

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

## DISSERTATION

Identifizierung schützender und schädigender Effekte dendritischer Zellen  
in zwei Tiermodellen der Multiplen Sklerose

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
der Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Johannes Werr

aus München

Gutachter/in:       1. Prof. Dr. F. Zipp  
                          2. Prof. Dr. N. Goebels  
                          3. Dr. D. Merkler

Datum der Promotion: 05.12.2014

## Zusammenfassung

Autoimmune Neuroinflammation wird durch enzephalitogene T-Zellen vermittelt, für deren Differenzierung und Reaktivierung Antigen-präsentierende Zellen unabdingbar sind. Dendritische Zellen bilden eine heterogene Gruppe professioneller Antigen-präsentierender Zellen, deren pathophysiologische Bedeutung im Modell der experimentellen autoimmunen Enzephalitis (EAE) kontrovers diskutiert wird. So gibt es neben der etablierten, pro-inflammatorischen Funktion dieser Zellen auch Hinweise für ihre Beteiligung an der Regulation organspezifischer Autoimmunität. In der hier vorgelegten Arbeit wurde mit Hilfe von CD11c-DTR→C57BL/6 Knochenmarkchimären, die eine konditionelle Depletion dendritischer Zellen erlauben, der *in-vivo* Effekt dieser Zellpopulation während der EAE untersucht. Dabei zeigte sich, dass dendritische Zellen den klinischen Verlauf und die Balance zwischen IL-17-produzierenden T-Helferzellen (Th17) und regulatorischen T-Zellen (Treg) abhängig von Krankheitsphase und –modell unterschiedlich modulieren können. So entfalteten dendritische Zellen während der initialen Phase der aktiven EAE, die die Differenzierung und Proliferation naiver T-Zellen in den peripheren lymphatischen Organen erfordert, einen schützenden Effekt. Ihre Auslöschung führte hier zu einem aggressiv veränderten ZNS-Infiltrat mit vermehrtem Auftreten von Th17-Zellen und beeinträchtigte darüber hinaus die Induktion protektiver Treg-Zellen. Dagegen fand sich im Modell der Transfer-EAE, das pathophysiologisch eher die Effektorphase autoimmuner Neuroinflammation abbildet, eine pro-inflammatorische Wirkung dendritischer Zellen. So kam es nach ihrer Depletion zu einem deutlich mildereren klinischen Verlauf und einer verminderten ZNS-Invasion bereits differenzierter, Myelin-spezifischer Th17-Zellen.

Schlagworte: EAE, Multiple Sklerose, Immunregulation, dendritische Zellen, Th17-Zellen, Treg-Zellen

## Abstract

Autoimmune neuroinflammation is a pathological phenomenon requiring antigen presenting cells (APC) for priming and reactivating encephalitogenic T cells. Dendritic cells constitute an inhomogeneous entity of professional APCs, whose pathophysiological contribution during experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) is controversially discussed. Besides their established pro-inflammatory function, there is increasing evidence suggesting a pivotal role of this cell population in regulating organ-specific autoimmunity. The aim of this study was to investigate the actual *in-vivo* effect of dendritic cells during EAE, by using transgenic CD11c-DTR→C57BL/6 bone-marrow chimeras, which permit conditional depletion of these cells. Interestingly, dendritic cells were capable of modulating clinical severity and balance between T helper 17 (Th17) and regulatory T cells (Treg) differentially, depending on disease phase and model. During the initial stage of active EAE, comprising differentiation and proliferation of naïve T cells in the secondary lymphoid organs, dendritic cells mediated a protective effect. Ablation in this period led to clinical exacerbation and enhanced frequencies of central-nervous-system-(CNS)-infiltrating Th17 cells, coinciding with an impaired induction of anti-inflammatory Treg cells. In the model of transfer-EAE however, which rather represents the effector phase inside the target organ, dendritic cells seemed to function as potent, pro-inflammatory APCs. This was suggested by the observation, that their depletion ameliorated clinical severity and decreased CNS-invasion of already differentiated, myelin-specific Th17 cells.

Keywords: EAE, multiple sclerosis, immune regulation, dendritic cells, Th17, Treg cells



<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>3</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>4</b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>8</b>
<b>1.1 Grundlagen des Immunsystems</b> .....	<b>8</b>
1.1.1 T-Zellen .....	8
1.1.2 B-Zellen .....	14
1.1.3 Antigen-präsentierende Zellen .....	14
<b>1.2 Die Multiple Sklerose</b> .....	<b>17</b>
1.2.1 Ätiologie und Pathogenese der Multiplen Sklerose .....	17
1.2.2 Klinisches Bild und Therapie der Multiplen Sklerose.....	18
<b>1.3 Autoimmune Neuroinflammation im Modell der Experimentellen Autoimmunen   Enzephalomyelitis (EAE)</b> .....	<b>20</b>
1.3.1 Die EAE als Modell der Multiplen Sklerose .....	20
1.3.2 T-Zell-vermittelte autoimmune Neuroinflammation im Modell der EAE.....	21
<b>2 Zielsetzung dieser Arbeit</b> .....	<b>23</b>
<b>3 Material und Methoden:</b> .....	<b>24</b>
<b>3.1 Laborartikel</b> .....	<b>24</b>
3.1.1 Puffer, Lösungen und Zellkulturmedien.....	24
3.1.2 FACS-Antikörper und Sekundärfarbstoffe .....	25
3.1.3 Sonstige Reagenzien und Chemikalien.....	26
3.1.4 Kunststoffartikel und sonstiges Verbrauchsmaterial.....	27
3.1.5 Geräte.....	27
3.1.6 Zweiphotonenmikroskopie .....	27
3.1.7 Verwendete Software .....	27
<b>3.2 Tiermodelle</b> .....	<b>28</b>
3.2.1 Mausstamm C57BL/6 .....	28
3.2.2 Mausstamm CD11c-DTR-GFP .....	28
3.2.3 Mausstamm B6.2d2.....	29
3.2.4 Mausstamm B6.tdRFP .....	29
3.2.5 Mausstamm B6.2d2.tdRFP .....	29
<b>3.3 Zellbiologische Methoden</b> .....	<b>29</b>
3.3.1 Zellkultur .....	29
3.3.2 Zellisolation.....	30
3.3.3 Magnetische Zellsortierung .....	32

<b>3.4</b>	<b>Durchflusszytometrie</b> .....	<b>32</b>
3.4.1	Prinzip der Durchflusszytometrie .....	32
3.4.2	Fluoreszenzfärbung von Oberflächenmolekülen .....	33
3.4.3	Fluoreszenzfärbung intrazellulärer Moleküle .....	33
3.4.4	CFSE-Färbung und Proliferationsexperimente .....	34
3.4.5	Propidiumiodid-Färbung .....	35
<b>3.5</b>	<b>Generierung von Knochenmarkchimären</b> .....	<b>35</b>
<b>3.6</b>	<b>Depletion dendritischer Zellen in CD11c-DTR→C57BL/6 Knochenmarkchimären</b>	<b>36</b>
<b>3.7</b>	<b>Das Tiermodell der EAE</b> .....	<b>36</b>
3.7.1	Aktive EAE .....	37
3.7.2	Transfer-/passive EAE .....	37
<b>3.8</b>	<b>Histologie</b> .....	<b>38</b>
3.8.1	Gewebefixierung .....	38
3.8.2	Hämatoxylin-Eosin-Färbung .....	38
3.8.3	Luxol-Fast-Blue-Färbung .....	39
<b>3.9</b>	<b>Intravitale Zwei-Photonen-Mikroskopie</b> .....	<b>39</b>
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>41</b>
<b>4.1</b>	<b>Erfolgreiche Depletion dendritischer Zellen in CD11c-DTR→C57BL/6 Knochenmarkchimären</b> .....	<b>41</b>
<b>4.2</b>	<b>Aktive EAE in der Abwesenheit dendritischer Zellen</b> .....	<b>43</b>
4.2.1	Schwerer klinischer Verlauf der aktiven EAE nach Depletion dendritischer Zellen	43
4.2.2	Histologische Untersuchung während aktiver EAE .....	46
4.2.3	Beschleunigte ZNS-Migration von T-Effektorzellen nach Auslöschung dendritischer Zellen .....	47
4.2.4	Vermehrte ZNS-Infiltration von Th17-Zellen in der Abwesenheit dendritischer Zellen .....	50
4.2.5	Verminderte Induktion regulatorischer T-Zellen nach Depletion dendritischer Zellen .....	51
<b>4.3</b>	<b>T-Zellproliferation nach Depletion dendritischer Zellen <i>in-vivo</i> und <i>in-vitro</i></b> .....	<b>53</b>
<b>4.4</b>	<b>Transfer-EAE in der Abwesenheit dendritischer Zellen</b> .....	<b>54</b>
4.4.1	Abgemilderter klinischer Verlauf der Transfer-EAE nach Depletion dendritischer Zellen .....	54
4.4.2	Reduzierte ZNS-Infiltration von Th17-Zellen nach Auslöschung dendritischer Zellen .....	57
4.4.3	Interaktion von Th17- und dendritischen Zellen im entzündeten ZNS <i>in-vivo</i> .....	60
<b>5</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>62</b>

<b>5.1 Dendritische Zellen im autoimmun-entzündeten ZNS.....</b>	<b>62</b>
<b>5.2 Protektive Rolle dendritischer Zellen im Modell der aktiven EAE .....</b>	<b>63</b>
5.2.1 Dendritische Zellen limitieren klinischen Schweregrad und Th17- vermittelte ZNS-Schädigung während aktiver EAE .....	63
5.2.2 Dendritische Zellen fördern Induktion und ZNS-Akkumulation von Treg-Zellen nach aktiver Immunisierung .....	65
<b>5.3 Dendritische Zellen fördern die T-Zellproliferation <i>in-vivo</i>.....</b>	<b>67</b>
<b>5.4 Pro-inflammatorische Rolle dendritischer Zellen im Modell der Transfer-EAE.....</b>	<b>68</b>
5.4.1 Dendritische Zellen verstärken klinischen Schweregrad und ZNS-Invasion enzephalitogener Th17-Zellen während Transfer-EAE.....	68
<b>5.5 Duale Funktion dendritischer Zellen während autoimmuner Entzündung .....</b>	<b>69</b>
<b>5.6 Therapeutische Manipulation dendritischer Zellen .....</b>	<b>71</b>
<b>6 Literaturverzeichnis.....</b>	<b>73</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>86</b>
<b>Tierschutz .....</b>	<b>88</b>
<b>Danksagung .....</b>	<b>89</b>
<b>Lebenslauf.....</b>	<b>90</b>
<b>Publikationsliste .....</b>	<b>91</b>
<b>Eidstattliche Erklärung.....</b>	<b>92</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Grundlagen des Immunsystems

In Anpassung an die permanente Bedrohung durch mannigfaltige Krankheitserreger entwickelten höhere Lebewesen im Verlauf der Evolution ein zunehmend komplexeres, zellulär gesteuertes Abwehrsystem. Es muss einerseits die zuverlässige Erkennung und Eliminierung pathogener Viren, Bakterien, Pilze und Parasiten, die sog. Immunität, gewährleisten und andererseits gewebeschädigende Immunreaktionen gegen harmlose Mikroben oder körpereigene Strukturen verhindern. Trotz zahlreicher funktioneller Interaktionen hat sich die Einteilung in ein phylogenetisch sehr früh entstandenes, *angeborenes* und ein erst bei Wirbeltieren auftretendes *adaptives* Immunsystem durchgesetzt. Das *angeborene* Abwehrsystem kann eindringende Keime anhand typischer molekularer Muster unspezifisch erkennen und sie durch Phagozytose, Aktivierung des Komplementsystems oder Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine wirksam bekämpfen. Dafür spezialisierte Zellen wie Makrophagen und Granulozyten zeichnen sich dabei durch ein erregerunabhängiges, relativ gleichartiges Reaktionsmuster aus. Das *adaptive* Abwehrsystem hingegen ist durch seine hohe Spezifität gekennzeichnet, die es durch somatische Rekombination von Genabschnitten in Lymphozyten erreicht. So wird eine sehr hohe Anzahl einzigartiger Rezeptoren generiert, die in der Lage sind, nahezu jede molekulare Struktur präzise zu erkennen und gegebenenfalls eine Immunantwort zu initiieren. Das zweite Hauptcharakteristikum der *adaptiven* Immunität ist die Fähigkeit, ein „immunologisches Gedächtnis“ zu etablieren, das bei erneutem Erregerkontakt nach Infektion oder Impfung eine raschere und differenzierte Immunreaktion erlaubt (Murphy et al., 2008).

### 1.1.1 T-Zellen

#### 1.1.1.1 T-Zellentwicklung

T-Zellen entwickeln sich im Knochenmark aus hämatopoetischen Stammzellen. Wesentliche Schritte ihrer funktionellen Reifung finden jedoch erst nach ihrer Einwanderung in den Thymus statt. Jeder dieser sog. Thymozyten trägt einen einzigartigen Rezeptor, der durch die zufällige Anordnung für den T-Zell-Rezeptor codierender Gene entstanden ist. Im Rahmen des nun einsetzenden Selektionsprozesses werden ca. 98% der Thymozyten eliminiert, da ihr T-Zell-Rezeptor entweder nicht in der Lage ist, MHC-Moleküle (engl.: major histocompatibility complex)

in Kombination mit CD4 bzw. CD8 (engl.: cluster of differentiation) zu erkennen oder mit zu hoher Affinität an körpereigene Antigene bindet. Der Transkriptionsfaktor AIRE (engl.: autoimmune regulator) sorgt dabei in Thymusepithelzellen für die Expression einer Vielzahl Organ-spezifischer Proteine, die normalerweise nicht im Thymus vorkommen. So können auch autoreaktive T-Zellen, die sich gegen Selbstantigene peripherer Gewebe richten, erkannt und deletiert werden (Anderson et al., 2002). Diesem als „zentrale Toleranz“ bezeichneten Selektionsmechanismus wird eine wichtige Rolle bei der Verhinderung autoimmuner Entzündung zugeschrieben. Die verbliebenen, naiven T-Zellen beginnen nun kontinuierlich zwischen Blut und sekundär lymphatischem Gewebe zu zirkulieren. Hier treffen sie auf Antigen-präsentierende Zellen, deren MHC-Peptid-Komplexe sie bezüglich der Affinität zu ihrem T-Zellrezeptor durchmustern.

### **1.1.1.2 MHC-Restriktion der T-Zell Antwort**

T-Zellen können ihr Antigen nicht in gelöster Form erkennen, sondern sind dazu zwingend auf die Präsentation durch MHC-Moleküle auf anderen Zellen angewiesen. Nur bei gleichzeitiger Bindung des T-Zell-Rezeptors an das passende Antigen und MHC-Molekül kann er aktiviert werden. MHC-Komplexe sind Transmembranproteine, an deren extrazellulärem Anteil sich eine Peptidbindungstasche befindet. Ein definiertes MHC-Molekül kann dabei eine Vielzahl, jedoch nicht alle Arten endogener und exogener Peptide binden und präsentieren. Um protektive Immunität gegenüber einem großen Spektrum von Erregern zu erreichen, verfügt jedes Individuum über mehrere MHC-Allele und innerhalb von Populationen findet sich ein ausgeprägter Gen-Polymorphismus. CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen (Th-Zellen) erkennen ihr Antigen nur, wenn es ihnen im Kontext von MHC-II-Molekülen präsentiert wird. Dies erfolgt durch professionelle Antigen-präsentierende Zellen, die die Bindungstaschen von MHC-II-Molekülen mit prozessierten extrazellulären Antigenen beladen und diese an ihrer Zelloberfläche verankern. Der T-Zellrezeptor CD8<sup>+</sup> zytotoxischer T-Zellen kann sein Antigen nur binden, wenn dieses durch MHC-I-Moleküle präsentiert wird. Alle kernhaltigen Zellen exprimieren MHC-I und binden durch das Proteasom abgebaute zytosolische Peptide daran (Murphy et al., 2008).

### **1.1.1.3 T-Helferzellen**

CD4<sup>+</sup> Th-Zellen bilden eine Untergruppe innerhalb der T-Zellen mit zentraler Bedeutung für Initiierung und Steuerung der Immunität gegen eine Vielzahl von Erregern. Die Wichtigkeit dieser Zellen für eine schützende Immunantwort wird bei der HIV-Infektion (humanes Immunodefizienzvirus) deutlich, die zur Zerstörung CD4<sup>+</sup> Th-Zellen führt, wodurch es regelhaft zum Auftreten opportunistischer Infektionen kommt. Bei Aktivierung des T-Zell-Rezeptors und gleichzeitigem Vorhandensein kostimulatorischer Signale können in naiven CD4<sup>+</sup> Th-Zellen unterschiedliche Differenzierungsprogramme initiiert werden, die zu funktionell distinkten Phänotypen führen (Abb. 1). Um eine optimal an die Bedrohung adaptierte Differenzierung der T-Zellen zu erreichen, werden Informationen über das entzündete Gewebe, lokales Zytokinmilieu, Art und Antigenität des Erregers sowie Signale der Antigen-präsentierenden Zelle integriert (Farrar et al., 2002; Matzinger, 2007). Die 1986 von Mosmann et al. angestoßene Einteilung von CD4<sup>+</sup> Th-Zellen in Th1- und Th2-Zellen unterschied die beiden Zellpopulationen anhand ihrer spezifischen Zytokinproduktion (Mosmann et al., 1986). In der Folge wurden diese Subpopulationen funktionell immer detaillierter charakterisiert und die für ihre Differenzierung spezifischen Signalmoleküle und Transkriptionsfaktoren definiert. Dabei zeigte sich, dass Zytokine und Differenzierungsfaktoren einer Subpopulation die Expression der für die andere Zelllinie wichtigen Botenstoffe und Transkriptionsfaktoren hemmen (Farrar et al., 2002).

Th1-Zellen sind spezialisiert auf die Bekämpfung und Beseitigung intrazellulärer Erreger wie *Listeria monocytogenes* oder Mycobakterien. Dies erreichen sie durch Aktivierung von Makrophagen und zytotoxischen T-Zellen sowie durch Anregung von B-Zellen zur Produktion opsonierender Antikörper. Typischerweise sezernieren Th1-Zellen die pro-inflammatorischen Zytokine Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), Interleukin-2 (IL-2) und Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). Das von Makrophagen und dendritischen Zellen produzierte IL-12 ist der entscheidende Differenzierungsfaktor für Th1-Zellen, zusätzlich fördert IFN- $\gamma$  über einen positiven, autokrinen Rückkoppelungsmechanismus die Entwicklung dieses Phänotyps (Hsieh et al., 1993; Lighvani et al., 2001). Die Expression des für Th1-Zellen zentralen Zytokins IFN- $\gamma$  wird durch den spezifischen Transkriptionsfaktor T-bet gesteuert (Szabo et al., 2000). Eine pathophysiologische Beteiligung von Th1-Zellen bei zahlreichen organspezifischen autoimmunen Erkrankungen gilt als gesichert (Zhu et al., 2010).

Th2-Zellen übernehmen wichtige Aufgaben bei der humoral vermittelten Bekämpfung extrazellulärer Erreger und spielen eine wichtige Rolle in der Pathophysiologie allergischer Reaktionen. Durch ihre Sekretion von IL-4, IL-5 und IL-13 können sie B-Zellen zur Proliferation anregen und die Produktion neutralisierender Antikörper steigern. Für ihre Differenzierung aus naiven T-Zellen sind IL-2 und IL-4 notwendig, der dabei entscheidende Transkriptionsfaktor ist GATA-3 (Le Gros et al., 1990; Zheng und Flavell, 1997).

Cua et al. konnten 2003 zeigen, dass darüber hinaus noch eine dritte CD4+ Effektorzellpopulation existiert (Cua et al., 2003). Aufgrund ihrer Produktion von IL-17, die weder in Th1- noch in Th2-Zellen detektierbar ist, wurden sie als Th17-Zellen bezeichnet (Park et al., 2005). Die nachfolgende Entdeckung des für Th17-Zellen spezifischen Transkriptionsfaktors ROR $\gamma$ t (engl.: RAR-related orphan receptor gamma) etablierte diese Subgruppe endgültig als eigenständige Entität (Ivanov et al., 2006). Für die Differenzierung von Th17-Zellen sind das immunmodulatorische TGF- $\beta$  (engl.: transforming growth factor) und das pro-inflammatorische IL-6 essentiell, wobei unter bestimmten Bedingungen auch IL-21 die Funktion von IL-6 übernehmen kann (Bettelli et al., 2006b; Korn et al., 2007a). Darüber hinaus ist IL-23 ein wichtiges Zytokin für diese Zellpopulation, das jedoch weniger für die initiale Differenzierung, sondern vielmehr für Reifung und dauerhaften Erhalt des Th17-Phänotyps von Bedeutung ist (Zhu et al., 2010).

Th17-Zellen sind für die Immunität gegenüber einer Vielzahl von Erregern, wie *Candida albicans*, *Pneumocystis carinii*, *Mycobacterium tuberculosis* sowie bestimmten extrazellulären Bakterien, von Bedeutung. Zunehmend deutlich wird auch das pathophysiologisch bedeutsame Potential von Th17-Zellen, sowohl in experimentellen Tiermodellen, als auch bei zahlreichen humanen Erkrankungen, eine aggressive, destruierende Gewebeentzündung zu vermitteln (Korn et al., 2009).

