: 70 years of merits and culprits in experimental

- autoimmune encephalomyelitis research. *Brain: A Journal of Neurology*, 129(Pt 8), 1953–1971.
- Greenfield L et al., 1983. Nucleotide sequence of the structural gene for diphtheria toxin carried by corynebacteriophage beta. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 80(22), 6853–6857.
- Greter M et al., 2005. Dendritic cells permit immune invasion of the CNS in an animal model of multiple sclerosis. *Nature Medicine*, 11(3), 328–334.
- Hafler DA, 2004. Multiple sclerosis. *The Journal of Clinical Investigation*, 113(6), 788–794.
- Hammarlund E et al., 2003. Duration of antiviral immunity after smallpox vaccination. *Nature Medicine*, 9(9), 1131–1137.
- Harrington LE et al., 2005. Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nature Immunology*, 6(11), 1123–1132.
- Hartung HP, Bar-Or A and Zoukos Y, 2004. What do we know about the mechanism of action of disease-modifying treatments in MS? *Journal of Neurology*, 251 Suppl 5, 12–29.
- Hawiger D et al., 2004. Immunological unresponsiveness characterized by increased expression of CD5 on peripheral T cells induced by dendritic cells in vivo. *Immunity*, 20(6), 695–705.
- Hemmer B, Archelos JJ and Hartung HP, 2002. New concepts in the immunopathogenesis of multiple sclerosis. *Nature Reviews. Neuroscience*, 3(4), 291–301.
- Hengel RL et al., 2003. Cutting Edge: L-Selectin (CD62L) Expression Distinguishes Small Resting Memory CD4+ T Cells That Preferentially Respond to Recall Antigen. *Journal of Immunology*, 170(1), 28–32.
- Heppner FL et al., 2005. Experimental autoimmune encephalomyelitis repressed by microglial paralysis. *Nature Medicine*, 11(2), 146–152.
- Hickey WF, 1999. Leukocyte traffic in the central nervous system: the participants and their roles. *Seminars in Immunology*, 11(2), 125–37.
- Hofstetter HH et al., 2007. Kinetics and organ distribution of IL-17-producing CD4 cells in proteolipid protein 139-151 peptide-induced experimental autoimmune encephalomyelitis of SJL mice. *Journal of Immunology*, 178(3), 1372–1378.
- Höftberger R et al., 2004. Expression of major histocompatibility complex class I molecules on the different cell types in multiple sclerosis lesions. *Brain Pathology*, 14(1), 43–50.
- Holmes RK, 2000. Biology and molecular epidemiology of diphtheria toxin and the tox gene. *The Journal of Infectious Diseases*, 181 Suppl 1, 156–167.
- Honjo T, Nishizuka Y and Hayaishi O, 1968. Diphtheria toxin-dependent adenosine diphosphate ribosylation of aminoacyl transferase II and inhibition of protein synthesis. *The Journal of Biological Chemistry*, 243(12), 3553–3555.

- Huang YM et al., 1999. Multiple sclerosis is associated with high levels of circulating dendritic cells secreting pro-inflammatory cytokines. *Journal of Neuroimmunology*, 99(1), 82–90.
- Hubert P et al., 2007. The cross-talk between dendritic and regulatory T cells: good or evil? *Journal of Leukocyte Biology*, 82(4), 781–794.
- Huleatt JW and Lefrançois L, 1995. Antigen-driven induction of CD11c on intestinal intraepithelial lymphocytes and CD8+ T cells in vivo. *Journal of Immunology*, 154(11), 5684–5693.
- Infante-Duarte C et al., 2000. Microbial lipopeptides induce the production of IL-17 in Th cells. *Journal of Immunology*, 165(11), 6107–6115.
- Isaksson M et al., 2009. Plasmacytoid DC promote priming of autoimmune Th17 cells and EAE. *European Journal of Immunology*, 39(10), 2925–2935.
- Ivanov II et al., 2006. The orphan nuclear receptor ROR γ directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. *Cell*, 126(6), 1121–1133.
- Jung S et al., 2002. In Vivo Depletion of CD11c+ Dendritic Cells Abrogates Priming of CD8+ T Cells by Exogenous Cell-Associated Antigens. *Immunity*, 17(2), 211–220.
- Kapsenberg ML, 2003. Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. *Nature Reviews. Immunology*, 3(12), 984–993.
- Kassiotis G et al., 1999. TNF accelerates the onset but does not alter the incidence and severity of myelin basic protein-induced experimental autoimmune encephalomyelitis. *European Journal of Immunology*, 29(3), 774–780.
- Kawakami N et al., 2005. Live imaging of effector cell trafficking and autoantigen recognition within the unfolding autoimmune encephalomyelitis lesion. *The Journal of Experimental Medicine*, 201(11), 1805–1814.
- Khatri, B. et al., 2011. Comparison of fingolimod with interferon beta-1a in relapsing-remitting multiple sclerosis: a randomised extension of the TRANSFORMS study. *The Lancet Neurology*, 10, 520–529.
- Kida S et al., 1995. Anatomical pathways for lymphatic drainage of the brain and their pathological significance. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 21(3), 181–184.
- Kisielow P et al., 1988. Tolerance in T-cell-receptor transgenic mice involves deletion of nonmature CD4+8+ thymocytes. *Nature*, 333(6175), 742–746.
- Korn T et al., 2007. Myelin-specific regulatory T cells accumulate in the CNS but fail to control autoimmune inflammation. *Nature Medicine*, 13(4), 423–431.
- Kuchroo VK et al., 1995. B7-1 and B7-2 costimulatory molecules activate differentially the Th1/Th2 developmental pathways: application to autoimmune disease therapy. *Cell*, 80(5), 707–718.