### **1.1.1.4 Regulatorische T-Zellen**

Als Gegenpart der pro-inflammatorischen Effektorzellen supprimieren regulatorische T-Zellen (Treg) nach Beseitigung der Erreger Entzündungsreaktionen und halten die Toleranz des Immunsystems gegenüber Kommensalen und körpereigenen Strukturen aktiv aufrecht. So helfen sie, die Gewebeschädigung durch infektiöse oder autoimmune Entzündung zu begrenzen. Die initiale Beschreibung dieser protektiven CD4+ T-

## Einleitung

Zellpopulation erfolgte anhand ihrer Expression des Oberflächenmarkers CD25 ( $\alpha$ -Kette des IL-2-Rezeptors). Wurden die CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T-Zellen bei der Rekonstitution lymphopener Mäuse nicht mittransfundiert oder aktiv depletiert, so kam es zur Entwicklung einer diffusen autoimmunen Entzündung (Sakaguchi et al., 1995). Als für Differenzierung und Funktion dieser Zellen spezifischer Transkriptionsfaktor konnte FoxP3 (engl.: forkhead-box-protein P3) bestimmt werden (Hori et al., 2003). Die Bedeutung von Treg-Zellen für die Immunhomöostase zeigt das Auftreten des sog. IPEX-Syndromes (engl.: immunodysregulation polyendocrinopathy enteropathy X-linked syndrome) bei Mutationen im humanen FoxP3-Gen. Darüber hinaus entwickeln transgene Mäuse nach konditioneller Depletion FoxP3<sup>+</sup> Treg-Zellen ein autoimmunes Syndrom (Lahl et al., 2007).

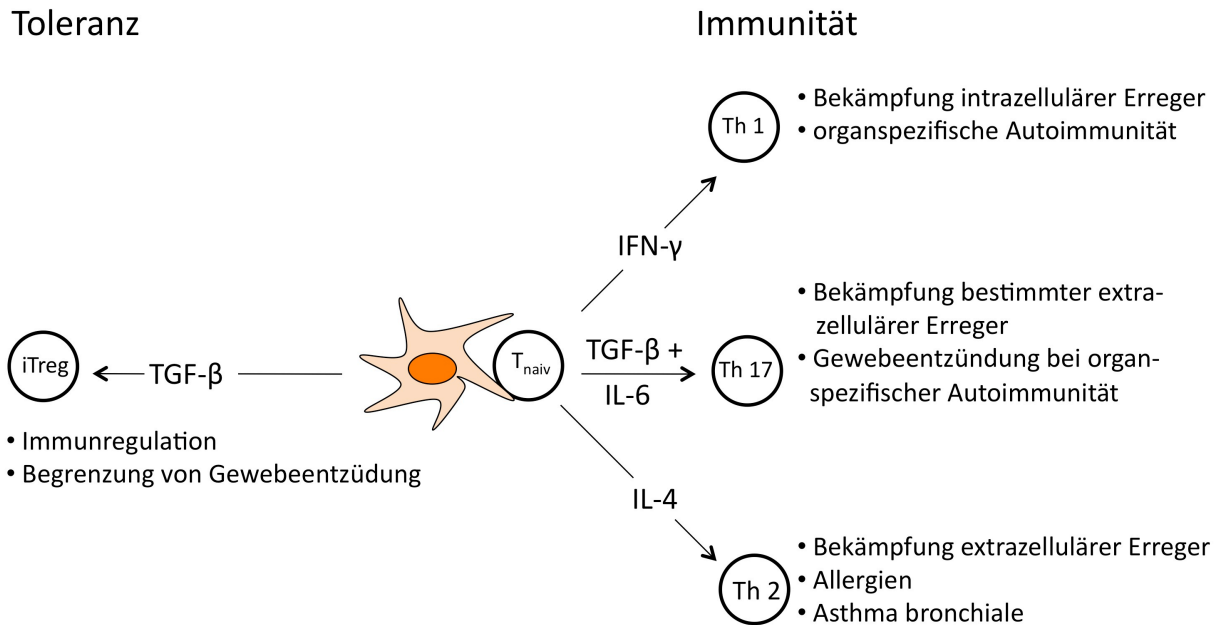
Die Differenzierung CD4<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> Treg-Zellen gelingt – in Abwesenheit des pro-inflammatorischen IL-6 – durch TGF- $\beta$  und führt zur Suppression von Th1-, Th2- und Th17-Effektorzellen (Bettelli et al., 2006b). Interessanterweise gibt es eine wechselseitige Beziehung zwischen Treg- und Th17-Zellen. Die antagonistische Interaktion der Transkriptionsfaktoren FoxP3 und ROR $\gamma$ t scheint dabei über die Differenzierung der einzelnen Zelle zu anti- oder pro-inflammatorischem Phänotyp zu entscheiden (Zhou et al., 2008).

Vereinfachend unterscheidet man sog. "natürlich vorkommende" CD25<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> Treg-Zellen, die aus dem Thymus stammen und in der Peripherie induzierbare regulatorische T-Zellen, wie die TGF- $\beta$ -produzierenden Th3-Zellen oder die IL-10-produzierenden Tr1-Zellen (engl.: type 1 T regulatory cell) (Belkaid und Chen, 2010).

Treg-Zellen entfalten ihre supprimierende Wirkung sowohl durch die Sekretion anti-inflammatorischer Zytokine, als auch über Zellkontakt-abhängige Mechanismen. Eine wichtige Rolle spielt hierbei die Hemmung der Expression kostimulatorischer Moleküle auf dendritischen Zellen durch CTLA-4 (engl.: cytotoxic T-lymphocyte antigen 4) (Wing und Sakaguchi, 2010).

Pathophysiologisch scheint eine reduzierte funktionelle Aktivität von Treg-Zellen mit autoimmunen Erkrankungen wie Multipler Sklerose, rheumatoider Arthritis oder Diabetes mellitus Typ 1 assoziiert zu sein. Eine gesteigerte Suppression durch Treg-Zellen beeinträchtigt dagegen möglicherweise die Immunität gegenüber Tumoren oder Viren (Cools et al., 2007).





**Abbildung 1: Differenzierung von T-Helferzellen** (nach (Bettelli et al., 2008))

Um die Differenzierung naiver CD4+ T-Zellen einzuleiten, ist die durch Antigen-präsentierende Zellen vermittelte, gleichzeitige Aktivierung von T-Zellrezeptor und kostimulatorischen Rezeptoren notwendig. Abhängig vom dabei vorhandenen Zytokinmilieu können so verschiedene Subpopulationen von T-Helferzellen oder induzierbare Treg-Zellen (iTreg) entstehen.

### 1.1.1.5 Zytotoxische T-Zellen

Die Aufgabe CD8+ zytotoxischer T-Zellen ist die selektive Induktion des programmierten Zelltodes in infizierten, entarteten oder schwer beschädigten Zellen. Durch die ständige periphere Zirkulation und Kontrolle der im MHC-I-Kontext präsentierten zytosolischen Peptide ist diese Zellpopulation ein wichtiger Bestandteil der kontinuierlichen Überwachung der Gewebeintegrität durch das Immunsystem. Während akuter Infektionen beginnen die naiven CD8+ T-Zellen sehr stark zu proliferieren und erlangen ihren Effektorphänotyp. Dieser befähigt sie, infizierte Zellen durch Sekretion von Zytokinen wie Perforin und Granzym oder direkte Interaktion von Molekülen an der Zelloberfläche wie dem Fas-Liganden (CD95L) zu zerstören. Nach überstandener Infektion stirbt die Mehrheit der CD8+ zytotoxischen Effektorzellen ab und hinterlässt lediglich eine kleine Anzahl langlebiger Gedächtniszellen. Diese

beantworten auch nach vielen Jahren die abermalige Exposition gegenüber dem Erreger mit einer raschen und protektiven Immunantwort (Williams and Bevan, 2007).

### **1.1.2 B-Zellen**

B-Zellen sind aufgrund ihrer Fähigkeit zur Sekretion löslicher Antikörper die zentralen Vermittler der humoralen Immunität. Nach der Reifung im Knochenmark zirkulieren naive B-Zellen durch Blut und sekundär lymphatisches Gewebe. Erkennen sie dort mit ihrem B-Zellrezeptor ihr passendes Antigen, so wandern sie in Lymphknoten oder Milz. Wenn sie hier zusätzlich aktivierende Signale von Th2-Zellen erhalten, so führt dies zur Proliferation und der Differenzierung zu Plasmazellen. Diese sezernieren Antikörper, die lösliche Form des B-Zellrezeptors, die Pathogene neutralisieren können und die Elimination von Erregern durch Komplementaktivierung und Phagozytose erleichtern. Zusätzlich werden langlebige Gedächtnis-B-Zellen generiert, die bei erneuter Konfrontation mit dem Antigen die schnelle Produktion passender Antikörper erlauben (Murphy et al., 2008).

### **1.1.3 Antigen-präsentierende Zellen**

Als *professionelle Antigen-präsentierende Zellen* bezeichnet man dendritische Zellen, Makrophagen und B-Zellen. Sie zeichnen sich durch ihre Fähigkeit zur Präsentation exogener, häufig durch Phagozytose aufgenommener Peptide im Kontext von MHC-II-Molekülen aus. Bei Vorliegen von mikrobiellen Gefahrensignalen exprimieren sie zusätzlich kostimulatorische Moleküle wie CD80 und CD86. Diese können an den CD28-Rezeptor auf naiven CD4<sup>+</sup> T-Zellen binden und sind neben dem positiven Signal über den T-Zellrezeptor für deren Differenzierung zu Effektorzellen notwendig.

#### **1.1.3.1 Dendritische Zellen**

Dendritische Zellen bilden eine heterogene Gruppe professioneller Antigen-präsentierender Zellen. Die konventionellen dendritischen Zellen zeichnen sich durch ihre Expression des  $\beta$ -Integrins CD11c aus und können anhand weiterer Oberflächenmarker in distinkte Subpopulationen eingeteilt werden. So unterscheidet man bei der Maus CD11b<sup>+</sup>, CD11b<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> und CD11b<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup> dendritische Zellen (Shortman und Naik, 2007). Neben den konventionellen, gibt es auch plasmazytoide dendritische Zellen, die in der Milz vorkommen und geringere Mengen an CD11c exprimieren. Sie zeigen eine untypische Morphologie und sezernieren bei Kontakt mit Viren große Mengen von Typ I Interferonen (Colonna et al., 2004).

## Einleitung

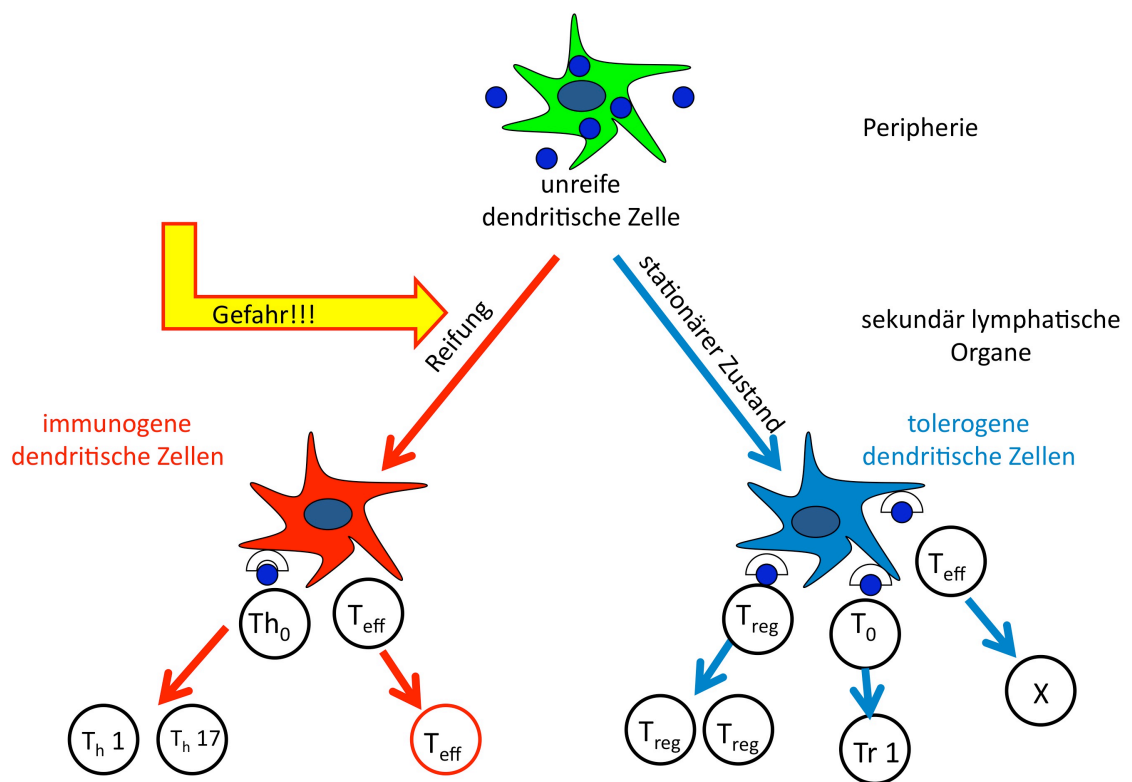
Eine eher funktionell orientierte Einteilung unterscheidet dendritische Zellen anhand ihrer aktuellen Aufgabe. "Unreife" dendritische Zellen zirkulieren dabei fortwährend durch Blut und parenchymatöse Organe, auf der Suche nach möglichen Infektionserregern. Mit Hilfe sogenannter *toll-like*-Rezeptoren, die evolutionär konservierte Pathogen-assoziierte Strukturen wie den bakteriellen Zellwandbestandteil *Lipopolysaccharid* oder virale doppelsträngige Ribonukleinsäure (RNS) erkennen, detektieren sie sehr früh beginnende Infektionen oder drohenden Gewebeschaden (Banchereau und Steinman, 1998). Außerdem können sie lokale Entzündungen anhand des Vorhandenseins pro-inflammatorischer Zytokine ausfindig machen. Beide Signalwege führen zur Einleitung eines irreversiblen Reifungsprozesses dendritischer Zellen, in deren Folge sie in die drainierenden lymphatischen Organe migrieren und sich dort in Antigen-präsentierende Zellen umwandeln. Dieses Entwicklungsprogramm beinhaltet die Oberflächenexpression von stabilen MHC-II-Peptid-Komplexen, kostimulatorischen Moleküle wie CD80/CD86 und bestimmten Chemokinrezeptoren wie CCR7 (Abb. 2) (Banchereau et al., 2000). Derart transformierte "reife" dendritische Zellen verfügen *in-vivo* und *in-vitro* über eine einzigartige Fähigkeit zur Stimulation naiver CD4<sup>+</sup> T-Zellen. So ermöglichen dendritische Zellen, selbst bei geringen Antigenmengen, die selektive Aktivierung hoch spezifischer, sehr seltener T-Zell-Klone. Diese "immunogenen" dendritischen Zellen steuern dabei aktiv die Polarisierung naiver T-Zellen zu einem an die pathogene Bedrohung angepassten Effektorphänotyp (Rissoan et al., 1999; Bailey et al., 2007). Zusätzlich können dendritische Zellen nach Phagozytose befallener Zellen pathogene Moleküle im MHC-I-Kontext präsentieren. Dieser "Kreuzpräsentation" genannte Vorgang ist wichtig für die Stimulation zytotoxischer T-Zellimmunität gegen neoplastische oder virale Antigene, die nicht primär in dendritischen Zellen vorkommen (Heath und Carbone, 2001; Jung et al., 2002).

Neben ihrer Rolle bei der Initiierung von Immunreaktionen, sind dendritische Zellen auch wichtig für deren Limitierung und die Aufrechterhaltung der Toleranz gegenüber körpereigenen Antigenen. Im Rahmen der "zentralen Toleranz" im Thymus sind sie an der negativen Selektion autoreaktiver T-Zellen beteiligt (Brocker et al., 1997). Die "tolerogene" Wirkung dendritischer Zellen im adulten Organismus dagegen wird vorwiegend durch Präsentation von Autoantigenen bei fehlender Kostimulation und durch Interaktion mit regulatorischen T-Zellen vermittelt (Steinman et al., 2003). Eine

## Einleitung

dauerhafte Entfernung aller dendritischen Zellen führt daher bei transgenen Mäusen zu einer systemischen Aktivierung von Lymphozyten. Umstritten ist jedoch, ob es sich dabei um den Ausbruch eines spontanen autoimmunen Syndroms (Ohnmacht et al., 2009) oder eine myeloproliferative Störung handelt (Birnberg et al., 2008).

Da auch aktivierte dendritische Zellen regulatorische Funktionen ausüben können (Yamazaki et al., 2003), wird die dichotome Einteilung in “unreif - tolerogen” und “reif - immunogen” zunehmend zugunsten einer differenzierteren Sichtweise aufgegeben (Reis e Sousa, 2006).



### Abbildung 2: Klassisches Konzept der Interaktion von dendritischen Zellen und CD4+ T-Zellen

Unreife dendritische Zellen nehmen in der Peripherie eine Vielzahl von Molekülen auf, prozessieren diese im Zytosol und präsentieren sie anschließend im Kontext von MHC-II-Molekülen in den sekundär lymphatischen Organen. Bei Abwesenheit pro-inflammatorischer Stimuli führt die Präsentation von Autoantigenen zu Aktivierung/Proliferation vorhandener Treg-Zellen, Induktion regulatorischer T-Zellen aus naiven T-Zellen (T<sub>0</sub>) oder Deletion/Anergie (x) autoreaktiver T-Effektorzellen (T<sub>eff</sub>). Wird jedoch durch mikrobielle Gefahrensignale die Reifung dendritischer Zellen eingeleitet, so resultiert daraus die Differenzierung und Proliferation von Th-Zellen bzw. die Reaktivierung vorhandener T-Effektorzellen, die eine schützende Immunantwort vermitteln.

## 1.2 Die Multiple Sklerose

### 1.2.1 Ätiologie und Pathogenese der Multiplen Sklerose

Die Multiple Sklerose ist eine chronisch-entzündliche, demyelinisierende Erkrankung des zentralen Nervensystems (ZNS). Sie wurde 1868 erstmals systematisch und umfassend von Jean Martin Charcot beschrieben, der *post-mortem* im ZNS von Patienten mit intermittierenden neurologischen Ausfällen die Infiltration entzündlicher Zellen beobachtete (Charcot, J, 1868). Experimentelle und genetische Studien konnten schon Anfang des 20. Jahrhunderts zeigen, dass es sich sehr wahrscheinlich um eine autoimmun-vermittelte Erkrankung in genetisch prädisponierten Individuen handelt (Rivers et al., 1933; Mackay und Myrianthopoulos, 1966). In den folgenden Jahrzehnten konnten viele weitere Hinweise gefunden werden, die die Hypothese einer autoimmunen Pathogenese stützten. Der Nachweis, dass myelinspezifische T-Zellen nicht generell pathologisch sind, sondern regelhaft bei Gesunden und Multiple-Sklerose-Patienten vorkommen, legte die Bedeutung peripherer Toleranzmechanismen nahe, die physiologischerweise die Aktivierung dieser autoreaktiven T-Zellen verhindern (Pette et al., 1990).

Ein weiterer Beleg für die ätiologisch bedeutsame Rolle des Immunsystems - insbesondere der Th-Zellen - ist die bekannte Assoziation bestimmter HLA-Allele (engl.: human leukocyte antigen) mit dem Erkrankungsrisiko für Multiple Sklerose (Haines et al., 1996). Da diese Genpolymorphismen jedoch auch bei Gesunden vorkommen, wird zusätzlich von einem externen Auslöser in der Umwelt ausgegangen der in der Lage ist, enzephalitogene T-Zellen zu aktivieren und so zum Ausbruch der Multiplen Sklerose zu führen.

Die Theorie des „molekularen Mimicry“ postulierte, dass in der Auseinandersetzung mit dem Immunsystem bei Infektionserregern ein Selektionsdruck entstehe, durch möglichst hohe Sequenzähnlichkeit zu humanen Antigenen, nicht detektierbar zu sein. Dies könnte bei dem Vorliegen einer Kreuzreaktivität, der durch den Erreger aktivierten T-Zellen mit endogenen Myelinantigenen, die physiologischerweise durch die Blut-Hirn-Schranke vom peripheren Immunsystem abgeschirmt sind, autoimmune Neuroinflammation auslösen (Sospedra und Martin, 2005).

Die Hypothese der „Bystander-Aktivierung“ dagegen geht von einer akzidentellen, unspezifischen Aktivierung der bei allen Individuen vorhandenen, autoreaktiven T-Zellen durch das pro-inflammatorische Milieu im Rahmen einer Infektionserkrankung

aus. Verschiedene bakterielle und virale Erreger wie *Chlamydia pneumoniae*, humanes Herpes-Virus-6 oder das Epstein-Barr-Virus wurden als mögliche Auslöser der Multiplen Sklerose angeschuldigt. Der Beweis für eine infektiöse Genese im klassischen Sinne konnte jedoch nicht geführt werden (Sospedra und Martin, 2005).

Aufgrund der zentralen Rolle der Th17-Zellen in der experimentellen autoimmunen Encephalomyelitis (EAE), dem etablierten Tiermodell der Multiplen Sklerose, rückte diese Zellpopulation in den letzten Jahren auch in den Fokus der Erforschung der humanen Pathologie. So konnte gezeigt werden, dass humane Th17-Zellen *in-vitro* in der Lage sind, das ZNS-Endothel zu durchwandern und post-mortem in Multiple-Sklerose-Läsionen nachweisbar sind (Kebir et al., 2007). Außerdem war die Expression von IL-23 in dendritischen Zellen von Multiple-Sklerose-Patienten erhöht, was mit der Fähigkeit dieser Zellen einherging, in T-Zellen die IL-17 Produktion anzuregen (Vaknin-Dembinsky et al., 2006). Eine weitere Ursache der Erkrankung könnte die bei Multiple-Sklerose beobachtete, verminderte regulatorische Funktion von CD4+ CD25+ Treg-Zellen sein (Viglietta et al., 2004).

Disseminierte Läsionen in der weißen Substanz des ZNS mit entzündlichen, de- und remyelinisierenden Anteilen, sind das charakteristische histopathologische Bild bei der Multiplen Sklerose. Die infiltrierenden Leukozyten sind hauptsächlich perivaskulär lokalisiert, wobei T-Zellen und Makrophagen überwiegen. Es wird angenommen, dass diese Zellen für die Mikrogliaaktivierung und den lokalen Zusammenbruch der Blut-Hirn-Schranke verantwortlich sind. Darüber hinaus kommt es jedoch auch zu einer diffusen Schädigung der weißen Substanz und einer Demyelinisierung im Kortex (Lassmann et al., 2007).

Zunehmend deutlich wird die pathophysiologische Bedeutung der bereits früh im Krankheitsverlauf zu beobachtenden axonalen und neuronalen Schädigung (Trapp et al., 1998). Diese scheint mit dem Ausmaß der entzündlichen Aktivität zu korrelieren und ist im Langzeitverlauf entscheidend für das Ausmaß der neurologischen Behinderung (Siffrin et al., 2010b).

### **1.2.2 Klinisches Bild und Therapie der Multiplen Sklerose**

Die Multiple Sklerose manifestiert sich meist zwischen dem 15. – 40. Lebensjahr und ist in dieser Altersgruppe in den Industrienationen die häufigste Ursache einer bleibenden neurologischen Behinderung. Weltweit sind ca. 1 Million Menschen von Multipler

## Einleitung

Sklerose betroffen, wobei Frauen fast doppelt so häufig erkranken (Goverman, 2009). Klinisch leiden die Patienten initial meist unter der schubförmigen Verlaufsform, bei der sich subakut auftretende neurologische Defizite wie Sehstörungen, Paresen der Extremitäten, sensible Defizite oder Blasen-Mastdarmstörungen im Intervall wieder vollständig zurückbilden. Nach 10 Jahren Krankheitsdauer kommt es jedoch bei ca. 50% der Patienten zum Übergang in eine sekundär progressive Verlaufsform mit schleichender Verschlechterung, fehlender Rückbildungstendenz der Defizite und häufigem Verlust der Gehfähigkeit (Siffrin et al., 2007). Der Verlauf der Erkrankung ist dabei individuell sehr unterschiedlich. Die Ursachen dieser Variabilität sind jedoch nicht bekannt, so dass keine Parameter zur Risikostratifikation existieren. Daher muss die nicht-kurative und teilweise nebenwirkungsbehaftete Therapie an Verlaufsform und Progression der Erkrankung angepasst werden.

Während eines akuten Schubereignisses wird meist hochdosiert mit Glucocorticoiden behandelt. Deren anti-ödematöse und unspezifisch anti-inflammatorische Wirkung beschleunigt die Rückbildung des neurologischen Defizites, ohne einen positiven Einfluss auf den Langzeitverlauf zu haben (Hafler, 2004).

Als sog. „immunmodulatorische Medikamente“ werden IFN- $\beta$  und Glatirameracetat zusammengefasst. Beide können die Schubhäufigkeit reduzieren, haben jedoch nur einen bescheidenen Einfluss auf die Progression der Erkrankung. Der komplexe Wirkmechanismus des IFN- $\beta$  umfasst unter anderem die Induktion des anti-inflammatorischen IL-10 und neurotropher Faktoren sowie die Hemmung der Migration von T-Zellen über die Blut-Hirn-Schranke (Sospedra und Martin, 2005).

Glatirameracetat ist ein aus vier Aminosäuren zufällig aufgebautes Copolymer, das ursprünglich als Myelin-ähnliches Protein zur EAE-Induktion entwickelt wurde. Sein pleiotroper, protektiver Effekt ist nicht vollständig verstanden, beruht jedoch möglicherweise auf der Fähigkeit zur Induktion des Th2-Phänotyps in Glatirameracetat-reaktiven Zellen sowie der kompetitiven Blockade der Bindungsstelle von MHC-II-Molekülen (Siffrin et al., 2007).

Natalizumab, ein humanisierter monoklonaler Antikörper gegen das Adhäsionsmolekül VLA-4 (engl.: very-late antigen-4), hemmt sehr effektiv die Einwanderung von Lymphozyten über die Blut-Hirn-Schranke ins ZNS und reduziert dadurch signifikant Schubrate und Krankheitsprogression. Aufgrund der unter Natalizumab-Therapie beobachteten, opportunistischen ZNS-Infektionen bleibt diese Behandlung jedoch

schweren Verlaufsformen vorbehalten. Im Rahmen einer derartigen eskalierenden Therapie der Multiplen Sklerose kann auch das Zytostatikum Mitoxantron verwendet werden, dessen Einsatz aber durch seine Kardiotoxizität und der Erhöhung des Leukämierisikos limitiert ist (Siffrin et al., 2007).

### **1.3 Autoimmune Neuroinflammation im Modell der Experimentellen Autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE)**

Autoimmune Neuroinflammation ist ein sich sequentiell entwickelnder Prozess. Unter nicht vollständig aufgeklärten Bedingungen wird in naiven, myelinspezifischen CD4+ T-Zellen nach Kontakt mit ihrem Antigen ein irreversibles Differenzierungsprogramm eingeleitet. Es wird angenommen, dass sich dies in den sekundär lymphatischen Organen abspielt. Die dabei entstehenden T-Effektorzellen sind nun in der Lage, in das ZNS einzuwandern. Nach lokaler Reaktivierung durch Antigen-präsentierende Zellen im perivaskulären Raum sezernieren sie Zytokine, die andere Immunzellen wie Makrophagen und Mikroglia stimulieren. Dies löst eine pro-inflammatorische Kaskade aus, in deren Folge es zu Demyelinisierung und neuronaler Degeneration kommt. Klinisch kann sich diese entzündliche Parenchymschädigung dann als neurologisches Defizit manifestieren (Goverman, 2009).

#### **1.3.1 Die EAE als Modell der Multiplen Sklerose**

Aufgrund der geringen Verfügbarkeit humaner Biopsien von Multiple-Sklerose-Patienten sind Tiermodelle zur weiteren Erforschung der Erkrankung unabdingbar und haben schon zur Etablierung hochaktiver Therapien der Multiplen Sklerose beigetragen. Das dabei am häufigsten eingesetzte Modell ist die EAE, die viele immun- und histopathologische Ähnlichkeiten zur Multiplen Sklerose aufweist (Gold et al., 2006). Zweifelsohne ist sie dennoch nicht in der Lage, die volle Komplexität und Heterogenität der humanen Pathologie, insbesondere bezüglich des Langzeitverlaufs, abzubilden. Die erfolgreiche Translation von mittels EAE entwickelter Therapeutika wie Glatirameracetat und Natalizumab in die klinische Patientenversorgung verdeutlicht jedoch ihren Nutzen (Teitelbaum et al., 1971; Yednock et al., 1992).

Einer der Hauptkritikpunkte gegen dieses Krankheitsmodell besteht in der Notwendigkeit der „gewaltsamen“ Immunisierung mittels unspezifischer Immunstimulatoren (Gold et al., 2006). Durch die gleichzeitige transgene Expression eines Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein-(MOG)-spezifischen B- und T-Zell-



Rezeptors, gelang es jedoch in C57BL/6 Mäusen ein spontanes, optiko-spinal betontes EAE-Modell zu entwickeln (Bettelli et al., 2006a; Krishnamoorthy et al., 2006).

### **1.3.2 T-Zell-vermittelte autoimmune Neuroinflammation im Modell der EAE**

In suszeptiblen Mausstämmen kann die EAE entweder durch aktive Immunisierung mit Myelinproteinen und pro-inflammatorischen Adjuvanzen oder den Transfer enzephalitogener T-Zellen induziert werden. Nach einer Latenzphase von ca. 7 – 15 Tagen kommt es dann zu, von den hinteren zu den vorderen Extremitäten aufsteigenden Lähmungen. Abhängig von Tierstamm und verwendetem Antigen, zeigen sich klinisch und histopathologisch unterschiedliche Verlaufsformen.

Da die Induktion der EAE in naiven Tieren durch den Transfer enzephalitogener CD4<sup>+</sup> Th-Zellen, jedoch nicht durch Antikörper und nur sporadisch durch CD8<sup>+</sup> T-Zellen gelingt, gelten die CD4<sup>+</sup> Th-Zellen als zentral für die Pathogenese (Sospedra and Martin, 2005). Die lange Zeit angenommene, entscheidende Rolle der Th1-Zellen wurde grundlegend in Frage gestellt, als sich zeigte, dass die Deletion des für diese Zellen typischen IFN- $\gamma$ , keinen protektiven Effekt hatte, sondern zu einem schwereren EAE-Verlauf führte (Ferber et al., 1996). Die Entdeckung, dass IL-23 und nicht das zur Differenzierung von Th1-Zellen essentielle IL-12, für die EAE-Induktion vorhanden sein muss, legte dann die pathogenetische Beteiligung einer weiteren Zellpopulation nahe (Cua et al., 2003). Da bei den CD4<sup>+</sup> Th-Zellen der EAE-resistenten, konstitutiv IL-23-deletierten Mäusen keine IL-17-Produktion nachweisbar war und der Transfer einer kleinen Anzahl von Th17-Zellen zu einem schweren Krankheitsverlauf führte, lag eine kausale Beteiligung dieser neu-definierten Th17-Zellen nahe (Langrish et al., 2005). Die Effektormechanismen dieser Th17-Zellen, die zur eigentlichen Gewebeerstörung im ZNS führen, sind noch unvollständig verstanden. Während IL-17A und IL-17F dafür nicht essentiell zu sein scheinen (Haak et al., 2009), gibt es Hinweise für einen direkten, MHC-II-unabhängigen axonalen Schädigungsmechanismus (Siffrin et al., 2010a). Eine dichotome Charakterisierung des pathogenen Potentials von Th1- und Th17-Zellen ist jedoch nicht möglich, vielmehr scheint das numerische Verhältnis beider Populationen zueinander den Ort der Entzündung innerhalb des ZNS zu beeinflussen (Stromnes et al., 2008).

Da die Depletion CD25<sup>+</sup> Treg-Zellen die normale EAE-Remission verhindert und der Transfer von Treg-Zellen aus dem ZNS erkrankter Tiere die Rezipienten vor der EAE schützt, wird ihnen ein protektiver Effekt zugeschrieben (McGeachy et al., 2005).

## Einleitung

Andererseits scheinen Antigen-spezifische Treg-Zellen nicht in der Lage zu sein, enzephalitogene T-Effektorzellen aus dem ZNS erkrankter Tiere zu supprimieren, solange diese große Mengen an IL-6 und TNF sezernieren (Korn et al., 2007b).

Die Beteiligung CD8<sup>+</sup> T-Zellen bei Krankheitsinduktion und Gewebeschädigung während EAE ist nicht abschließend geklärt und geprägt von z.T. widersprüchlichen Ergebnissen. So gibt es Hinweise für eine pro-inflammatorische Wirkung, da nach dem Transfer Myelin-spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen ein schwerer EAE-Verlauf beobachtet wurde. Dieser unterscheidet sich jedoch klinisch und histo-pathologisch deutlich von der durch CD4<sup>+</sup> Th-Zellen induzierten EAE (Huseby et al., 2001). Andererseits können CD8<sup>+</sup> T-Zellen auch regulierend auf Th-Zellen wirken und dadurch die entzündliche Aktivität begrenzen (Hu et al., 2004).

Im Gegensatz zu T-Zellen sind B-Zellen und Antikörper nicht essentiell oder ausreichend für die EAE-Induktion. Hat sich der Entzündungsprozess jedoch bereits entfaltet, so führt der Transfer MOG-spezifischer Antikörper zu einer Zunahme des klinischen Schweregrades und der histologischen Demyelinisierung (Urich et al., 2006).

Neben den Lymphozyten sind aber auch Antigen-präsentierende Zellen und lokale Mikrogliazellen in der Pathogenese der EAE von Bedeutung. Dies verdeutlichen Experimente von McMahon et al., die zeigten, dass Antigen-präsentierende Zellen im entzündeten ZNS naive T-Zellen aktivieren können, deren T-Zell-Rezeptoren gegen andere als die ursprünglich krankheitsauslösenden Antigene gerichtet sind (McMahon et al., 2005). Dieser „epitope spreading“ genannte Prozess ist für die Amplifizierung der T-Zell-Antwort und die Chronifizierung der Erkrankung mitverantwortlich.

Darüber hinaus sind auch Mikrogliazellen an der Entstehung manifesten Gewebeschadens im ZNS beteiligt, da ihre Inaktivierung während der EAE einen schützenden Effekt vermittelt (Heppner et al., 2005).

## 2 Zielsetzung dieser Arbeit

Die Rolle dendritischer Zellen während autoimmuner Neuroinflammation wird kontrovers diskutiert. Während es für die pathogenetische Beteiligung dendritischer Zellen in der Multiplen Sklerose nur sehr vage Hinweise gibt, gelang es im Modell der EAE unterschiedliche Aufgaben genauer zu charakterisieren (Zozulya et al., 2010). Dabei gibt es neben der etablierten Funktion als pro-inflammatorische Antigen-präsentierende Zellen (Greter et al., 2005; Bailey et al., 2007) auch zahlreiche Arbeiten, die einen zentralen Beitrag dendritischer Zellen bei der Regulation organspezifischer Autoimmunität nahe legen (Menges et al., 2002; Hawiger et al., 2004). Es ist anzunehmen, dass die in Teilen widersprüchliche Literatur Ausdruck der Heterogenität und funktionellen Vielseitigkeit dieser Zellgruppe ist. Auch im Hinblick auf mögliche therapeutische Ansatzpunkte bei der Multiplen Sklerose ist deshalb eine vertiefte Kenntnis der Arbeitsweise dendritischer Zellen dringend erforderlich. In der hier vorgelegten Arbeit wurde durch Einsatz von CD11c-DTR→C57BL/6 Knochenmarkchimären, die die frei wählbare Depletion dendritischer Zellen erlauben, der *in-vivo* Effekt dieser Zellen auf den Verlauf der EAE untersucht. Ziel war es, die Funktion dendritischer Zellen während verschiedener Phasen der autoimmunen Neuroinflammation genauer zu charakterisieren. Da es sich bei der EAE um eine T-Zellvermittelte Modellerkrankung handelt, lag der Fokus auf der Modulation von regulatorischen und T-Effektorzellen durch dendritische Zellen.

Folgende Fragen sollten in dieser Arbeit beantwortet werden:

- I. Welche Auswirkung hat die Auslöschung dendritischer Zellen auf den Verlauf der EAE nach aktiver Immunisierung?
- II. Ist der gleiche Effekt im Modell der passiven EAE nach Transfer enzephalitogener Th17-Zellen zu beobachten?
- III. Welche Folgen hat die Depletion dendritischer Zellen für das regulatorische und T-Effektorzellkompartiment während sich entwickelnder und manifester autoimmuner Neuroinflammation?
- IV. Führt die Abwesenheit dendritischer Zellen zu einer veränderten Zusammensetzung ZNS-infiltrierender Zellen?

### 3 Material und Methoden:

#### 3.1 Laborartikel

##### 3.1.1 Puffer, Lösungen und Zellkulturmedien

Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS)	PAA Laboratories, Österreich
FACS-Puffer	PBS 0,5% bovines Serumalbumin (BSA), Serva, Deutschland 0,5% Natriumazid (NaN <sub>3</sub> ), Merck, Deutschland
MACS-Puffer	PBS 0,5% BSA 2 mM EDTA, Sigma-Aldrich, Deutschland
Saponin-Puffer	PBS 0,5% BSA 0,5% Saponin, Roth, Deutschland
Zellkulturmedium für murine Zellen	RPMI 1640, Gibco Invitrogen, Deutschland 1% HEPES 1 M, Gibco Invitrogen, Deutschland 10% fetales Kälberserum (FCS), Biochrom, Deutschland 100 µg/ml Streptomycin, Gibco Invitrogen, Deutschland 100 U/ml Penicillin, Gibco Invitrogen, Deutschland 2 mM L-Glutamin, Gibco Invitrogen, Deutschland
Waschmedium	RPMI 1640, Gibco Invitrogen, Deutschland 1% HEPES 1 M, Gibco Invitrogen, Deutschland 5% FCS 100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin
Lysis-Puffer	PBS 1% KHCO <sub>3</sub> , Merck, Deutschland 8,29% NH <sub>4</sub> Cl, Roth, Deutschland 37,2% Na <sub>2</sub> EDTA
Iscove's Mod Dulbecco's Medium (IMDM)	2 mM L-Glutamin, 25 mM HEPES

## 3.1.2 FACS-Antikörper und Sekundärfarbstoffe

Tab. 1: Murine Oberflächenantikörper

Name	Klon	Konzentration	Herkunft
$\alpha$ -m-CD4-Biotin	GK1.5	5 $\mu$ g/ml	BD Bioscience, Deutschland
$\alpha$ -m-CD4-Alexa 647	RM4-5	0,5 mg/ml	Invitrogen, USA
$\alpha$ -m-CD4-Alexa 700	RM4-5	0,2 mg/ml	BD Bioscience, Deutschland
$\alpha$ -m-CD8-Biotin	53-6.7	0,5 mg/ml	BD Bioscience, Deutschland
$\alpha$ -m-CD25-APC	PC61	1 $\mu$ g/ml	BD Bioscience, Deutschland
$\alpha$ -m-CD11c-Biotin	HL3	0,5 mg/ml	BD Bioscience, Deutschland
$\alpha$ -m-CD11b-APC	M1/70	100 $\mu$ g/0,5 ml	BD Bioscience, Deutschland
$\alpha$ -m-CD3	SK7	0,5 mg/ml	BD Bioscience, Deutschland
$\alpha$ -m-CD3-PE	145-2C11	0,2 mg/ml	BD Bioscience, Deutschland
$\alpha$ -m-CD28	37-51	0,5 mg/ml	BD Bioscience, Deutschland
$\alpha$ -m-CD45-Biotin	30-F11	0,5 mg/ml	BD Bioscience, Deutschland
$\alpha$ -m-CD45-Pacific Blue	30-F11	0,2 mg/ml	BD Bioscience, Deutschland
$\alpha$ -m-Vb11-Biotin	RR3-15	0,5 mg/ml	BD Bioscience, Deutschland
$\alpha$ -m-CD62L-APC	MEL-14	0,2 mg/ml	BD Bioscience, Deutschland

Tab. 2: Antikörper gekoppelt an magnetische Mikropartikel (MB)

Name	Herkunft
$\alpha$ -m-CD4 MB	Miltenyi Biotec, Deutschland
$\alpha$ -m-CD90 MB	Miltenyi Biotec, Deutschland
CD4+ T-Zell Isolations-Kit	Miltenyi Biotec, Deutschland
$\alpha$ -m-CD62L	Miltenyi Biotec, Deutschland

Tab. 3: Murine intrazelluläre Antikörper

Name	Klon	Konzentration	Herkunft
$\alpha$ -m-IL17-PE	TC11-18H10.1	1 $\mu$ g/ml	BD Bioscience, Deutschland
$\alpha$ -m-IL17-FITC	eBio17B7	0,5 mg/ml	eBioscience, USA
$\alpha$ -m-IFN $\gamma$ -FITC	XMG1.2	5 $\mu$ g/ml	eBioscience, USA
$\alpha$ -m-IFN $\gamma$ -PE	XMG1.2	2 $\mu$ g/ml	Miltenyi Biotec, Deutschland
$\alpha$ -m-IFN $\gamma$ -Alexa 700	XMG1.2	0,2 mg/ml	BD Bioscience, Deutschland
$\alpha$ -m-FoxP3-PE	FJK-16S	0,2 mg/ml	eBioscience, USA
$\alpha$ -m-FoxP3-APC	FJC-16A	0,2 mg/ml	eBioscience, USA

Tab. 4: Sekundärantikörper, Isotypenkontrollen und Sonstige

Name	Klon	Konzentration	Herkunft
APC Isotyp IgG <sub>1</sub>		2,5 $\mu$ g/ml	BD Bioscience, Heidelberg
FITC Isotyp IgG <sub>2</sub>		5 $\mu$ g/ml	BD Bioscience, Heidelberg
PE Isotyp IgG <sub>1</sub>	R3-34		BD Bioscience, Heidelberg
PE Isotyp IgG <sub>2A</sub> rat	R35-95		BD Bioscience, Heidelberg
SA-APC		1 $\mu$ g/ml	BD Bioscience, Heidelberg

## Material und Methoden

SA-PerCP		1 µg/ml	BD Bioscience, Heidelberg
SA-Pacific Blue		1 µg/ml	BD Bioscience, Heidelberg
SA-Alexa 405		1 µg/ml	Invitrogen, USA
α-m-Fcγ III/II Rezeptor (CD16/CD32)	2.4G2	5 µg/ml	BD Bioscience, Heidelberg

### 3.1.3 Sonstige Reagenzien und Chemikalien

Agarose	Merck, Deutschland
Aqua ad injectabilia	Merck, Deutschland
Brefeldin A	Sigma-Aldrich, Deutschland
Complete Freud's Adjuvants (CFA)	BD Difco, Germany
Clostridiopeptidase	Sigma, Deutschland
Carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE)	Molecular Probes, Invitrogen, Deutschland
Diphtherietoxin (DTX)	List Biologicals, USA
DMSO	Sigma, Deutschland
DNase	Roche, Deutschland
Ethanol	Merck, Deutschland
Enrofloxacin	Bayer Health Care, Deutschland
Eosinlösung wässrig 1%	Dr. K. Holborn & Söhne, Deutschland
Glucose 20%	Braun, Deutschland
Hämatoxylin	Dr. K. Holborn & Söhne, Deutschland
Interleukin-6 (IL-6)	R & D, Deutschland
Interleukin-23 (IL-23)	R & D, Deutschland
Isofluran	Abbot, Deutschland
Ketamin	Curamed, Deutschland
Kollagenase	Sigma, Deutschland
Luxol-Fast-Blue (LFB)	Sigma, Deutschland
MOG <sub>35-55</sub> MEVGWYRSPFSRVVHLYRNGK	Pepceuticals, UK
NaCl 0,9%	Braun, Deutschland
OVA <sub>339-351</sub> ISQAVHAAHAEINEAGR	Pepceuticals, UK
Paraformaldehyd (PFA)	Roth, Deutschland
Percoll	Sigma, Deutschland
Pertussis Toxin	List Biologicals, USA
Propidiumiodid	Sigma, Deutschland
Tissue-Tek Compound	Sakura, USA
TGF-β	R & D, Deutschland
Trypanblau (0,4%)	Biochrom, Deutschland
Xylazinhydrochlorid 2%	Bayer Health Care, Deutschland

## Material und Methoden

### 3.1.4 Kunststoffartikel und sonstiges Verbrauchsmaterial

24, 48 und 96 Loch Platten, Petrischalen	BD Bioscience, Deutschland
Chirurgiebesteck	Aesculap, Deutschland
Kanülen, Spritzen	Braun, Deutschland
Kryo-Tubes	Nunc, Dänemark
MACS Separationssäulen und Magneten	Miltenyi, Deutschland
Pipetten	Eppendorf, Deutschland
Pipetus	Hirschmann, Deutschland
Vacutainer	BD Bioscience, Deutschland
Zellsieb (70 µm Porengröße)	BD Bioscience, Deutschland

Reaktionsgefäße, Pipettenaufsätze und sonstige Verbrauchsmaterialien stammten von den Firmen Biozym, Eppendorf, Corning und Sarstedt.