- Lafaille JJ et al., 1994. High incidence of spontaneous autoimmune encephalomyelitis in immunodeficient anti-myelin basic protein T cell receptor transgenic mice. *Cell*, 78(3), 399–408.
- Langrish CL et al., 2005. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *The Journal of Experimental Medicine*, 201(2), 233–240.
- Laouar Y et al., 2008. TGF-beta signaling in dendritic cells is a prerequisite for the control of autoimmune encephalomyelitis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 105(31), 10865–10870.
- Larsen CP et al., 1992. Functional expression of the costimulatory molecule, B7/BB1, on murine dendritic cell populations. *The Journal of Experimental Medicine*, 176(4), 1215–1220.
- Lassmann H, Brück W and Lucchinetti CF, 2007. The immunopathology of multiple sclerosis: an overview. *Brain Pathology*, 17(2), 210–218.
- Levine S and Sowinski R, 1973. Experimental allergic encephalomyelitis in inbred and outbred mice. *Journal of Immunology*, 110(1), 139–143.
- Lin CH and Hünig T, 2003. Efficient expansion of regulatory T cells in vitro and in vivo with a CD28 superagonist. *European Journal of Immunology*, 33(3), 626–638.
- Lutz MB and Schuler G, 2002a. Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity? *Trends in Immunology*, 23(9), 445–449.
- Lutz MB and Schuler G, 2002b. Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity? *Trends in Immunology*, 23(9), 445–449.
- Manel N, Unutmaz D and Littman DR, 2008. The differentiation of human TH-17 cells requires transforming growth factor- β and induction of the nuclear receptor ROR γ T. *Nature immunology*, 9(6), 641–649.
- McFarland HF and Martin R, 2007. Multiple sclerosis: a complicated picture of autoimmunity. *Nature Immunology*, 8(9), 913–919.
- McFarlin DE and McFarland HF, 1982a. Multiple sclerosis (first of two parts). *The New England Journal of Medicine*, 307(19), 1183–1188.
- McFarlin DE and McFarland HF, 1982b. Multiple sclerosis (second of two parts). *The New England Journal of Medicine*, 307(20), 1246–1251.
- McMahon EJ et al., 2005. Epitope spreading initiates in the CNS in two mouse models of multiple sclerosis. *Nature Medicine*, 11(3), 335–339.
- Mendel I, Kerlero de Rosbo N and Ben-Nun A, 1995a. A myelin oligodendrocyte glycoprotein peptide induces typical chronic experimental autoimmune encephalomyelitis in H-2b mice: fine specificity and T cell receptor V beta expression of encephalitogenic T cells. *European Journal of Immunology*, 25(7), 1951–1959.