### 3.1.5 Geräte

CI-240 Mikrokapnograph	Columbus Instruments, USA
Durchflusszytometer FACS Canto-II	BD Bioscience, Deutschland
Harvard Apparatus Advanced Safety Respirator	Hugo Sachs, Deutschland
Eppendorf Centrifuge 5416 und 5417R	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Inkubatoren, B6, BB16 CU	Heraeus Kendro, Deutschland
Lichtmikroskop	Leica, Deutschland
Magnet für Zellsortierung	Miltenyi, Deutschland
Magnetrührer	Eppendorf, Deutschland
Megafuge 1.OR	Heraeus Kendro, Langenselbold
Neubauerzählkammer	Brand, Deutschland
Sterilbank, Herasafe	Heraeus Kendro, Deutschland
Stickstofftank	Messer, Deutschland
Waage (für Chemikalien)	Mettler, Deutschland
Wasserbad	Medingen, Deutschland
Vortexer	Scientific Industries, UK

### 3.1.6 Zweiphotonenmikroskopie

Ti:Sa Laser Mai Tai HP	Spectra Physics, USA
Scan-Einheit TriMScope	LaVision Biotec, Deutschland
Zweiphotonenmikroskop BX-51WI	Olympus, Deutschland
OPO	APE, Deutschland
Objektivlinse (20°—, NA 0.95)	Olympus, Deutschland

### 3.1.7 Verwendete Software

CellQuest	BD Bioscience, Deutschland
FlowJo	Tree Star, USA
Graphpad Prism 4	Graphpad Software Inc., USA

Inspector	La Vision Biotech, Deutschland
SPSS	SPSS, Deutschland
Volocity	Improvision, Deutschland

### 3.2 Tiermodelle

Die verwendeten Tiere wurden unter speziell pathogenfreien Bedingungen in der zentralen Tierhaltung der Charité Universitätsmedizin Berlin gezüchtet und in speziellen Tierhaltungsräumen (klimatisiert, 12:12-Hell-Dunkel-Rhythmus) unter Standardbedingungen im Tierstall des Neurowissenschaftlichen Forschungszentrums an der Charité Universitätsmedizin Berlin bzw. des Max-Delbrück-Zentrums für Molekulare Medizin in Berlin-Buch gehalten.

#### 3.2.1 Mausstamm C57BL/6

C57BL/6 ist ein in der biomedizinischen Forschung sehr häufig eingesetzter, durch Inzucht erzeugter Mausstamm. Insbesondere für transgene Modifikationen und immunologische Fragestellungen werden diese Tiere gerne verwendet. Der EAE-Verlauf ist in diesem Tierstamm chronisch-progressiv, das Verschwinden von neurologischen Defiziten wird in einem Zeitraum bis 40 Tagen selten beobachtet. Die in den Experimenten verwendeten Tiere wurden über Charles River, Deutschland bezogen.

#### 3.2.2 Mausstamm CD11c-DTR-GFP

Der durch Einbringen eines transgenen Konstrukts generierte CD11c-DTR-GFP-Mausstamm (B6.FVB-Tg(*Itgax*-DTR/EGFP)<sup>57Lan/J</sup>) ermöglicht die selektive und zeitlich frei wählbare Depletion dendritischer Zellen (Jung et al., 2002). Durch die Expression eines Diphtherietoxinrezeptors, unter der Kontrolle des für dendritische Zellen spezifischen CD11c (*Itgax*) Promotor, werden diese Zellen selektiv anfällig für die DTX-vermittelte Zytotoxizität. Alle anderen Zellen können das Toxin wegen der geringen Affinität für den murinen Rezeptor nicht aufnehmen und sind dadurch primär DTX-resistent. Zusätzlich wird in dendritischen Zellen das fluoreszierende Protein GFP (engl.: green fluorescent protein) exprimiert. Während die einmalige DTX-Gabe und damit transiente Depletion dendritischer Zellen zu keinen beobachtbaren Defiziten führt, ist die repetitive DTX-Applikation in diesem Mausstamm aus bisher ungeklärter Ursache letal. Um dennoch eine dauerhafte Depletion dendritischer Zellen während längerer Experimente zu erreichen, ist die Generierung von Knochenmarkchimären notwendig (Zaft et al., 2005).



### 3.2.3 Mausstamm B6.2d2

In diesem transgenen Tierstamm (C57BL/6-Tg(Tcra2D2,Tcrb2D2)1Kuch/J) exprimiert die Mehrheit der CD4<sup>+</sup>-T-Zellen den MOG<sub>35-55</sub>-spezifischen T-Zell-Rezeptor V $\alpha$ 3.2/V $\beta$ 11. Während des ersten Lebensjahres entwickeln > 30% der Tiere eine spontane, isolierte Optikusneuritis ohne klinische oder histologische Hinweise für eine EAE. Durch Immunisierung mit geringen Dosen von MOG kann eine Optikusneuritis ausgelöst werden. Nach einer normalen EAE-Induktion kommt es in diesem Tierstamm zu einem früheren Krankheitsbeginn und schwereren Verlauf als in Wildtyp-Tieren (Bettelli et al., 2003).

### 3.2.4 Mausstamm B6.tdRFP

B6.tdRFP Mäuse exprimieren unter dem ROSA26-Promotor ubiquitär das nicht-toxische Tandem-Dimer „red fluorescent protein“ (tdRFP) (Luche et al., 2007).

### 3.2.5 Mausstamm B6.2d2.tdRFP

Dieser doppelt transgene Mausstamm wurde durch die Verpaarung von B6.2d2-Mäusen mit B6.tdRFP-Mäusen erzeugt. CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus B6.2d2.tdRFP Mäusen tragen folglich nicht nur einen MOG<sub>35-55</sub>-spezifischen T-Zell-Rezeptor, sondern sind auch anhand ihrer tdRFP-Expression *in-vivo* mittels Zweiphotonenmikroskopie und *ex-vivo* mit Hilfe der Durchflusszytometrie detektierbar (Siffrin et al., 2010a).

## 3.3 Zellbiologische Methoden

### 3.3.1 Zellkultur

Zum Ausschluss einer Kontamination wurden alle in Verbindung mit Zellen eingesetzten Materialien sterilisiert. Pinzetten und Scheren wurden vor ihrem Einsatz 5 Minuten abgekocht und danach in 70% Ethanol gelagert. Alle Geräte, Puffer und Medien wurden autoklaviert bzw. steril filtriert. Die Arbeit mit Zellen erfolgte ausschließlich unter einer Sterilbank, die regelmäßig mit 70% Ethanol und durch den Einsatz von UV-Licht desinfiziert wurde. Die Inkubation der Zellen erfolgte standardmäßig in Brutschränken bei einer Temperatur von 37 °C, einer Luftfeuchte von 95% und einer CO<sub>2</sub> Konzentration von 5%.

### 3.3.2 Zellisolation

#### 3.3.2.1 Milz

Für die durchflusszytometrische Phänotypisierung während der EAE und für *in-vitro* Zellkultur-Experimente wurden Splenozyten nach folgendem Protokoll isoliert: Nach zervikaler Dislokation oder intraperitonealer, gewichtsadaptierter Injektion einer letalen Dosis Narkoselösung (0,25 ml 2% Xylazinhydrochlorid, 5 ml Ketamin und 19,75 ml PBS) erfolgte eine Desinfektion der Tiere mittels 70% Ethanol zur Vermeidung mikrobieller Kontamination. Mittels einer medianen Laparotomie wurde das Peritoneum dargestellt und durch einen linken Rippenbogenrandschnitt eröffnet. Die Milz wurde mit einer sterilen Pinzette mobilisiert und in Waschmedium überführt. Alle weiteren Arbeitsschritte erfolgten auf Eis bzw. bei 4° C und unter einer Sterilbank.

Um auch an der extrazellulären Matrix des Milzgewebes haftende Immunzellen herauzulösen, erfolgte ein separater Milzverdau. Dazu wurde jede Milz in einem separaten Röhrchen in 5 ml IMDM Medium aufgenommen. Mit einer Spritze wurden 50 µl Kollagenase (5 mg/50 µl 363 U/mg) in das Milzparenchym injiziert. Es folgte eine Inkubation für 30 min bei 37° C im Wasserbad. Nun wurde das Milzgewebe durch ein Zellsieb (70 µm Porengröße) gedrückt und so vorsichtig mechanisch zerkleinert. Nach Resuspension in 50 ml Waschmedium erfolgte die Zentrifugation mit 550 g bei 4° C für 5 Minuten. Der zellfreie Überstand wurde verworfen. Alle weiteren Waschschrte wurden nach dieser Methode durchgeführt.

Zur Reinigung der Zellsuspension von kontaminierenden Erythrozyten wurde das am Boden des Röhrchens befindliche Pellet mit 10 ml Lysispuffer und 5 ml Waschmedium resuspendiert und sofort abzentrifugiert. Der hyposmolare Puffer führt in Erythrozyten aufgrund ihrer geringen osmotischen Resistenz zu einer Zellyse. Danach erfolgte ein erneuter Waschschrte (s.o.) und die Aufnahme des Pellets in 10 ml Waschmedium.

Zur Zellzahlbestimmung wurden 10 µl der Zellsuspension im Verhältnis 1:10 mit Trypanblau gemischt und in einer Neubauer-Zählkammer unter dem Mikroskop ausgezählt. Apoptotische Zellen können dabei durch Aufnahme des blauen Farbstoffes einfach von vitalen Zellen unterschieden werden. Die absolute Zellzahl wurde dann durch Multiplikation der ausgezählten lebenden Zellen in einem Quadrat (n) mit dem Verdünnungsfaktor (10), dem Volumen (10) und  $10^4$  errechnet werden (Gesamtzellzahl

=  $n \times 10 \times 10 \times 10^4$ ). Es erfolgte ein erneuter Waschschrift nach oben genanntem Schema.

### **3.3.2.2 Lymphknoten**

Sowohl die von den Extremitäten drainierenden inguinalen und axillären Lymphknoten als auch die paraaortalen und tiefen zervikalen Lymphknoten wurden präpariert und entnommen. Auf eine Erythrozytenlyse wurde verzichtet, das weitere Procedere war analog zur Aufarbeitung der Milzzellen.

### **3.3.2.3 ZNS**

Vor der Isolation der im ZNS lokalisierten Leukozyten ist eine ausreichende Reinigung des zerebralen Gefäßbettes von Blutbestandteilen nötig. Dazu wurden die mit einer letalen Dosis Ketamin/Xylazinhydrochlorid anästhesierten Tieren zunächst median laparotomiert. Von abdominal wurde nun der Thorax eröffnet und nach Mobilisierung von Sternum und linkem Rippenbogen das Herz dargestellt. In den linken Ventrikel wurde eine Kanüle eingeführt und mittels Präparierklemme fixiert. Um ein Abfließen des Blutes zu ermöglichen wurde der rechte Vorhof mit einer Schere inzidiert. Nun erfolgte durch die liegende Kanüle die vorsichtige transkardiale Perfusion über ca. 15 Minuten mit 30 ml gekühltem PBS.

Nach Eröffnung von Schädel und Wirbelsäule wurden Gehirn und Rückenmark aus ihren knöchernen Schutzhüllen herausgelöst und in einer Petrischale mit einem Skalpell zerkleinert. Das fragmentierte ZNS-Parenchym wurde dann in 5 ml IMDM überführt und zum enzymatischen Verdau 10 mg/ml Kollagenase/Clostridiopeptidase und 200 U/ml DNase zugesetzt. Nach 30-minütiger Inkubation bei 37° C unter kontinuierlicher Rotation wurde das ZNS-Gewebe unter einer Sterilbank durch ein Zellsieb (70 µm Porengröße) gegeben. Die Zellsuspension wurde gewaschen und das Pellet in 5 ml 40% Percoll resuspendiert. Durch vorsichtiges Überschichten der in einem Zentrifugenröhrchen vorgelegten 5 ml 70% Percoll wurde die Zellsuspension so aufgebracht, dass die Trennung in zwei Phasen erhalten blieb. Nun erfolgte eine Zentrifugation mit 916 g (= 2300 rpm) für 25 Minuten ohne Bremse, wonach sofort die Interphase abpipettiert und gewaschen wurde. Nach Auszählung der Zellen wurden sie auf eine Konzentration von  $2 \times 10^6$  Zellen pro ml Zellkulturmedium eingestellt.

### **3.3.3 Magnetische Zellsortierung**

Mithilfe des MACS-Zellsortierungssystems (engl.: magnetic associated cell sorting) von Miltenyi Biotec können vitale Zellpopulationen anhand ihrer Expression von Oberflächenmolekülen aufgereinigt werden. Das Prinzip basiert auf der biotechnologischen Koppelung von monoklonalen Antikörpern an magnetische Mikropartikel. Nach Bindung der Antikörper an ihr Zielantigen auf der Zelloberfläche wird die Suspension durch eine von einem Magnet ummantelte Säule gespült. Nur die antikörperbindenden und somit magnetisierten Zellen werden bei der Passage durch die Säule zurückgehalten, alle anderen Zellen bleiben unbeeinflusst. Durch Entfernung der Säule aus dem Magnetfeld können nun auch die Zellen, die Antikörper gebunden haben, isoliert werden.

In der hier vorgelegten Arbeit wurde die negative Selektion CD90<sup>+</sup> Zellen zur Anreicherung von Antigen-präsentierenden Zellen für Zellkultur-Experimente und zur Depletion von T-Zellen in Knochenmarktransplantaten verwendet. Naive CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurden mittels zweimaliger positiver Selektion aus Splenozyten gewonnen. Zunächst wurden dabei CD4<sup>+</sup> Zellen angereichert, diese wurden dann nochmals anhand ihrer Expression von CD62L aufgereinigt, sodass man am Ende naive CD4<sup>+</sup> CD62L<sup>+</sup> Zellen für weitere Experimente zur Verfügung hatte. Der Reinheitsgrad der Zellsortierung wurde durchflusszytometrisch kontrolliert.

## **3.4 Durchflusszytometrie**

### **3.4.1 Prinzip der Durchflusszytometrie**

Die Durchflusszytometrie ermöglicht die simultane Messung mehrerer physikalischer Parameter auf Einzelzellebene. Dazu werden die Zellen einer Suspension durch laminare Strömung in einer Kapillare hydrodynamisch vereinzelt, um dann in der Messkammer getrennt einen Laserstrahl zu passieren. Das dort auf die Zellen treffende Licht wird entweder gestreut oder absorbiert. Anhand der Vorwärtsstreuung (FSC = engl.: forward scatter) lassen sich Aussagen über die Zellgröße, anhand der Seitwärtsstreuung (SSC = engl.: sideways scatter) über die Granularität der Zellen machen. Absorbiertes Licht einer bestimmten Wellenlänge kann als Fluoreszenz wieder emittiert werden, wenn die Zelle fluoreszierende Proteine exprimiert oder zuvor mit Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern markiert wurde. Diese Fluoreszenzsignale werden dann mit Hilfe von Filtern abhängig von ihrer Wellenlänge aufgetrennt, durch

sog. Photoelektronenvervielfacher verstärkt und detektiert und abschließend in ein elektrisches Signal umgewandelt. Nach Digitalisierung dieser Signale ist computer-gestützt eine graphische Darstellung und statistische Analyse möglich. Durch Einsatz von Fluorochromen mit unterschiedlichen Emissionsspektren, verschiedener Laser zur Fluoreszenzanregung und komplexer Filter- und Detektionssysteme ist die simultane multi-parametrische Analyse von Zellen möglich.

In Einzelzellsuspensionen können so durch die gleichzeitige Bindung mehrerer monoklonaler, Fluorochrom-gekoppelter Antikörper an Oberflächenmoleküle oder intrazelluläre Proteine, verschiedene Zellpopulationen unterschieden werden. Dabei ist die Stärke des Fluoreszenzsignales proportional zu der Menge des gebundenen Antikörpers und erlaubt so eine relative Quantifizierung der Proteinexpression.

### **3.4.2 Fluoreszenzfärbung von Oberflächenmolekülen**

Nach Herstellung von Einzelzellsuspensionen aus Milz und Lymphknoten bzw. ZNS-Immuzellisolierung wurden je  $2 \times 10^6$  Zellen, gelöst in FACS-Puffer in ein 2 ml Reaktionsgefäß eingesetzt. Einem erneuten Waschschrift folgte die Inkubation mit 0,75 µg/ml  $\alpha$ -murin- $F_c$ -Fragment für 10 Minuten bei 4° C. Dies dient der Absättigung membranständiger  $F_c$ -Rezeptoren und damit der Reduktion unspezifischer Antikörperbindung. Nun wurden die Primärantikörper in den oben genannten Konzentrationen dazu pipettiert und für 10 Minuten bei 4° C in einem Gesamtvolumen von 100 µl inkubiert. Dann wurden die Zellen erneut mit FACS-Puffer gewaschen. Bei Verwendung Biotin-gekoppelter Primärantikörper erfolgte in einem zweiten Färbeschrift die Inkubation mit einem Streptavidin-gekoppelten, Fluorochrom-markierten Sekundärantikörper. Dies führt zu einer spezifischen, nicht kovalenten Bindung von Biotin und Streptavidin (SA) und somit zu einer Fluoreszenzmarkierung der Zelle. Nach einem abschließendem Waschschrift wurden die Zellen in 200 µl FACS-Puffer aufgenommen.

### **3.4.3 Fluoreszenzfärbung intrazellulärer Moleküle**

Mittels spezifischer Fluoreszenzmarkierung intrazellulärer Moleküle können Zytokine oder Transkriptionsfaktoren auf Einzelzellebene nachgewiesen und die Zelle damit einer bestimmten funktionellen Zellpopulation zugeordnet werden. Um ein zufriedenstellendes Färbeergebnis zu erhalten ist eine vorherige Stimulation der Zytokinproduktion in T-Zellen notwendig. Dafür wurden die Zellen 4 Stunden in mit anti-CD3- (3 µg/ml) und anti-CD28-Antikörpern (2,5 µg/ml) beschichteten Zellkulturplatten

inkubiert. Diese Liganden stimulieren den T-Zell-Rezeptor (CD3) und den kostimulatorischen Rezeptor CD28, was zu einer Antigen-unspezifischen Erhöhung der bestehenden Zytokinproduktion führt. 2 Stunden später wird, um eine intrazelluläre Zytokinakkumulation zu erreichen, die Exozytose durch Zugabe von Brefeldin A (5 µg/ml) gehemmt.

Nach dem Färben der Oberflächenmoleküle ist eine Fixation und Permeabilisierung erforderlich, um ein Eindringen der Antikörper in das Zytosol zu ermöglichen. Dazu werden die Zellen in PBS gewaschen und für 20 Minuten in 1 ml 2% PFA fixiert. PFA führt durch die Vernetzung von Proteinen zu einer Konservierung der Zellstruktur, die eine nachfolgende Permeabilisierung der Zellmembran erlaubt. Diese wird durch Waschen der Zellen in 0,5% Saponinpuffer bewirkt. Alle folgenden Arbeitsschritte der Intrazellulärfärbung erfolgten analog zur Oberflächenfärbung, jedoch nicht in FACS-Puffer, sondern in 0,5% Saponinpuffer. Eine Verwendung von Biotin-gekoppelten Antikörpern ist aufgrund des endogenen, zytosolischen Vorkommens des Vitamins hier nicht möglich. Zum Ausschluss einer artifiziellen Veränderung der Zytokinproduktion durch die anti-CD3/CD28-Stimulation wurden stets unstimulierte Proben mitgefärbt. Ebenso wurden zur Detektion unspezifischer Bindung Isotypenkontrollen der verwendeten Antikörper mitgeführt.

### **3.4.4 CFSE-Färbung und Proliferationsexperimente**

Mittels Carboxyfluoreszeindiazetatsuccinimidylester-Färbung (CFSE) kann die Proliferation von Lymphozyten *in-vivo* und *in-vitro* untersucht werden. CFSE ist ein fluoreszierender Farbstoff, der in lebende Zellen eindringen kann und dort dauerhaft, kovalent an zytosolische Moleküle bindet. Bei jeder folgenden Zellteilung werden die CFSE-Moleküle dann gleichwertig auf die beiden entstehenden Tochterzellen verteilt. Eine hohe Proliferationsrate führt somit zu einer Abnahme der CFSE-Fluoreszenz, was mittels durchflusszytometrischer Analyse quantifiziert werden kann (Quah et al., 2007).

Für die *in-vivo* Proliferationsexperimente wurden CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus 2d2 Splenozyten mittels MACS-Technologie aufgereinigt, mit RPMI und 1% HEPES gewaschen und mit 2,5 µM CFSE für 10 Minuten inkubiert. Danach wurden die Zellen gewaschen und in Kulturmedium aufgenommen. Anschließend erfolgte der intravenöse Transfer von 5 x 10<sup>6</sup> dieser Zellen in CD11c-DTR-Tiere und eine standardmäßige intraperitoneale Gabe von DTX bzw. PBS (s. u.). Am nächsten Tag wurden die Tiere nach dem

Standardprotokoll zur Induktion der aktiven EAE immunisiert (s.u.). Drei Tage darauf wurde die Proliferationsrate der transferierten CFSE-gefärbten Zellen in Milz und Lymphknoten durchflusszytometrisch bestimmt.

### 3.4.5 Propidiumiodid-Färbung

Um bei der durchflusszytometrischen Analyse apoptotische Zellen ausschließen zu können wurde stets unmittelbar vor der Messung 1 µl Propidiumiodid (1,0 mg/ml) zu den gefärbten Zellen gegeben. Dieser fluoreszierende Farbstoff kann nur in geschädigte Zellen, deren Membranfunktion beeinträchtigt ist, eindringen und interkaliert dort in die DNS des Zellkerns.

## 3.5 Generierung von Knochenmarkchimären

Aus bisher ungeklärter Ursache ist eine repetitive DTX-Gabe in CD11c-DTR-Mäusen letal (Jung et al., 2002). Dies kann durch die Generierung von Knochenmarkchimären aus letal bestrahlten C57BL/6 Wildtyp-Tieren, die man mit Knochenmarkszellen von CD11c-DTR-Mäusen rekonstituiert, vermieden werden. Es ist bekannt, dass in diesen Knochenmarkchimären eine langfristige und zuverlässige Depletion aller konventionellen dendritischen Zellen durch regelmäßige DTX-Gabe ohne unerwünschte Begleiteffekte möglich ist (Zaft et al., 2005).

Hierzu wurden die Knochenmarks-Rezipienten mit einer kumulativen Dosis von 1,100 cGy, verteilt auf zwei Einzeldosen, bestrahlt. Diese *Konditionierung* führt zu einer nahezu kompletten Zerstörung des hämatopoetischen Systems der Empfänger-Tiere. Die Knochenmarks-Donoren wurden durch zervikale Dislokation getötet und mit 70% Ethanol desinfiziert. Nach Präparation von Femur und Tibia wurden diese unter einer Sterilbank an den Epiphysen eröffnet und das Knochenmark durch intensives Spülen mit PBS herausgelöst. Um das Auftreten einer möglichen Transplantat-Wirt-Reaktion (engl.: graft-versus-host disease) zu vermeiden, wurden T-Zellen und ihre frühen Vorläuferzellen durch die Depletion CD90-positiver Zellen mittels MACS-Technologie entfernt.

8 Stunden nach der Bestrahlung wurden den Rezipienten  $12 - 20 \times 10^6$  Spender-Knochenmarkszellen in die Schwanzvene injiziert (Siffrin et al., 2010a). Da in der ersten Zeit nach Stammzelltransplantation von einer Immunkompromittierung auszugehen ist, erfolgte eine antibiotische Prophylaxe mit 0.01% Enrofloxacin im Trinkwasser für 4 Wochen. Als Kontrolltiere wurden auch C57BL/6→C57BL/6

Knochenmarkchimären generiert. Alle Tiere wurden frühestens 8 Wochen nach erfolgter Transplantation für Experimente eingesetzt.

Die Effizienz der Transplantation wurde mittels Bestimmung von CD11c-GFP positiven Zellen vs. Markierung von CD11c mit einem Fluoreszenz-gekoppelten monoklonalen Antikörper nach Beendigung des Experiments durchflusszytometrisch dokumentiert und lag in der Regel bei > 90 – 95%.

### **3.6 Depletion dendritischer Zellen in CD11c-DTR→C57BL/6**

#### **Knochenmarkchimären**

Um den Effekt der Abwesenheit dendritischer Zellen auf den Verlauf der EAE zu untersuchen, ist eine dauerhafte Depletion über mehrere Wochen und damit eine repetitive DTX-Gabe erforderlich. Dazu erhielten die Knochenmarkchimären alle 48 Stunden eine intraperitoneale Injektion von 8 – 12 ng DTX/g Körpergewicht, gelöst in 200 µl PBS. Die Effektivität der Auslöschung dendritischer Zellen wurde mit Hilfe der durchflusszytometrischen Analyse von Einzelzellsuspensionen aus Lymphknoten, Milz und ZNS zu unterschiedlichen Zeitpunkten überprüft und für jede Charge von DTX bestimmt.

### **3.7 Das Tiermodell der EAE**

Die EAE kann durch aktive Immunisierung mit Bestandteilen der Myelinscheiden in Gegenwart von Adjuvanzen oder den Transfer enzephalitogener CD4+ Th-Zellen in naiven Mäusen induziert werden. Klinisch zeigt sich dabei eine aufsteigende Lähmung, die häufig mit einer Parese der Schwanzmuskulatur beginnt und bis zur kompletten Tetraplegie fortschreiten kann. Als histo-pathologisches Korrelat findet sich eine disseminierte, perivaskuläre, entzündliche Infiltration des ZNS mit fokalen Demyelinisierungen, reaktiven Gliosen und axonalen Schäden (Gold et al., 2006). Während der EAE wurden die Tiere jeden Tag auf neurologische Ausfälle untersucht und diese entsprechend dem folgenden klinischen Index beurteilt:

- 0 keine beobachtbaren Zeichen der EAE
- 0,5 Schwäche der Schwanzmuskulatur
- 1 Lähmung der Schwanzmuskulatur
- 2 Hinterbeine sind in ihrer Funktion stark eingeschränkt (Paraparese)
- 3 Hinterbeine sind vollständig gelähmt (Paraplegie)
- 4 vollständige Lähmung von Vorder- und Hinterbeinen (Tetraplegie)



- 5 Maus ist moribund; bei spontanem Versterben der Mäuse während der EAE wurden diese mit dem klinischen Index 5 weitergeführt

Atypische EAE-Verläufe wurden nach dem folgenden klinischen Index bewertet (Siffrin et al., 2010a):

- 0 keine beobachtbaren Zeichen der EAE
- 1 deutliche Kyphosierung der Wirbelsäule, Schwäche der Schwanzmuskulatur, unsicherer Gang
- 2 Gang- und Standataxie, schiefe Kopfhaltung, Überempfindlichkeit
- 3 schwere Gang- und Standataxie, Spastik, schwere propriozeptive Defekte
- 4 Maus ist moribund; bei spontanem Versterben der Mäuse während der EAE wurden diese mit dem klinischen Index 5 weitergeführt

### 3.7.1 Aktive EAE

Die zur aktiven Immunisierung eingesetzten Autoantigene können durch Aufreinigung aus ZNS-Gewebe oder künstliche Synthese des immundominanten Abschnitts von Myelinproteinen gewonnen werden. Das hier eingesetzte Peptid 35-55 des Myelin Oligodendrozyten Glykoprotein (MOG) findet sich an der Oberfläche der Myelinscheiden und macht ungefähr 0,5% aller Myelinproteine aus. Bei C57BL/6-Mäusen verfügt es über eine sehr hohe Enzephalitogenität. Zusammen mit der unspezifischen Aktivierung des angeborenen Immunsystems durch die gleichzeitige Applikation von Adjuvantien kommt es so zur Differenzierung Myelin-spezifischer T-Effektorzellen (Gold et al., 2006).

Den CD11c-DTR→C57BL/6 Knochenmarkchimären wurde insgesamt 150 µg MOG<sub>35-55</sub> emulgiert in komplettem Freund's Adjuvanz (CFA) injiziert. Dabei wurden je 50 µl Immunisat im dorsalen Bereich der vorderen und hinteren Extremität beidseits subkutan appliziert (200 µl Gesamtmenge, zu gleichen Anteilen CFA und PBS). 4 Stunden nach Immunisierung und erneut nach 48 Stunden wurde den Mäusen 200 ng Pertussistoxin gelöst in 200 µl PBS intraperitoneal injiziert. Dieses bakterielle Toxin wirkt als additiver Adjuvanz-Stimulus.

### 3.7.2 Transfer-/passive EAE

Die passive EAE wurde durch Transfer *in-vitro* generierter MOG<sub>35-55</sub>-spezifischer Th17-Zellen in CD11c-DTR→C57BL/6 Knochenmarkchimären induziert. Dazu mussten zunächst MOG<sub>35-55</sub>-spezifische, naive CD4+ T-Zellen isoliert werden. Dies erfolgte

durch magnetische Zellsortierung von CD4<sup>+</sup> CD62L<sup>+</sup> T-Zellen aus der Milz von B6.2d2.tdRFP-Tieren. Die Gewinnung Antigen-präsentierender Zellen erfolgte durch CD90-Depletion naiver Splenozyten von C57BL/6 Tieren mittels MACS-Technologie. Um ein unkontrolliertes Wachstum dieser Zellen in Kultur zu vermeiden erfolgte ein Bestrahlung mit 30 Gy.

Nun wurden die naiven CD4<sup>+</sup> 2d2.tdRFP T-Zellen mit den bestrahlten Antigen-präsentierenden Zellen in einem zahlenmäßigen Verhältnis von 1:5 inkubiert und mit 12,5 µg/ml MOG<sub>35-55</sub> stimuliert. Zur Differenzierung des Th17-Phänotyps wurden TGF-β (3 ng/ml), IL-6 (20 ng/ml) und IL-23 (20 ng/ml) zugesetzt. Die Zellen wurden jede Woche mit syngenem Antigen-präsentierenden Zellen und MOG<sub>35-55</sub> restimuliert, dabei wurde die Zytokinproduktion regelmäßig durchflusszytometrisch bestimmt. Drei Tage nach der zweiten Restimulation wurden je  $5 \times 10^6$  2d2.tdRFP Th17-Zellen intravenös in CD11c-DTR→C57BL/6-Knochenmarkchimären injiziert (Siffrin et al., 2010a).

### **3.8 Histologie**

#### **3.8.1 Gewebefixierung**

Zur Strukturhaltung des Gewebes und um Autolyse und mikrobielle Kontamination zu verhindern wurden die mit einer letalen Dosis der Narkoselösung (Xylazin/Ketamin) anästhesierten Tiere transkardial mit 4% PFA perfundiert. Präparation und Kanülierung des Herzens erfolgten dabei wie oben für die Durchflusszytometrie beschrieben. Dann wurde zunächst mit 20 ml PBS und danach mit 40 ml 4% PFA über die im linken Ventrikel liegende Kanüle ca. 15 Minuten lang perfundiert. Gehirn und Rückenmark wurden wie bereits beschrieben präpariert und über Nacht in 4% PFA fixiert. Anschließend wurde durch je 24-stündige Lagerung des Gewebes in einer aufsteigenden Succrose-Reihe (Succrose-Konzentration 10%, 20%, 30%) eine schonende Dehydratation erreicht. Hierauf wurde das Gewebe in Tissue Tek® (Sakura Finetek, USA) eingebettet und schockgefroren. Das so präparierte Gehirn und Rückenmark wurde in einem Kryostat bei -24° C 10 µm dick geschnitten, auf Objektträger aufgezogen und 1 Stunde luftgetrocknet. Die Lagerung erfolgte bei - 80° C.

#### **3.8.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung**

Die Hämatoxylin-Eosin-(HE)-Färbung ist die histo-pathologische Standardfärbung zur feingeweblichen Untersuchung und erlaubt einen guten Überblick über die

Gewebsmorphologie. Bei der EAE wird sie routinemäßig zur Darstellung monozytärer Infiltrate eingesetzt. Die gefrorenen Objektträger wurden 1 Stunde bei Raumtemperatur aufgetaut, dann in PBS rehydriert und 10 Minuten in Hämalaun gefärbt. Anschließend erfolgte das „Bläuen“ der Schnitte durch Spülen mit Leitungswasser für 15 Minuten, gefolgt von einer 5-minütigen Färbung mit Eosin. Nun wurden die Schnitte durch eine aufsteigende Alkoholreihe (70%, 96%, 100%) entwässert und 15 Minuten in Xylol geklärt.

### **3.8.3 Luxol-Fast-Blue-Färbung**

Mithilfe der Luxol-Fast-Blue-(LFB)-Färbung kann die bei der EAE auftretende Demyelinisierung sichtbar gemacht werden. Dazu wurden die bei - 80° C gelagerten Objektträger zunächst aufgetaut und für 5 Minuten in 96% Ethanol gewaschen. Dann wurden die Schnitte 3 Stunden bei ca. 60° C in einer LFB-Färbelösung (0,1 g LFB gelöst in 100 ml 96% Ethanol und 0,5 ml 10% Essigsäure) inkubiert. Danach wurden die Präparate in 0,05%  $\text{Li}_2\text{CO}_3$ -Lösung für 1 Minute nachfixiert und erneut mit 70% Ethanol gewaschen. Abschließend erfolgte eine Gegenfärbung mit Harris Hämatoxylin für 1 – 2 Minuten und die Entwässerung und Eindeckelung analog zur HE-Färbung.

## **3.9 Intravitale Zwei-Photonen-Mikroskopie**

Bei der 2-Photonen-Mikroskopie werden Fluorochrome durch die nahezu gleichzeitige Absorption von zwei Photonen, die die Energie jeweils der Hälfte der für das Fluorochrom notwendigen Energie haben, angeregt. Dieser Effekt wurde von Maria Göppert-Mayer 1931 beschrieben und kann seit den 90er Jahren des 20. Jahrhunderts für die fluoreszenzbasierte Mikroskopie mittels femto-Sekunden gepulster Laser genutzt werden. Dies ermöglicht die hoch-auflösende Darstellung fluoreszierender Zellen in der Tiefe von intaktem, vitalem Gewebe bei lediglich geringer Phototoxizität. Diese Technologie kann in Kombination mit transgenen Tieren für die Aufklärung einer Vielzahl sehr unterschiedlicher Phänomene eingesetzt werden, was zu ihrer raschen Verbreitung in der biomedizinischen Forschung geführt hat (Helmchen und Denk, 2002).

Kurz nach Auftreten der ersten klinischen Symptome (ca. Tag 20 nach Transfer der 2d2.tdRFP Th17-Zellen) wurden die CD11c-DTR→C57BL/6 Knochenmarkchimären für die Zweiphotonenmikroskopie vorbereitet. Dazu erfolgte zunächst die Anästhesierung über eine Maske mit 1,5% Isofluran in Sauerstoff und Distickstoffmonoxid („Lachgas“)

im Verhältnis 2:1. Dann wurden die Tiere tracheotomiert und unter kontinuierlicher Überwachung der expiratorischen CO<sub>2</sub>-Konzentration maschinell beatmet. Die Körpertemperatur wurde während des gesamten Experimentes konstant zwischen 35 – 37° C gehalten. Für den Zugang zum Hirnstamm wurde die Muskulatur im Nackenbereich entfernt und die Dura mater zwischen erstem Halswirbel und okzipitalen Schädelknochen vorsichtig abpräpariert. Der so freigelegte Hirnstamm wurde mit isotonischer Ringer-Lösung überspült und mit einem sterilen Agarose-patch (0.5% in 0.9% NaCl) bedeckt um Artefakte durch Atmung oder Herzschlag zu reduzieren.

Für die Zwei-Photonen-Anregung im Infrarot-nahen Bereich bei 850 nm wurde ein automatisch gesteuerter Ti:Sa Laser, der über Richt-Spiegel an eine Scan-Einheit gekoppelt ist, eingesetzt. Der Laserstrahl wird durch einen 10:90 Strahlensplitter aufgeteilt und 10% der Ti:Sa-Laserenergie werden durch die Scan-Linsen-Einheit direkt an das Mikroskop weitergeleitet. Zur Generierung einer zweiten Anregungswellenlänge wurden die verbleibenden 90% der Laserenergie in einen optischen parametrischen Oszillator (OPO) gespeist. Die dadurch erzeugte OPO-Wellenlänge betrug 1,110 nm. Der OPO-Strahl passierte zunächst ein System spektraler Filter zur Entfernung von niedrigwelligerer Infrarotstrahlung und dann einen überwachten Abschwächungsregler bevor er in die Scan-Einheit eintritt und den Ti:Sa-Strahl überlappt. Diese überlappenden Strahlen werden nun durch einen dichromatischen Spiegel geleitet und treten dann durch die Scan-Linsen-Kombination in das aufrechte Mikroskop über eine Objektivlinse (20°—, NA 0.95, Olympus, Deutschland), die die Anregungsstrahlengänge auf das Präparat fixiert. Der Scanprozess wird mittels eines kommerziell erhältlichen Scansystems durchgeführt (Trimscope®, LaVision Biotec, Deutschland). XYZ-Folgeaufnahmen wurden innerhalb eines Scan-Feldes von 300 x 300 µm bei 512 x 512 Pixel Auflösung und einem Z-Ebenen Abstand von 2 µm bei einer Frequenz von 400 oder 800 Hz aufgenommen. Die angewendeten Laserstärken betragen auf der Oberfläche des Gewebes zwischen 2 – 6 mW, wodurch eine Abbildung des Fluorochromes GFP in einer Gewebetiefe von bis zu 150 µm ermöglicht wurde. Die Auswertung der Daten erfolgte mit der kommerziell erhältlichen Software Volocity® (Improvision, Deutschland).

## 4 Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit war es, die Funktion dendritischer Zellen während sich entfaltender und manifester autoimmuner Neuroinflammation *in-vivo* besser zu verstehen. Dazu wurde der Verlauf der aktiven und Transfer-EAE in Gegenwart und Abwesenheit dendritischer Zellen in CD11c-DTR→C57BL/6 Knochenmarkchimären untersucht.

### 4.1 Erfolgreiche Depletion dendritischer Zellen in CD11c-DTR→C57BL/6 Knochenmarkchimären

Die transgene CD11c-DTR-Maus erlaubt die zeitlich frei wählbare Auslöschung dendritischer Zellen durch Injektion von DTX (Jung et al., 2002). Dies gelingt durch Ausnutzung der weitgehenden natürlichen Resistenz muriner Zellen gegenüber dem von *Corynebacterium diphtheriae* produzierten, streng intrazellulär aktiven Toxin. Unter der Kontrolle des für dendritische Zellen spezifischen CD11c (*Itgax*) Promotors wird in diesem Mausstamm ein Fusionsprotein, bestehend aus einem von Primaten stammenden Diphtherietoxinrezeptor (engl.: heparin binding EGF-like growth factor) und dem fluoreszierenden Protein GFP, exprimiert. Die Injektion von DTX führt zu einer selektiven Toxinaufnahme in dendritische Zellen und in der Folge zu einer irreversiblen ADP-Ribosylierung des Elongation-Faktors 2. Dies hemmt die Proteinbiosynthese und induziert den apoptotischen Zelltod. Der CD11c (*Itgax*) Promotor ist bereits wiederholt zur gezielten transgenen Manipulation dendritischer Zellen eingesetzt worden (Bar-On und Jung, 2010). Trotz seiner relativen Spezifität für dendritische Zellen findet sich bei der CD11c-DTR-GFP Maus auch eine Promotor-Aktivität des *Itgax*-Gens in bestimmten Makrophagentypen der Milz und der Alveolen, in einem Subtyp aktivierter T-Zellen und bei Plasmablasten (Bar-On und Jung, 2010). Der CD11c-DTR-GFP Mausstamm wurde in der Vergangenheit schon erfolgreich zur Aufklärung der Funktion dendritischer Zellen bei zahlreichen viralen und bakteriellen Infektionen, Asthma oder Tumorummunität verwendet (Sapozhnikov und Jung, 2008).