- Mendel I, Kerlero de Rosbo N and Ben-Nun A, 1995b. A myelin oligodendrocyte glycoprotein peptide induces typical chronic experimental autoimmune encephalomyelitis in H-2b mice: fine specificity and T cell receptor V beta expression of encephalitogenic T cells. *European Journal of Immunology*, 25(7), 1951–1959.
- Mendel I, Kerlero de Rosbo N and Ben-Nun A, 1995c. A myelin oligodendrocyte glycoprotein peptide induces typical chronic experimental autoimmune encephalomyelitis in H-2b mice: fine specificity and T cell receptor V beta expression of encephalitogenic T cells. *European Journal of Immunology*, 25(7), 1951–1959.
- Menges M, Rössner S, et al., 2002. Repetitive injections of dendritic cells matured with tumor necrosis factor alpha induce antigen-specific protection of mice from autoimmunity. *The Journal of Experimental Medicine*, 195(1), 15–21.
- Merad M and Ginhoux F, 2007. Dendritic cell genealogy: a new stem or just another branch? *Nature Immunology*, 8(11), 1199–1201.
- Miltenyi S et al., 1990. High gradient magnetic cell separation with MACS. *Cytometry*, 11(2), 231–238.
- Miyake Y et al., 2007. Protective role of macrophages in noninflammatory lung injury caused by selective ablation of alveolar epithelial type II Cells. *Journal of Immunology*, 178(8), 5001–5009.
- Mosayebi G and Moazzeni SM, 2011. Spleen and Liver Dendritic Cells Differ in their Tolerogenic and Cytokine Induction Potential. *Iranian Journal of Allergy, Asthma, and Immunology*, 10(3), 163–170.
- Murphy KM, Travers P and Walport M, 2009. *Janeway Immunologie* 7th ed., Spektrum Akademischer Verlag.
- Naglich JG et al., 1992. Expression cloning of a diphtheria toxin receptor: identity with a heparin-binding EGF-like growth factor precursor. *Cell*, 69(6), 1051–1061.
- Ohnmacht C et al., 2009. Constitutive ablation of dendritic cells breaks self-tolerance of CD4 T cells and results in spontaneous fatal autoimmunity. *The Journal of Experimental Medicine*, 206(3), 549–559.
- Olitsky PK and Yager RH, 1949. Experimental disseminated encephalomyelitis in white mice. *The Journal of Experimental Medicine*, 90(3), 213–224.
- Pappenheimer AM et al., 1982. Diphtheria toxin and related proteins: effect of route of injection on toxicity and the determination of cytotoxicity for various cultured cells. *The Journal of Infectious Diseases*, 145(1), 94–102.
- Pashenkov M et al., 2001. Two subsets of dendritic cells are present in human cerebrospinal fluid. *Brain: A Journal of Neurology*, 124(Pt 3), 480–492.
- Paterson PY, 1960. Transfer of allergic encephalomyelitis in rats by means of lymph node cells. *The Journal of Experimental Medicine*, 111, 119–136.

- Peterson JW et al., 2001. Transected neurites, apoptotic neurons, and reduced inflammation in cortical multiple sclerosis lesions. *Annals of Neurology*, 50(3), 389–400.
- Piccinini AM and Midwood KS, 2010a. DAMPening inflammation by modulating TLR signalling. *Mediators of Inflammation*, 2010,
- Prinz M et al., 2008. Distinct and nonredundant in vivo functions of IFNAR on myeloid cells limit autoimmunity in the central nervous system. *Immunity*, 28(5), 675–686.
- Probst HC et al., 2005. Histological analysis of CD11c-DTR/GFP mice after in vivo depletion of dendritic cells. *Clinical and Experimental Immunology*, 141(3), 398–404.
- Racke MK et al., 2000. The role of costimulation in autoimmune demyelination. *Journal of Neuroimmunology*, 107(2), 205–215.
- Reis e Sousa C, 2006. Dendritic cells in a mature age. *Nature Reviews. Immunology*, 6(6), 476–483.
- van Rijt LS et al., 2005. In vivo depletion of lung CD11c+ dendritic cells during allergen challenge abrogates the characteristic features of asthma. *The Journal of Experimental Medicine*, 201(6), 981–991.
- Rivers TM, Sprunt DH and Berry GP, 1933. Observations on attempts to produce acute disseminated encephalomyelitis in monkeys. *The Journal of Experimental Medicine*, 58(1), 39–53.
- Ruddle NH et al., 1990. An antibody to lymphotoxin and tumor necrosis factor prevents transfer of experimental allergic encephalomyelitis. *The Journal of Experimental Medicine*, 172(4), 1193–1200.
- Saito M et al., 2001. Diphtheria toxin receptor-mediated conditional and targeted cell ablation in transgenic mice. *Nature Biotechnology*, 19(8), 746–750.
- Sakaguchi S et al., 1985. Organ-specific autoimmune diseases induced in mice by elimination of T cell subset. I. Evidence for the active participation of T cells in natural self-tolerance; deficit of a T cell subset as a possible cause of autoimmune disease. *The Journal of Experimental Medicine*, 161(1), 72–87.
- Sakaguchi S, 2005. Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nature Immunology*, 6(4), 345–352.
- Salomon B and Bluestone J, 2001. Complexities of CD28/B7: CTLA-4 costimulatory pathways in autoimmunity and transplantation. *Annual Review of Immunology*, 19, 225–252.
- Salomon B et al., 2000. B7/CD28 costimulation is essential for the homeostasis of the CD4+CD25+ immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes. *Immunity*, 12(4), 431–440.
- Sandvig K and Olsnes S, 1980. Diphtheria toxin entry into cells is facilitated by low pH. *The Journal of Cell Biology*, 87(3 Pt 1), 828–832.