Die wiederholte DTX-Gabe in CD11c-DTR-Mäusen geht aus noch ungeklärter Ursache mit einer hohen Letalität einher. Um dennoch eine Depletion dendritischer Zellen über den gesamten EAE-Verlauf hinweg zu erreichen war es notwendig, CD11c-DTR→C57BL/6 Knochenmarkchimären zu generieren. Dazu wurden letal bestrahlte C57BL/6 Wildtyp-Mäuse mit aus CD11c-DTR Mäusen isolierten Knochenmarkzellen rekonstituiert. Diese hämatopoetische Stammzelltransplantation ermöglicht eine

## Ergebnisse

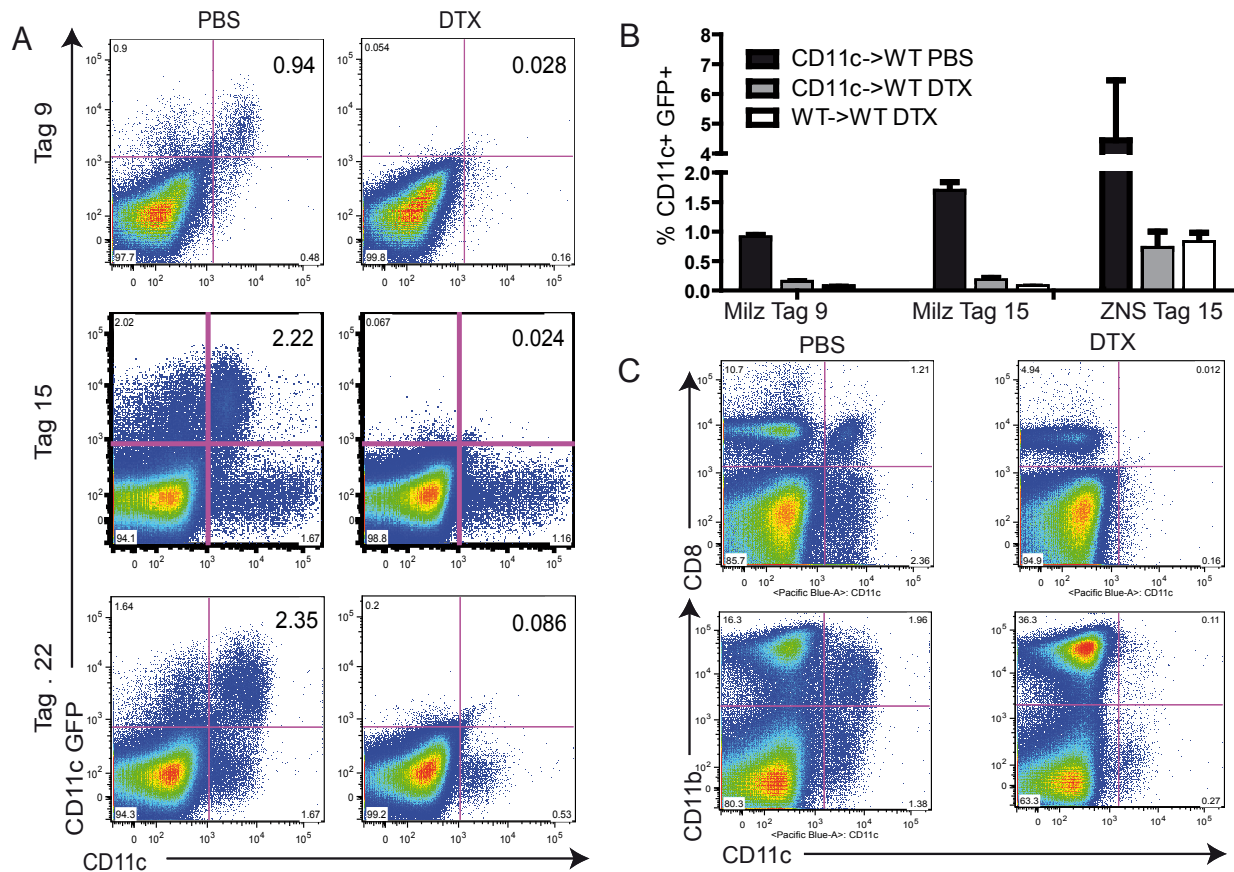
dauerhafte Auslöschung dendritischer Zellen durch repetitive DTX-Gabe, ohne dass es dabei zu unerwünschten Begleiteffekten kommt (Zaif et al., 2005).

Da sich in initialen Etablierungsexperimenten in C57BL/6→CD11c-DTR Knochenmarkchimären ebenfalls eine hohe Sterblichkeit nach mehrmaliger DTX-Applikation beobachten ließ, ist möglicherweise die ektope CD11c-DTR-Expression durch nicht blut-bildende Zellen für die DTX-vermittelte Letalität verantwortlich.

Eine Injektion von 8 – 12 ng DTX/g Körpergewicht alle 48 Stunden erwies sich in Etablierungsexperimenten als am günstigsten in Bezug auf die Zuverlässigkeit der Auslöschung dendritischer Zellen. Die effektive Dosis DTX variierte zwischen verschiedenen Chargen und wurde nach geringsteffektiver Dosis titriert. Bei allen durchflusszytometrischen Analysen wurde stets die Qualität der Depletion dendritischer Zellen durch Messung der Expression von GFP und CD11c überprüft. Abb. 3 A zeigt die nahezu vollständige Abnahme dendritischer Zellen in der Milz DTX-behandelter Tiere im Vergleich zur PBS-behandelten Kontrollgruppe während einer aktiven EAE an den Tagen 9, 15 und 22. Da DTX in der Lage ist, auch die intakte Blut-Hirn-Schranke zu überqueren (Buch et al., 2005), konnte auch im ZNS eine erfolgreiche Reduktion dendritischer Zellen erreicht werden. Diese war im ZNS durch erhöhtes Hintergrundrauschen nur scheinbar nicht so effektiv wie in der Milz, was die GFP-Analyse von C57BL/6→C57BL/6 Kontrollen zeigt (Abb. 3 B).

Zur Charakterisierung des Effektes von DTX auf die verschiedenen Subpopulationen dendritischer Zellen erfolgte eine Analyse der Expression von CD11c, CD11b und CD8 in Splenozyten. Dabei zeigte sich, dass die CD11c<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> und die CD11c<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> dendritischen Zellen gleichermaßen erfolgreich durch DTX-Gabe ausgelöscht werden (Abb. 3 C). In diesem transgenen Mausmodell gelingt vor allem die effektive Auslöschung konventioneller dendritischer Zellen mit hoher CD11c-Expression, während plasmazytoide dendritische Zellen weitgehend unbeeinflusst bleiben (Sapoznikov et al., 2007).

## Ergebnisse



### Abbildung 3: Erfolgreiche DTX-vermittelte Depletion dendritischer Zellen in CD11c-DTR→C57BL/6 Knochenmarkchimären

(A) Repräsentative durchflusszytometrische Analysen der Expression von CD11c und GFP in der Milz von DTX- und PBS-behandelten CD11c-DTR→C57BL/6 Knochenmarkchimären zu unterschiedlichen Zeitpunkten während aktiver EAE. (B) DTX-vermittelte Depletion CD11c<sup>+</sup> GFP<sup>+</sup> dendritischer Zellen in Milz und ZNS von CD11c-DTR→C57BL/6 (CD11c→wt) und C57BL/6→C57BL/6 (wt→wt) Knochenmarkchimären. Die Daten stammen aus 2 unabhängigen Experimenten. Teil (C) zeigt die Auslöschung CD11c<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> und CD11c<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> dendritischer Zellen in der Milz nach DTX-Gabe.

## 4.2 Aktive EAE in der Abwesenheit dendritischer Zellen

### 4.2.1 Schwerer klinischer Verlauf der aktiven EAE nach Depletion dendritischer Zellen

Um die pathophysiologische Rolle dendritischer Zellen während autoimmuner Neuroinflammation *in-vivo* besser zu verstehen, schien es sinnvoll, zunächst den EAE-Verlauf parallel in Gegenwart und Abwesenheit dendritischer Zellen zu untersuchen. Dazu erfolgte 8 Wochen nach Knochenmark-Transfer eine randomisierte Verteilung der CD11c-DTR→C57BL/6 Tiere in eine DTX- und eine Kontrollgruppe. Je nach Gruppe wurde den Versuchstieren entweder DTX oder in der Kontrollgruppe PBS

## Ergebnisse

intraperitoneal injiziert. Diese Behandlung wurde 24 Stunden vor der aktiven Immunisierung begonnen und für die restliche Dauer des Experiments alle 48 Stunden wiederholt.

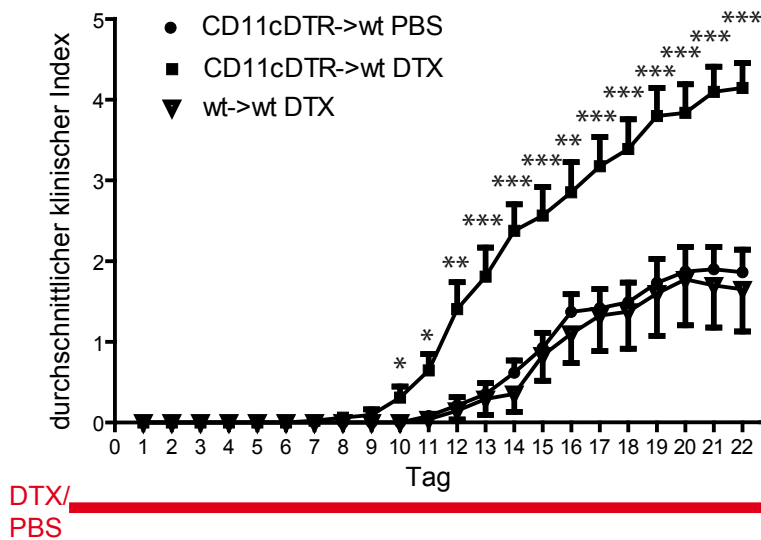
Das Mitführen einer DTX-behandelten Kontrollgruppe aus C57BL/6→C57BL/6 Knochenmarkchimären diente dem Ausschluss von Artefakten durch die Toxin-Applikation oder das Chimärenmodell. Zusätzlich wurde in einem Experiment mit dem Modellantigen Ovalbumin (OVA) immunisiert, um mögliche antigenunspezifische Effekte bzw. Alterationen der Blut-Hirn-Schranke zu detektieren.

Die DTX-behandelten CD11c-DTR→C57BL/6 Knochenmarkchimären zeigten eine frühere klinische Manifestation (Tag  $12,88 \pm 0,46$  vs.  $13,96 \pm 0,32$  nach Immunisierung) und eine deutlich aggressivere, schneller voranschreitende Verlaufsform der EAE (Abb. 4). Dies verdeutlichen der über die gesamten EAE gemittelte (DTX  $1,85 \pm 0,18$  vs. PBS  $0,68 \pm 0,11$ ) und der durchschnittliche maximale klinische Index (DTX  $4,41 \pm 0,2$  vs. PBS  $2,26 \pm 0,26$ ) als Indikatoren für die Schwere der Erkrankung. Zusätzlich kam es zu letalen Krankheitsverläufen, während in den Kontrollgruppen kein spontanes Versterben auftrat. Darüber hinaus erkrankten in der DTX-Gruppe alle Tiere mit klinischen EAE-Symptomen (100% Inzidenz). Dies wurde in den Kontrollgruppen (87,8% und 83,3% Inzidenz) nicht beobachtet und ist bei dem verwendeten Mausstamm C57BL/6 auch im Chimärenmodell ungewöhnlich. Reproduzierbar fand sich in drei unabhängigen EAE-Durchgängen bei DTX-behandelten CD11c-DTR→C57BL/6 Knochenmarkchimären zudem das Auftreten atypischer Symptome, wie ausgeprägte Gang- und Standataxie, Störungen der Propriozeption oder spastische Paresen der Extremitäten. Derartige klinisch-neurologische Defizite wurden weder bei der PBS-behandelten Kontrollgruppe noch bei DTX-behandelten C57BL/6→C57BL/6 Knochenmarkchimären beobachtet.

Da die PBS-behandelten CD11c-DTR→C57BL/6 und die DTX-behandelten C57BL/6→C57BL/6 Tiere klinisch einen sehr ähnlichen Ausprägungsgrad der EAE-Symptomatik zeigten, ist ein unspezifischer Effekt des DTX auszuschließen.



## Ergebnisse



**Abbildung 4: Klinischer Verlauf der aktiven EAE**

Einen Tag vor Immunisierung wurde bei den CD11c-DTR→C57BL/6 und den C57BL/6→C57BL/6 (wt→wt) Knochenmarkchimären mit der umtägigen DTX- bzw. PBS-Gabe begonnen. Dargestellt ist der Mittelwert des täglich erhobenen klinischen Index sowie die Standardabweichung. Die Daten stammen von je 39 CD11c-DTR→C57BL/6 Chimären in der DTX- bzw. PBS-Gruppe und 14 C57BL/6→C57BL/6 Tieren aus 3 unabhängigen Experimenten. \* p > 0,01.

**Tabelle 5: Klinischer Verlauf der aktiven EAE**

	Antigen	Behandlung	Anzahl der Tiere	Inzidenz	Beginn klinischer Erkrankung	maximaler klinischer Index	mittlerer klinischer Index
CD11cDTR →C57BL/6	MOG <sub>35-55</sub>	DTX	39	100%	12,88 ± 0,46	4,41 ± 0,2	1,85 ± 0,18
CD11cDTR →C57BL/6	MOG <sub>35-55</sub>	PBS	39	87,8%	13,96 ± 0,32	2,26 ± 0,26	0,68 ± 0,11
C57BL/6 →C57BL/6	MOG <sub>35-55</sub>	DTX	14	83,3%	15,2 ± 1,01	2,75 ± 0,52	0,73 ± 0,22
CD11cDTR →C57BL/6	OVA <sub>323-339</sub>	DTX	5	0%	0	0	0

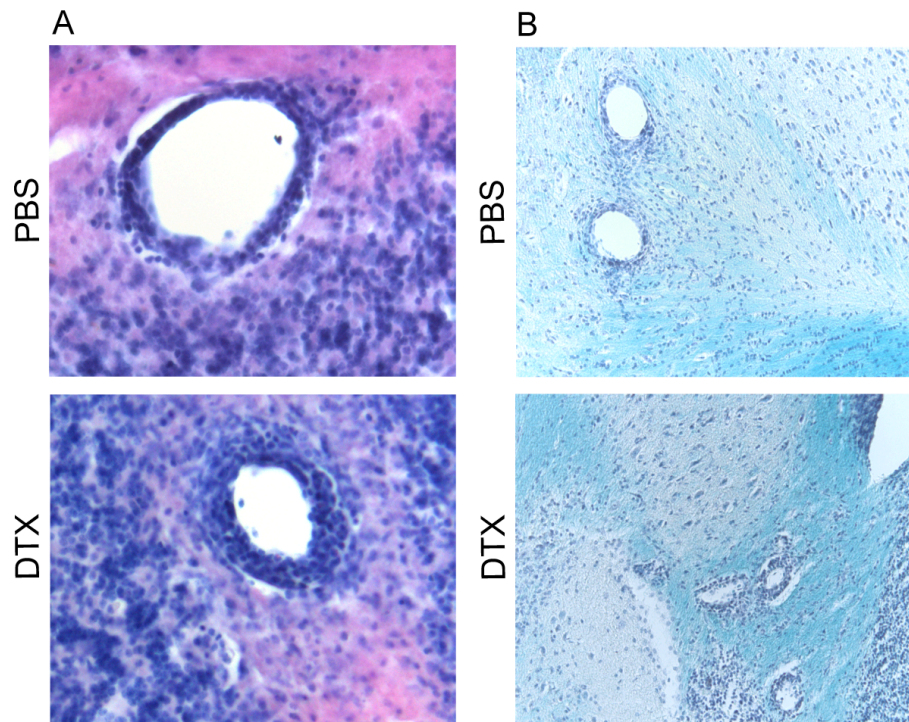
## Ergebnisse

Statistische Auswertung des klinischen Verlaufes der aktiven EAE in CD11cDTR→C57BL/6 und C57BL/6→C57BL/6 Knochenmarkchimären. Die DTX- bzw. PBS-Injektion wurde einen Tag vor Immunisierung mit MOG<sub>35-55</sub>, bzw. OVA<sub>323-339</sub> in der Kontrollgruppe begonnen. Die abgebildeten Daten entstammen drei unabhängigen Experimenten. Gezeigt ist die Häufigkeit der manifesten Erkrankung (Inzidenz), der durchschnittliche Beginn der klinischen Erkrankung sowie der gemittelte maximale und mittlere klinische Index mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

### **4.2.2 Histologische Untersuchung während aktiver EAE**

Um das morphologische Korrelat des klinischen Verlaufes zu untersuchen, wurden Gehirn und Rückenmark am Tag 16 für konventionelle histologische Färbungen aufbereitet. Die HE-Färbung ist eine bei der EAE standardmäßig eingesetzte Methode zur Abschätzung des Entzündungsmaßes im ZNS. Sie ergab im Zerebellum von PBS- und DTX- behandelten Knochenmarkchimären ein ähnliches perivaskuläres Infiltrationsmuster wie es typischerweise bei der EAE beobachtet wird (Abb 5 A). Auch in der LFB-Färbung, die Demyelinisierung darstellt, fand sich im Zerebellum kein wesentlicher morphologischer Unterschied zwischen beiden Gruppen (Abb. 5 B).

Im Rahmen der Promotionsarbeit von Jan Voß (Doktorand in derselben Arbeitsgruppe) zeigten sich auch im Rückenmark keine wesentlichen Unterschiede von Inflammation und Demyelinisierung zwischen DTX- und PBS-behandelten CD11c-DTR→C57BL/6 Knochenmarkchimären. Somit konnte eine qualitative Veränderung der Neuroinflammation durch die regelmäßige Applikation von DTX ausgeschlossen werden.



**Abbildung 5: Histopathologische Untersuchung am Tag 16 nach Immunisierung**

Teil (A) zeigt in der HE-Färbung die entzündliche, perivaskuläre Infiltration im Zerebellum von PBS- und DTX-behandelten CD11c-DTR→C57BL/6 Knochenmarkchimären. Analog dazu ist in Teil (B) die Demyelinisierung im Zerebellum mittels LFB-Färbung dargestellt.

#### **4.2.3 Beschleunigte ZNS-Migration von T-Effektorzellen nach Auslöschung dendritischer Zellen**

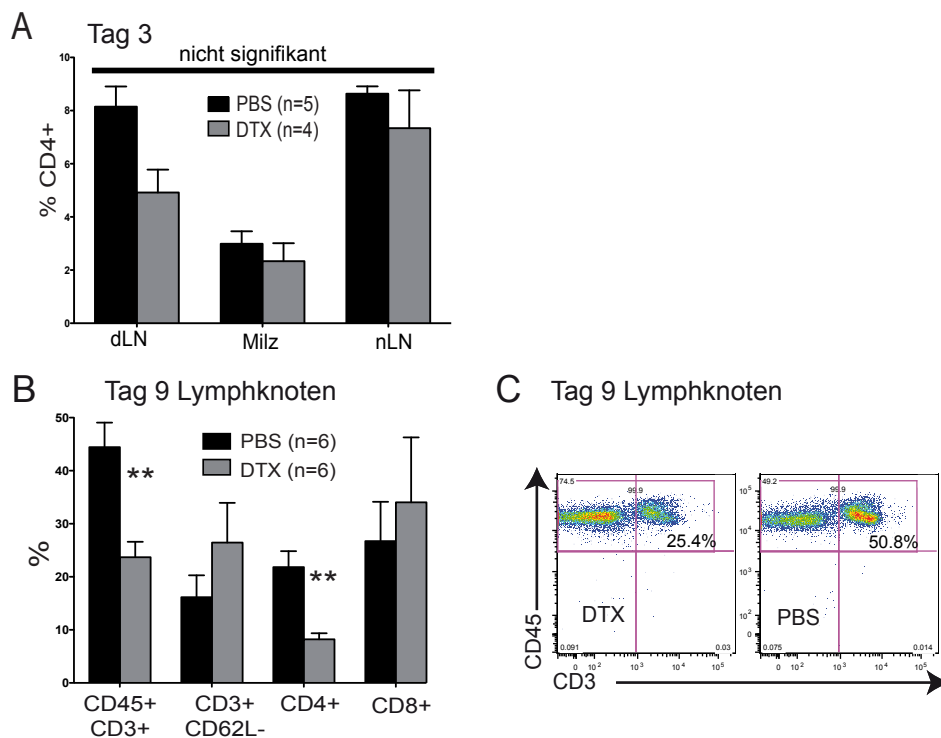
Bei der aktiven EAE kommt es nach der subkutanen Immunisierung zum Transport des Myelin-Antigens in die drainierenden Lymphknoten. Dort erfolgt die Präsentation durch professionelle Antigen-präsentierende Zellen und bei gleichzeitig vorhandenen kostimulatorischen Signalen die Differenzierung enzephalitogener Th-Zellen (Targoni et al., 2001). Nach Abschluss dieses "Reifungsprozesses" verlassen die Th-Zellen die drainierenden Lymphknoten und zirkulieren durch das periphere Gewebe. Treffen sie dort erneut auf ihr Antigen, so können sie durch Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine eine aggressive Gewebeentzündung vermitteln.

Eine mögliche Ursache des bei DTX-behandelten Tieren beobachteten, schweren und früh einsetzenden Krankheitsverlaufes ist daher eine beschleunigte T-Zell-Differenzierung und konsekutiv auch frühere Einwanderung dieser Zellen ins ZNS. Um das zu untersuchen, wurden die Immunzellen drainierender und nicht drainierender Lymphknoten und der Milz vor Beginn der klinischen Symptomatik isoliert und durchflusszytometrisch charakterisiert.

## Ergebnisse

Kurz nach Immunisierung, an Tag 3 der EAE, unterschied sich die Anzahl CD4+ T-Zellen in drainierenden und nicht-drainierenden Lymphknoten sowie in der Milz zwischen beiden Gruppen nicht signifikant (Abb. 6 A).

Am Tag 9 nach Immunisierung dagegen fand sich in den drainierenden Lymphknoten von DTX-behandelten Tieren eine deutliche Reduktion der gesamten CD45+ CD3+ T-Zellpopulation (Abb. 6 B/C). Besonders das pathogenetisch bedeutsame CD4+ T-Zell-Kompartiment war hiervon betroffen. Dies ist entweder durch die beschleunigte Migration von CD4+ T-Zellen aus den Lymphknoten oder durch ein vermindertes Einwandern anderer Leukozyten zu erklären (Sapoznikov et al., 2007). Die Häufigkeit nicht-naiver CD3+ CD62L- T-Effektorzellen und CD8+ zytotoxischer T-Zellen unterschied sich dagegen zu diesem Zeitpunkt nicht signifikant zwischen beiden Gruppen (Abb. 6 B).