- Sapoznikov A and Jung S, 2008. Probing in vivo dendritic cell functions by conditional cell ablation. *Immunology and Cell Biology*, 86(5), 409–415.
- Sapoznikov A et al., 2007. Organ-dependent in vivo priming of naive CD4+, but not CD8+, T cells by plasmacytoid dendritic cells. *The Journal of Experimental Medicine*, 204(8), 1923–1933.
- Serafini B et al., 2006. Dendritic cells in multiple sclerosis lesions: maturation stage, myelin uptake, and interaction with proliferating T cells. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 65(2), 124–141.
- Setoguchi R et al., 2005. Homeostatic maintenance of natural Foxp3(+) CD25(+) CD4(+) regulatory T cells by interleukin (IL)-2 and induction of autoimmune disease by IL-2 neutralization. *The Journal of Experimental Medicine*, 201(5), 723–735.
- Shortman K and Liu YJ, 2002. Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nature Reviews. Immunology*, 2(3), 151–161.
- Shortman K and Naik SH, 2007. Steady-state and inflammatory dendritic-cell development. *Nature Reviews. Immunology*, 7(1), 19–30.
- Siffrin V et al., 2007. New insights into adaptive immunity in chronic neuroinflammation. *Advances in Immunology*, 96, 1–40.
- Slavin AJ et al., 2001. Requirement for endocytic antigen processing and influence of invariant chain and H-2M deficiencies in CNS autoimmunity. *The Journal of Clinical Investigation*, 108(8), 1133–1139.
- Stadelmann C and Brück W, 2008. Interplay between mechanisms of damage and repair in multiple sclerosis. *Journal of Neurology*, 255 Suppl 1, 12–18.
- Steinman L 2001. Multiple sclerosis: a two-stage disease. *Nature Immunology*, 2(9), 762–764.
- Steinman L and Zamvil S, 2006a. How to successfully apply animal studies in experimental allergic encephalomyelitis to research on multiple sclerosis. *Annals of Neurology*, 60(1), 12–21.
- Steinman L and Zamvil S, 2006b. How to successfully apply animal studies in experimental allergic encephalomyelitis to research on multiple sclerosis. *Annals of Neurology*, 60(1), 12–21.
- Steinman RM and Banchereau J, 2007. Taking dendritic cells into medicine. *Nature*, 449(7161), 419–426.
- Steinman RM and Nussenzweig MC, 2002. Avoiding horror autotoxicus: the importance of dendritic cells in peripheral T cell tolerance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 99(1), 351–358.
- Stromnes IM and Goverman JM, 2006a. Active induction of experimental allergic encephalomyelitis. *Nature Protocols*, 1(4), 1810–1819.

- Stromnes IM and Goverman JM, 2006b. Passive induction of experimental allergic encephalomyelitis. *Nature Protocols*, 1(4), 1952–1960.
- Tarbell KV, Yamazaki S and Steinman RM, 2006. The interactions of dendritic cells with antigen-specific, regulatory T cells that suppress autoimmunity. *Seminars in Immunology*, 18(2), 93–102.
- Tischner D et al., 2006. Polyclonal expansion of regulatory T cells interferes with effector cell migration in a model of multiple sclerosis. *Brain: A Journal of Neurology*, 129(Pt 10), 2635–2647.
- Tompkins SM et al., 2002. De novo central nervous system processing of myelin antigen is required for the initiation of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of Immunology* 4173–4183.
- Trapp BD et al., 1998. Axonal transection in the lesions of multiple sclerosis. *The New England Journal of Medicine*, 338(5), 278–285.
- Travis MA et al., 2007. Loss of integrin alpha(v)beta8 on dendritic cells causes autoimmunity and colitis in mice. *Nature*, 449(7160), 361–365.
- Viglietta V et al., 2004. Loss of functional suppression by CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. *The Journal of Experimental Medicine*, 199(7), 971–979.
- Wahl SM and Chen W, 2005. Transforming growth factor-beta-induced regulatory T cells referee inflammatory and autoimmune diseases. *Arthritis Research & Therapy*, 7(2), 62–68.
- Weber MS et al., 2007. Type II monocytes modulate T cell-mediated central nervous system autoimmune disease. *Nature Medicine*, 13(8), 935–943.
- Whartenby KA et al., 2005. Inhibition of FLT3 signaling targets DCs to ameliorate autoimmune disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 102(46), 16741–16746.
- Yamaizumi M et al., 1978. One molecule of diphtheria toxin fragment A introduced into a cell can kill the cell. *Cell*, 15(1), 245–250.
- Yamazaki S et al., 2007. Dendritic cells are specialized accessory cells along with TGF- for the differentiation of Foxp3+ CD4+ regulatory T cells from peripheral Foxp3 precursors. *Blood*, 110(13), 4293–4302.
- Yamazaki S et al., 2003. Direct expansion of functional CD25+ CD4+ regulatory T cells by antigen-processing dendritic cells. *The Journal of Experimental Medicine*, 198(2), 235–247.
- Zaft T et al., 2005. CD11c high dendritic cell ablation impairs lymphopenia-driven proliferation of naive and memory CD8+ T cells. *Journal of Immunology*, 6428–6435.
- Zamvil S et al., 1985. T-cell clones specific for myelin basic protein induce chronic relapsing paralysis and demyelination. *Nature*, 317(6035), 355–358.

- Zamvil S Steinman L, 1990. The T lymphocyte in experimental allergic encephalomyelitis. *Annual Review of Immunology*, 579–621.
- Zeng M, Guinet E and Nouri-Shirazi M, 2009. B7-1 and B7-2 differentially control peripheral homeostasis of CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) regulatory T cells. *Transplant Immunology*, 20(3), 171–179.
- Zipp F and Aktas O, 2006. The brain as a target of inflammation: common pathways link inflammatory and neurodegenerative diseases. *Trends in Neurosciences*, 29(9), 518–527.
- Zozulya AL et al., 2010. The role of dendritic cells in CNS autoimmunity. *Journal of Molecular Medicine*, 88(6), 535–544.
- Zozulya AL et al., 2009. Intracerebral dendritic cells critically modulate encephalitogenic versus regulatory immune responses in the CNS. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 29(1), 140–152.

TIERSCHUTZ

Die beschriebenen Versuche wurden im Rahmen der tierschutzrechtlichen Bestimmungen des Landes Berlin durchgeführt.

Genehmigungsnummer für Tierversuche: G0029/08 sowie G0090/09 vom 13.07.2009

Tötungsnummer: T0271-08

DANKSAGUNG

Besonderer Dank gebührt meiner Doktormutter Frau Prof. Frauke Zipp für die umfassende und fortwährende Förderung, ihre Anregungen sowie für die Möglichkeit zur Durchführung der Experimente meiner Doktorarbeit.

Ich möchte mich besonders bei Volker Siffrin bedanken, welcher mir die gesamte Zeit über durch seine Ideen und Anregungen, seine konstruktive Kritik und sein Fachwissen zur Seite stand und damit maßgeblichen Einfluss an der Entstehung dieser Dissertation hat.

Des Weiteren möchte ich Magda Paterka, Helena Radbruch, Thordis Hohnstein, Natalie Asselborn, Tina Leuenberger und Robert Günther für ihre stets hilfreiche und professionelle Unterstützung danken. Der kollegiale und vor allem freundschaftliche Zuspruch, welchen ich in der gemeinsamen Zeit erfahren durfte, war von großem Wert.

Nicht zuletzt gilt mein besonderer und tiefer Dank meinen Eltern für ihre durchweg uneingeschränkte Unterstützung sowie für ihr unglaubliches Verständnis, welches sie mir in all den Jahren entgegengebracht haben.

LEBENS LAUF

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

PUBLIKATIONSLISTE

Voss, J.*, Siffrin, V.*, Werr, J.*, Leuenberger, T., Herz, J., Paterka, J., Radbruch, H., Radbruch, A., Infante-Duarte, C., Jung, S., Zipp, F. Dendritic cells differentially regulate central nervous system inflammation by modulation of the Th17 – Treg balance. (* gleichberechtigte Erstautorenschaft) *eingereicht*

ERKLÄRUNG AN EIDES STATT

Hiermit erkläre ich, Jan Oliver Helmut Voß, die vorliegende Dissertation mit dem Thema „Der Einfluss dendritischer Zellen auf den Krankheitsverlauf der Multiplen Sklerose im Tiermodell“ selbständig und ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst zu haben, dass die vorliegende Dissertation auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten darstellt und die dafür benutzten Hilfsmittel sowie die Literatur vollständig angegeben sind.

Mir ist zudem die dem Verfahren zugrunde liegende Promotionsordnung bekannt.

Berlin, den 20. Oktober 2011

Jan Voß