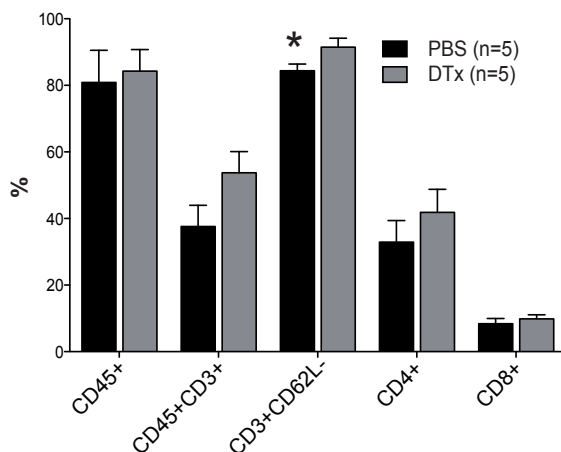
### Abbildung 6: T-Zell-Migrationskinetik in Gegenwart und Abwesenheit dendritischer Zellen

Teil (A) zeigt die relative Häufigkeit CD4+T-Zellen in Milz, drainierenden (dLN) und nicht-drainierenden (nLN) Lymphknoten am Tag 3 nach Immunisierung. In Abschnitt (B) ist die Frequenz von Leukozyten (CD45+), T-Zellen (CD45+CD3+), aktivierten T-Zellen (CD3+ CD62L-), zytotoxischen (CD8+) und T-Helferzellen (CD4+) kurz vor Beginn der klinischen EAE (Tag 9) in den drainierenden Lymphknoten dargestellt. Abschnitt (C) zeigt eine repräsentative Färbung des *Pan*-Leukozytenmarker CD45 sowie des T-Zellrezeptors CD3 ebenfalls an Tag 9 in den drainierenden Lymphknoten von DTX- bzw. PBS-behandelten Knochenmarkchimären.

## Ergebnisse

Um die, dem aggressiveren Verlauf zugrunde liegenden Vorgänge zu verstehen, erfolgte eine Charakterisierung der ZNS-infiltrierenden Immunzellen. Dazu wurden die mononukleären Zellen aus Gehirn und Rückenmark isoliert und nach Oberflächen- und Intrazellulärfärbung durchflusszytometrisch typisiert. Dies erfolgte bei klinisch manifester Erkrankung am Tag 15 nach Immunisierung. Die untersuchten Tiere wurden zu diesem Zeitpunkt mit einem klinischen Index zwischen 1 – 3 bewertet. Dabei zeigten sich im ZNS von DTX- und PBS-behandelten Tieren ähnliche Fraktionen CD4<sup>+</sup> Th- und CD8<sup>+</sup> zytotoxischer T-Zellen. Auch die zusammengefasste CD45<sup>+</sup> Leukozyten-Fraktion unterschied sich nicht signifikant zwischen beiden Gruppen (Abb. 7).

Die Aktivierung von T-Zellen kann anhand der Expression des L-Selektins CD62L bestimmt werden. Dieses Molekül ist für die Einwanderung naiver T-Zellen in sekundär lymphatische Gewebe notwendig. Reife T-Effektor-/Gedächtniszellen exprimieren kein CD62L mehr und können nach erneutem Antigen-Kontakt durch Zytokinsekretion direkt pro-inflammatorisch wirken. Diese nicht-naiven CD4<sup>+</sup> CD62L<sup>-</sup> Th-Zellen waren im ZNS DTX-behandelter Knochenmarkchimären im Vergleich zur PBS-behandelten Gruppe leicht vermehrt (Abb. 7).



**Abbildung 7: Phänotyp ZNS-infiltrierender Leukozyten am Tag 15 nach Immunisierung**

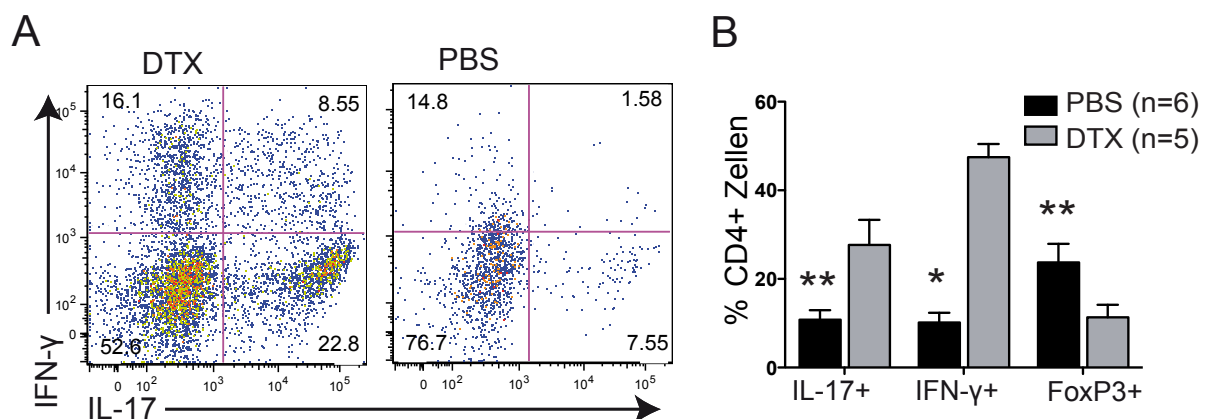
Nach Isolierung der mononukleären Zellen erfolgte eine durchflusszytometrischen Charakterisierung von Leukozyten (CD45<sup>+</sup>), T-Zellen (CD45<sup>+</sup> CD3<sup>+</sup>) sowie zytotoxischen (CD8<sup>+</sup>) und Th-Zellen (CD4<sup>+</sup>) jeweils nach DTX- bzw. PBS-Gabe. Nicht-naive T-Effektor-/Gedächtniszellen in Gehirn und Rückenmark wurden durch Abwesenheit von CD62L (CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup>) detektiert.

#### 4.2.4 Vermehrte ZNS-Infiltration von Th17-Zellen in der Abwesenheit dendritischer Zellen

Im Modell der EAE gibt es eine klare Korrelation zwischen klinischem Schweregrad einerseits sowie Anzahl und Phänotyp ZNS-infiltrierender CD4<sup>+</sup> Th-Zellen andererseits (Hofstetter et al., 2007). Anhand ihrer Zytokinsekretion können dabei Interferon- $\gamma$  produzierende Th1-Zellen und IL-17 produzierende Th17-Zellen unterschieden werden. Regulatorische T-Zellen sind an ihrer Expression des Transkriptionsfaktors FoxP3 zu erkennen.

Zur genauen Charakterisierung dieses CD4<sup>+</sup> T-Zellkompartiments wurde zunächst die Zytokinproduktion der aus dem ZNS isolierten mononukleären Zellen mit Hilfe von anti-CD3- und anti-CD28 Antikörpern stimuliert und die Zytokinsekretion nach 2 Stunden mittels Brefeldin A geblockt. Nach weiteren 2 Stunden folgte die Oberflächenfärbung, die Fixierung und Permeabilisierung der Zellen und schließlich die intrazelluläre Anfärbung. Bei der Analyse der Expression des Transkriptionsfaktor FoxP3 entfiel die Zytokinstimulation.

Die durchflusszytometrische Analyse am Tag 15 der EAE ergab eine signifikant erhöhte Fraktion Interferon- $\gamma$ - und IL-17-produzierender CD4<sup>+</sup> Th-Zellen im ZNS DTX-behandelter Knochenmarkchimären. Zusätzlich zu diesem aggressiveren Phänotyp der CD4<sup>+</sup> T-Effektorzellen waren die CD4<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> Treg-Zellen im ZNS in Abwesenheit dendritischer Zellen deutlich reduziert (Abb. 8 A/B).



**Abbildung 8: Phänotyp CD4<sup>+</sup> T-Zellen im ZNS am Tag 15 nach Immunisierung**

Teil (A) zeigt repräsentative Färbungen für die Zytokine IL-17 und Interferon- $\gamma$  in CD4<sup>+</sup> Th-Zellen der DTX- bzw. PBS-Gruppe. Im Teil (B) sind die Fraktionen der IL-17- und Interferon- $\gamma$ -produzierenden Zellen sowie der FoxP3-exprimierenden Zellen an allen CD4<sup>+</sup> T-Zellen im ZNS von DTX- und PBS-behandelten Tieren dargestellt.

### **4.2.5 Verminderte Induktion regulatorischer T-Zellen nach Depletion dendritischer Zellen**

Da sich während der akuten Krankheitsphase der EAE im ZNS DTX-behandelter Tiere eine Reduktion von Treg-Zellen gefunden hatte, schien es sinnvoll, den Effekt der Depletion dendritischer Zellen auf die Homöostase und Proliferation dieser Zellpopulation genauer zu untersuchen.

Es ist bekannt, dass es nach aktiver Immunisierung in den drainierenden Lymphknoten und in der Milz zu einer Expansion FoxP3<sup>+</sup> Treg-Zellen kommt (Korn et al., 2007b). Um zu untersuchen, ob hierfür die Präsenz dendritischer Zellen notwendig ist, erfolgte die durchflusszytometrische Analyse von Einzelzellsuspensionen dieser sekundär lymphatischen Organe zu unterschiedlichen Zeitpunkten während der aktiven EAE.

Die Häufigkeit aller CD4<sup>+</sup> T-Zellen in Milz und Lymphknoten unterschied sich dabei am Tag 3 nicht wesentlich zwischen beiden Gruppen (Abb. 6 A). Bereits zu diesem frühen Zeitpunkt war jedoch eine deutliche Verminderung der FoxP3<sup>+</sup> Treg-Zellen in der Milz und den drainierenden Lymphknoten DTX-behandelter Tiere feststellbar. In den nicht-drainierenden Lymphknoten dagegen ließ sich kein Unterschied beobachten (Abb 9 A).

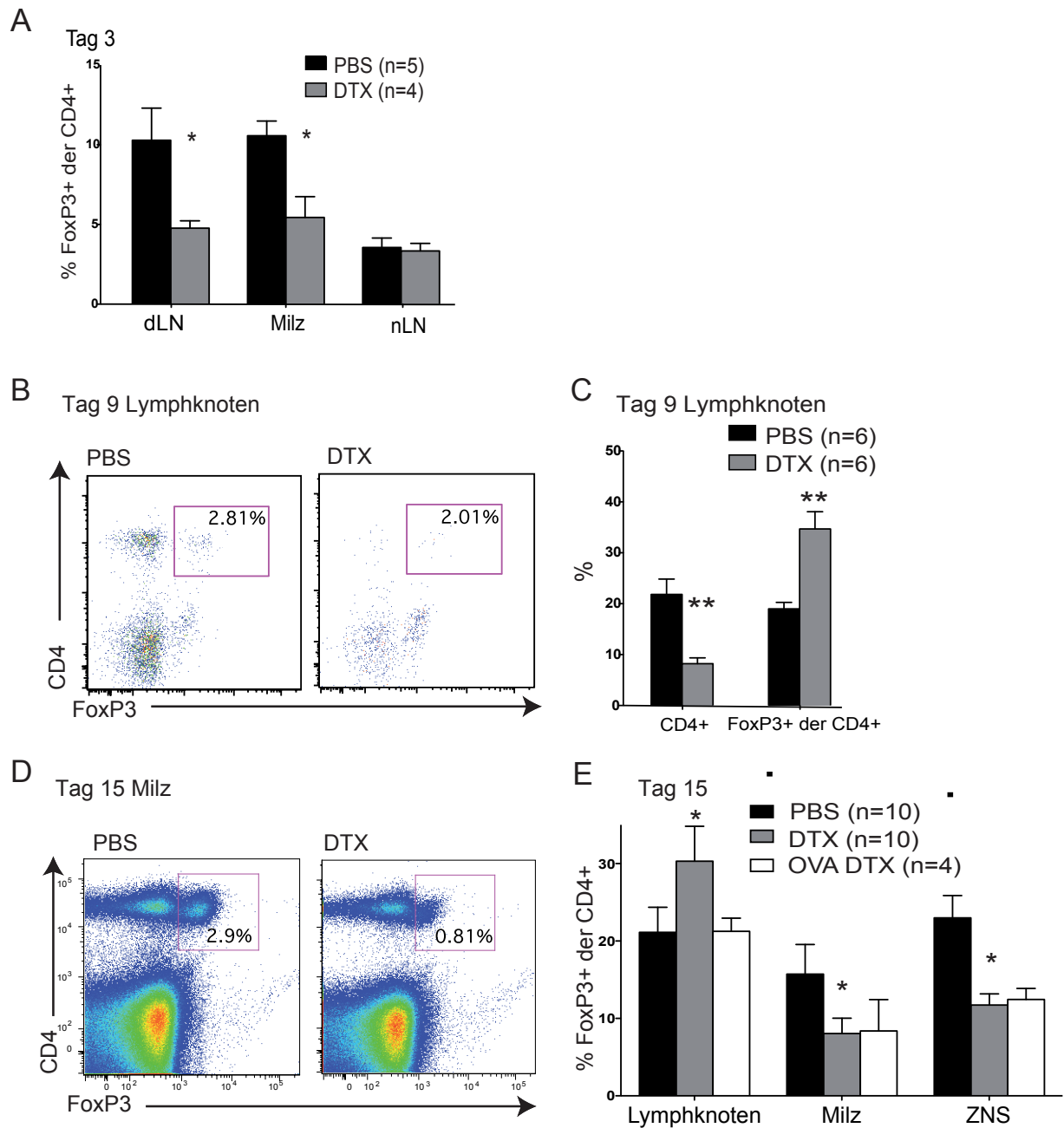
Am Tag 9 nach Immunisierung war die Häufigkeit aller CD4<sup>+</sup> T-Zellen in den drainierenden Lymphknoten DTX-behandelter Tiere deutlich vermindert (Abb. 9 B/C). Ob diesem Phänomen die beschleunigte Auswanderung CD4<sup>+</sup> T-Zellen oder eine gestörte Einwanderung anderer Leukozytenpopulationen zugrunde liegt, konnte nicht geklärt werden. Infolge dieser Reduktion CD4<sup>+</sup> T-Zellen erschien die relative Anzahl CD4<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> Treg-Zellen an den Lymphozyten in beiden Gruppen ähnlich (Abb. 9 B). Beim Vergleich der Anteile, den die FoxP3<sup>+</sup> Treg-Zellen an der Gesamtmenge aller CD4<sup>+</sup> T-Zellen ausmachen, zeigte sich jedoch eine vermehrte Häufigkeit FoxP3<sup>+</sup> Treg-Zellen in den drainierenden Lymphknoten DTX-behandelter Knochenmarkchimären (Abb. 9 C). Diese Verteilung wurde auch am Tag 15, als bereits deutliche klinische Symptome der EAE vorlagen, beobachtet (Abb. 9 E).

Im Gegensatz zu dieser relativen Anreicherung in den drainierenden Lymphknoten fand sich zum gleichen Zeitpunkt in der Milz und im ZNS DTX-behandelter Tieren eine deutlich verminderte Anzahl FoxP3<sup>+</sup> Treg-Zellen. (Abb. 9 D/E).

Um eine EAE-spezifische Ursache dieser fehlenden Expansion von Treg-Zellen in der Abwesenheit dendritischer Zellen auszuschließen, erfolgte auch eine Immunisierung mit

## Ergebnisse

dem Peptid Ovalbumin (OVA<sub>339-351</sub>), das in der Maus nicht vorkommt. Bei diesen Tieren führte die DTX-Behandlung ebenfalls zum Ausbleiben einer Treg-Zell-Expansion in Milz und Lymphknoten (Abb. 9 E).



### Abbildung 9: Treg-Zell-Induktion nach aktiver Immunisierung in der Abwesenheit dendritischer Zellen

Teil (A) zeigt die prozentuale Fraktion FoxP3+ Treg-Zellen an allen CD4+ Zellen kurz nach Immunisierung am Tag 3 in Milz, drainierenden (dLN) und nicht-drainierenden (nLN) Lymphknoten. In den Teilen (B) und (C) ist die Expression von CD4 und FoxP3 an Tag 9 in den drainierenden Lymphknoten dargestellt. (B) ist eine repräsentative durchflusszytometrische Analyse von Lymphozyten. In Abschnitt (C) ist die Abnahme CD4+ T-Zellen ( $p=0.006$ ,  $n=6$ ) und die Zunahme FoxP3+ Treg-Zellen an



der Gestamtheit aller CD4<sup>+</sup> T-Zellen ( $p=0.004$ ) unter DTX-Behandlung erkennbar.

Die Abbildungen (D) und (E) zeigen FoxP3<sup>+</sup> Treg-Zellen am Tag 15 nach Immunisierung. (D) ist eine repräsentative Färbung für CD4 und FoxP3 aus der Milz (nur Lymphozyten dargestellt). In (E) ist die relative Fraktion FoxP3<sup>+</sup> Treg-Zellen am gesamten CD4<sup>+</sup> T-Zellkompartiment in drainierenden Lymphknoten, Milz und ZNS nach Immunisierung mit MOG bzw. OVA abgebildet.

### **4.3 T-Zellproliferation nach Depletion dendritischer Zellen *in-vivo* und *in-vitro***

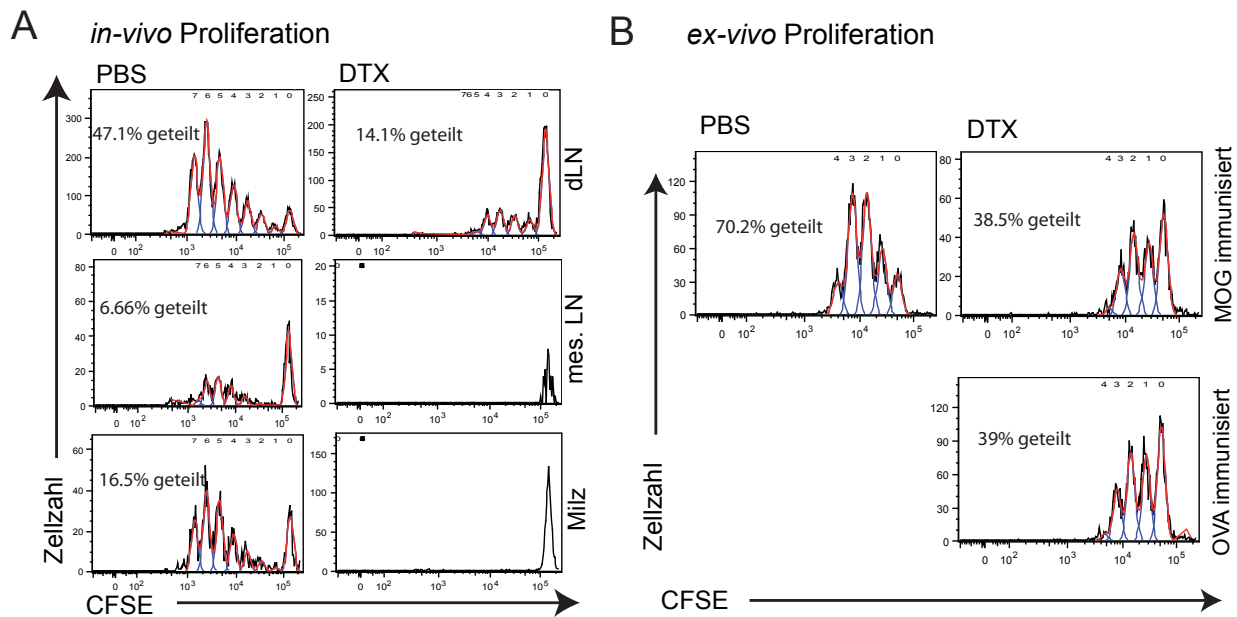
Die Vorstellung, dass dendritische Zellen während einer Immunreaktion einen pro-inflammatorischen Effekt ausüben, stützt sich im Wesentlichen auf die Beobachtung, dass diese Zellen in der Lage sind, die T-Zellproliferation sehr effektiv zu stimulieren (Nussenzweig und Steinman, 1980). In Anbetracht der oben beschriebenen Ergebnisse lag es daher nahe zu untersuchen, in wieweit die Proliferation MOG-spezifischer T-Zellen, speziell in der initialen Phase der EAE, durch die Abwesenheit dendritischer Zellen beeinträchtigt wird. Dazu wurden naive CD4<sup>+</sup> CD62L<sup>+</sup> T-Zellen mittels MACS-Zellsortierung aus 2d2 Splenozyten isoliert und mit dem Farbstoff CFSE gefärbt. Anschließend wurden je  $5 \times 10^6$  dieser Zellen intravenös in CD11c-DTR-Mäuse transferiert und den Tieren entweder DTX oder in der Kontrollgruppe PBS injiziert. Am darauf folgenden Tag erfolgte die standardmäßige EAE-Immunisierung und drei Tage später die durchflusszytometrische Analyse von Einzelzellsuspensionen aus drainierenden und mesenterialen Lymphknoten und der Milz. Dabei wurde die Proliferation transferierter CD4<sup>+</sup> 2d2 (Vb11<sup>+</sup>) T-Zellen durch Bestimmung der CFSE-Fluoreszenz quantifiziert. In allen drei Organkompartimenten führte die Depletion dendritischer Zellen zu einer deutlich verminderten *in-vivo* Proliferation der Myelin-spezifischen CD4<sup>+</sup> T-Zellen (Abb. 10 A).

Um herauszufinden, inwieweit diese Wirkung spezifisch für das verwendete Antigen oder die initiale Phase nach EAE-Induktion ist, wurde ein weiteres Experiment konzipiert. Mit MOG<sub>35-55</sub> bzw. OVA<sub>339-351</sub> immunisierte CD11c-DTR→C57BL/6 Knochenmarkchimären erhielten standardmäßig alle 48 Stunden eine DTX- bzw. PBS-Injektion. Am Tag 9 wurden die Tiere getötet und aus den Splenozyten mittels MACS-Technologie die CD90<sup>-</sup> Antigen-präsentierenden Zellen isoliert. Diese wurden sodann mit CFSE-gefärbten naiven CD4<sup>+</sup> CD62L<sup>+</sup> 2d2 T-Zellen unter Zugabe von MOG<sub>35-55</sub> bzw. OVA<sub>339-351</sub> inkubiert. Hier fand sich ebenfalls eine reduzierte T-Zellproliferation, wenn die dendritischen Zellen zuvor durch DTX-Gabe ausgelöscht worden waren. Dies

## Ergebnisse

betrifft MOG<sub>35-55</sub> und OVA<sub>339-351</sub> immunisierte Tiere gleichermaßen, so dass ein Antigen-spezifischer Effekt ausgeschlossen werden kann (Abb. 10 B).

Trotz dieser gestörten T-Zellproliferation nach Depletion dendritischer Zellen war jedoch die Häufigkeit von Th1- und Th17-Zellen in der Milz am Tag 9 in DTX- und PBS-behandelten Tieren vergleichbar.



**Abbildung 10: Proliferation von 2d2 CD4<sup>+</sup> T-Zellen nach Depletion dendritischer Zellen**

Teil (A) zeigt die durchflusszytometrische Proliferationsmessung von 2d2 CD4<sup>+</sup> T-Zellen drei Tage nach Immunisierung mit MOG<sub>35-55</sub> in drainierenden (dLN) und mesenterialen (mes. LN) Lymphknoten sowie in der Milz. Einen Tag vor der Immunisierung wurden CFSE-gefärbte 2d2 CD4<sup>+</sup> T-Zellen in CD11c-DTR Mäuse transferiert und anschließend entweder DTX- oder PBS injiziert.

In Teil (B) ist die Proliferation CFSE-gefärbter CD4<sup>+</sup> CD62L<sup>+</sup> 2d2 T-Zellen nach Kokultur mit Antigen-präsentierenden Zellen aus der Milz von CD11cDTR→C57BL/6-Knochenmarkchimären dargestellt. Diese Antigen-präsentierenden Zellen wurden am Tag 9 nach Immunisierung mit MOG<sub>35-55</sub> oder OVA<sub>339-351</sub> durch Depletion der CD90<sup>+</sup> Zellen gewonnen. Die CD11cDTR→C57BL/6-Knochenmarkchimären erhielten zuvor entweder DTX- oder PBS-Gaben nach dem üblichen Schema.

## 4.4 Transfer-EAE in der Abwesenheit dendritischer Zellen

### 4.4.1 Abgemilderter klinischer Verlauf der Transfer-EAE nach Depletion dendritischer Zellen

Die beobachtete protektive Rolle dendritischer Zellen in der aktiven EAE steht im Widerspruch zu der beschriebenen pro-inflammatorische Funktion dieser Zellen nach Transfer enzephalitogener T-Zellen in naive Tiere (Greter et al., 2005; Bailey et al., 2007). Daher stellte sich die Frage, ob dendritische Zellen während der EAE abhängig

## Ergebnisse

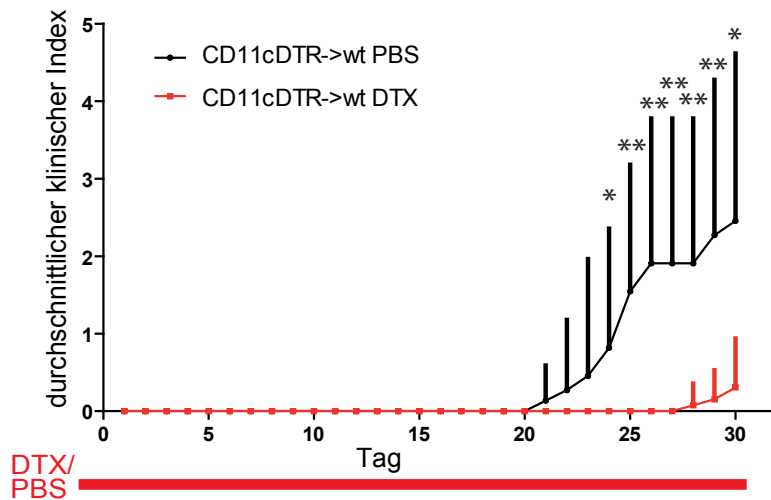
von Erkrankungsphase und der ihr zugrunde liegenden Immunpathologie, unterschiedliche Funktionen ausüben können.

Um dies zu untersuchen, wurde die sog. Transfer-EAE eingesetzt, die durch Injektion von *in-vitro* generierten, enzephalitogenen Th17-Zellen ausgelöst wird und so die initiale Phase der T-Zelldifferenzierung- und Aktivierung in den drainierenden Lymphknoten umgeht. Dazu wurden naive CD4<sup>+</sup> CD62L<sup>+</sup> Splenozyten aus B6.2d2.tdRFP Mäusen *in-vitro* mit MOG<sub>35-55</sub> beladenen Antigen-präsentierenden Zellen stimuliert und durch Zusatz der Zytokine TGF- $\beta$ , IL-6 und IL-23 der Th17-Phänotyp induziert. In dem doppelt transgenen B6.2d2.tdRFP Mausstamm trägt die Mehrheit der T-Zellen einen MOG<sub>35-55</sub>-spezifischen T-Zellrezeptor, zusätzlich wird unter dem ubiquitären Promoter *Rosa26* das rot fluoreszierende Protein tdRFP exprimiert (Siffrin et al., 2010a).

Einen Tag vor dem intravenösen Transfer von  $5 \times 10^6$  der enzephalitogenen Th17-Zellen in CD11c-DTR $\rightarrow$ C57BL/6 Knochenmarkchimären erfolgte eine Randomisierung in zwei Gruppen. Analog zur aktiven EAE erhielten die Tiere von nun ab über den gesamten Verlauf des Experimentes alle 48 Stunden eine intraperitoneale Injektion mit DTX bzw. PBS.

Dabei zeigte die DTX-Gruppe reproduzierbar eine sehr milde Verlaufsform der EAE (Abb. 11). So betrug der mittlere klinische Index bei diesen Tieren nur 0,05 ( $\pm$  0,03), gegenüber 0,51 ( $\pm$  0,45) in der PBS-Kontrollgruppe. Auch die Manifestationsrate war in der DTX-behandelten Gruppe mit einer Inzidenz von lediglich 30,78%, im Vergleich zu 63,36% in der PBS-behandelten Gruppe deutlich geringer (Tabelle 6).

## Ergebnisse



**Abbildung 11: Klinischer Verlauf der Transfer-EAE**

Einen Tag vor Transfer der enzephalitogenen Th17-Zellen wurde mit der DTX- bzw. PBS-Gabe begonnen. Dargestellt ist der Mittelwert des täglich erhobenen klinischen Index sowie die Standardabweichung. Die Daten stammen von 13 Tieren in der DTX- bzw. 11 Tieren in der PBS-Gruppe aus 2 unabhängigen Experimenten. \*  $p > 0,01$ .

**Tabelle 6: Klinischer Verlauf der Transfer-EAE**

	EAE Induktion	Behandlung	Anzahl der Tiere	Inzidenz	Beginn klinischer Erkrankung	maximaler klinischer Index	mittlerer klinischer Index
CD11cDTR → C57BL/6	2D2 Th17	DTX	13	30,78%	29,25 ± 0,96	1,25 ± 0,5	0,05 ± 0,03
CD11cDTR → C57BL/6	2D2 Th17	PBS	11	63,36%	24 ± 1,41	4,14 ± 0,9	0,51 ± 0,45

Statistische Auswertung des klinischen Verlaufes der passiven EAE in CD11cDTR→C7BL/6wt Knochenmarkchimären. Die DTX- bzw. PBS-Injektionen wurden einen Tag vor Transfer der *in-vitro* generierten, MOG<sub>35-55</sub>-spezifischen Th17-Zellen begonnen. Die abgebildeten Daten entstammen 2 unabhängigen Experimenten. Gezeigt ist die Häufigkeit der manifesten Erkrankung (Inzidenz), der durchschnittliche Beginn der klinischen Erkrankung sowie der gemittelte maximale und mittlere klinische Index mit den dazugehörigen Standardabweichung.

#### **4.4.2 Reduzierte ZNS-Infiltration von Th17-Zellen nach Auslöschung dendritischer Zellen**

Zur Aufklärung der dem klinischen Verlauf zugrundeliegenden Pathophysiologie erfolgte die Isolation mononukleärer Zellen aus Gehirn und Rückenmark für die durchflusszytometrische Analyse. Am Tag 30 nach Transfer der MOG<sub>35-55</sub>-spezifischen Th17-Zellen fand sich dabei eine vermehrte Anreicherung dieser Zellen im ZNS der PBS-behandelten Kontrollgruppe. Die repräsentative Analyse in Abb. 12 A zeigt diese im Vergleich zu DTX-behandelten Tieren deutlich verstärkte ZNS-Akkumulation der enzephalitogenen CD4<sup>+</sup> T-Zellen in der Kontrollgruppe.

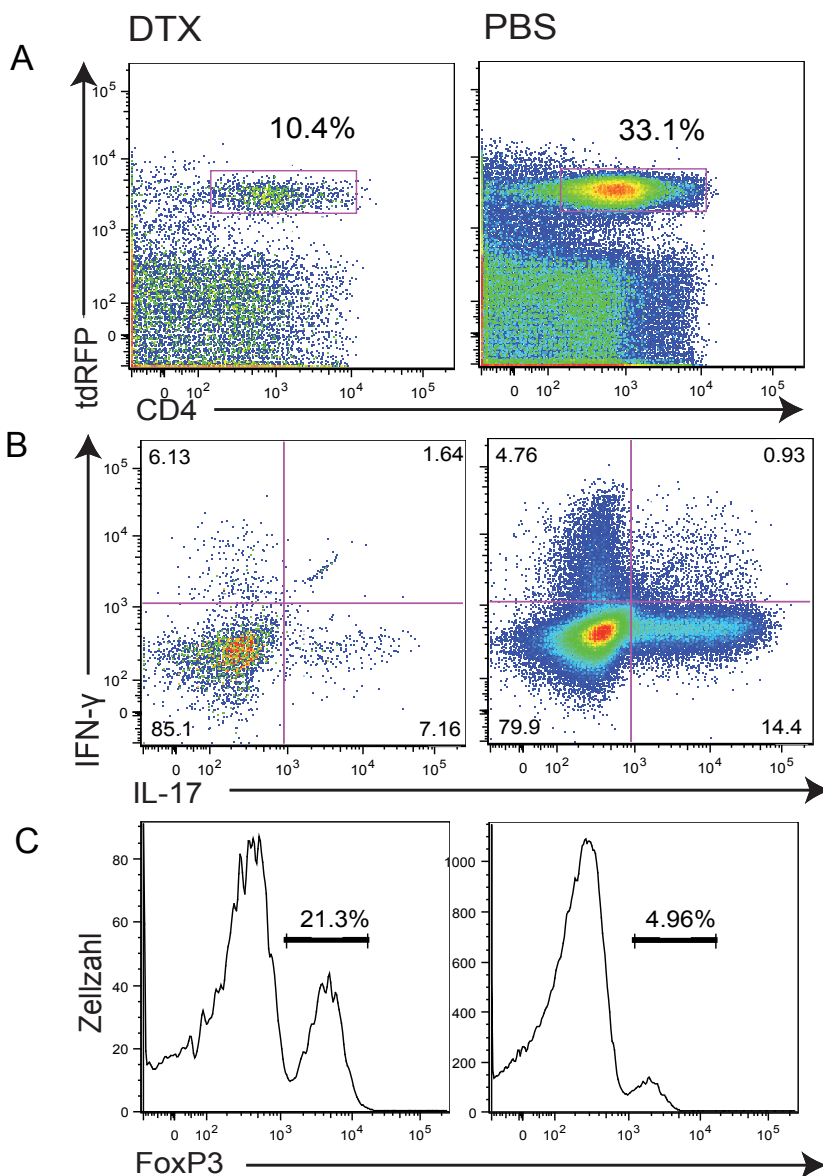
Wurden diese Zellen nicht nur anhand ihrer tdRFP- und CD4-Expression dem Th17-Kompartiment zugerechnet, sondern nach Zytokinstimulation ihre aktuelle, endogene Produktion von IL-17 untersucht, so ergab sich ein vergleichbares Bild (Abb. 12 B).

Auch die Anzahl Interferon- $\gamma$ -produzierender Th1-Zellen im ZNS war in der Gegenwart dendritischer Zellen erhöht (Abb. 12 B).

Passend zu der vermehrten ZNS-Invasion aggressiver T-Effektorzellen zeigten die Tiere der PBS-Kontrollgruppe dort auch eine reduzierte Anzahl von Treg-Zellen (Abb. 12 C).

## Ergebnisse

### CD4<sup>+</sup> T-Zellen im ZNS



**Abbildung 12: Analyse ZNS-infiltrierender CD4<sup>+</sup> T-Zellen während Transfer-EAE**

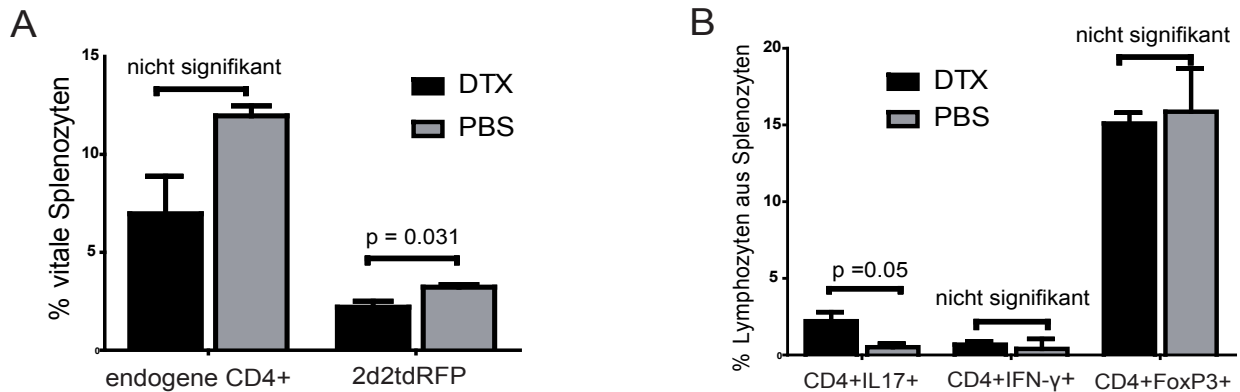
Repräsentative durchflusszytometrische Analysen mononukleärer Zellen aus dem ZNS von PBS- und DTX-behandelten CD11cDTR→C57BL/6-Knochenmarkchimären 30 Tage nach Transfer MOG<sub>35-55</sub>-spezifischer Th17-Zellen. Teil (A) zeigt die Detektion enzephalitogener Th17-Zellen anhand der Expression von tdRFP und CD4. In Abbildung (B) sieht man die Interferon-γ- und IL-17-Produktion in CD4<sup>+</sup>-T-Zellen. (C) ist eine Darstellung des Anteils FoxP3<sup>+</sup> Treg-Zellen am gesamten CD4<sup>+</sup> T-Zellkompartiment.

Parallel zu der erhöhten Anzahl von tdRFP<sup>+</sup> Zellen im ZNS der PBS-behandelten Gruppe war diese Zellpopulation auch in der Milz dieser Tiere leicht vermehrt (Abb. 13 A). Dies ist möglicherweise Ausdruck einer verlängerten Lebensdauer der Th17-Zellen in der Gegenwart dendritischer Zellen.

## Ergebnisse

Die Gesamtfraktion IL-17-produzierender CD4+ T-Zellen in der Milz war jedoch bei den PBS-behandelten Tieren geringer als bei DTX-Gabe (Abb 13 B). Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass dendritische Zellen durch lokale Restimulation die Einwanderung von Th17-Zellen in das ZNS-Parenchym erleichtern, wodurch es dort zu einer relativen Anreicherung dieser Zellen kommt.

### CD4+ T-Zellen in der Milz



**Abbildung 13: Phänotyp CD4+ T-Zellen in der Milz während Transfer EAE**

Teil (A) zeigt die Expression von CD4 in endogenen T-Zellen und von tdRFP in transferierten T-Zellen in der Milz von PBS- und DTX-behandelten CD11cDTR $\rightarrow$ C57BL/6-Knochenmarkchimären. In Teil (B) ist die IL-17- und Interferon- $\gamma$ -Produktion sowie die FoxP3-Expression in Lymphozyten der Milz dargestellt.

### **4.4.3 Interaktion von Th17- und dendritischen Zellen im entzündeten ZNS *in-vivo***

Um die *in-vivo* auftretenden Wechselwirkungen zwischen dendritischen und Th17-Zellen während autoimmuner Neuroinflammation zu beobachten, wurde die intravitale Zweiphotonenmikroskopie eingesetzt. Die Visualisierung der beiden Zellpopulationen in lebenden Tieren ist aufgrund der transgenen, zellspezifischen Expression fluoreszierender Proteine möglich.

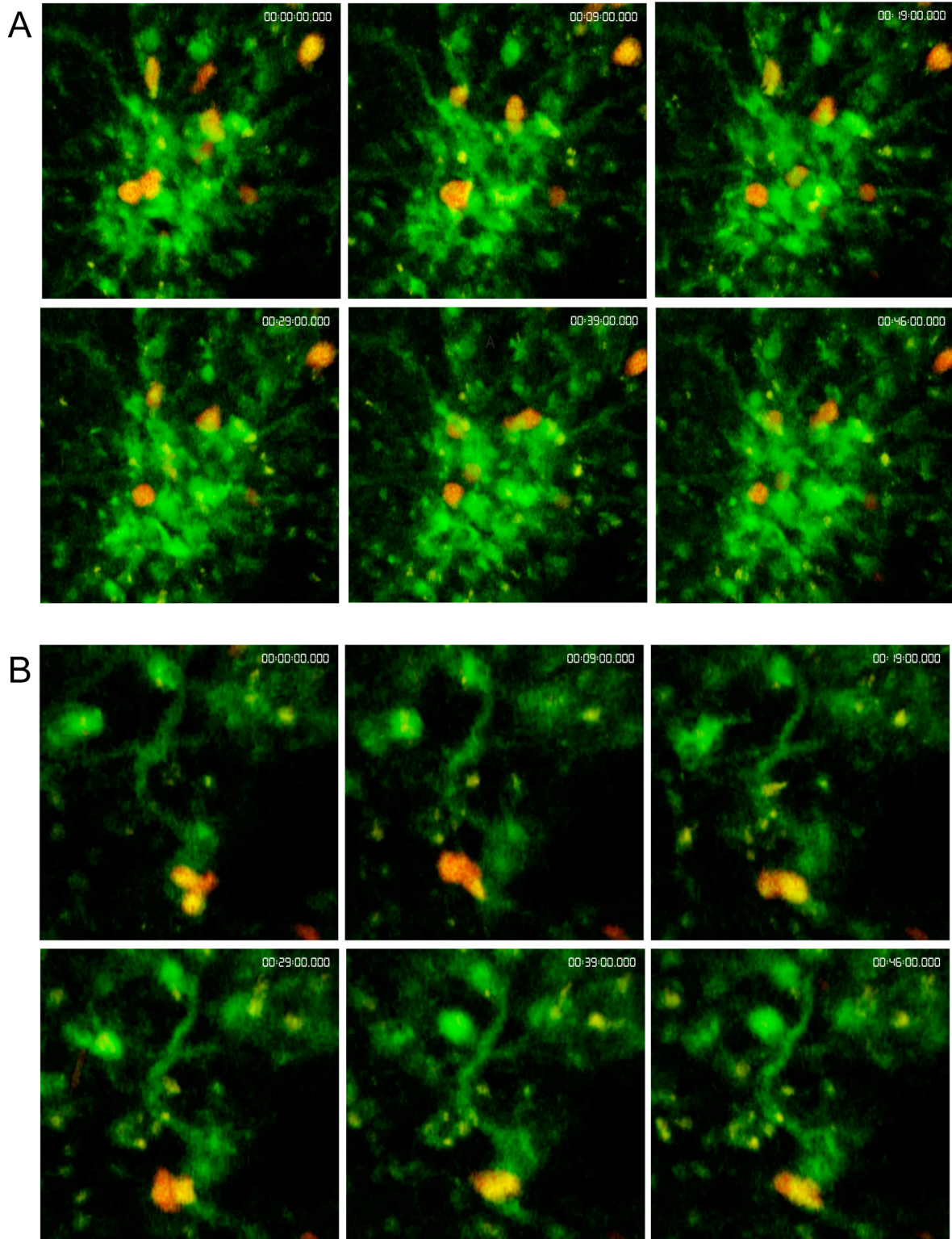
Die zur Induktion der Transfer-EAE *in-vitro* differenzierten 2d2.tdRFP Th17-Zellen exprimieren das rot fluoreszierende Protein tdRFP. Die CD11c<sup>+</sup> dendritischen Zellen in den CD11cDTR→C57BL/6 Knochenmarkchimären dagegen produzieren das grün fluoreszierende Protein GFP. Beide können mittels Zweiphotonenmikroskopie angeregt und die von ihnen emittierten Photonen detektiert werden. Es wurden aktive EAE-Läsionen im Hirnstamm von anästhesierten PBS-behandelten CD11cDTR→C57BL/6 Knochenmarkchimären kurz nach Auftreten der ersten klinischen Symptome (ca. Tag 20 Tag nach Zelltransfer) untersucht.

Die Vorbereitung der Tiere (Chimären-Induktion, EAE-Induktion) wurde von Johannes Werr durchgeführt, die operative Vorbereitung der Tiere und die Mikroskopie der mittels Zweiphotonen-Intravitalmikroskopie erhobenen Daten wurde von Dr. Volker Siffrin durchgeführt; die Analyse erfolgte zu gleichen Teilen.

In den entzündlichen Läsionen fand sich reproduzierbar eine deutliche Kollokalisierung enzephalitogener 2d2.tdRFP<sup>+</sup> Th17-Zellen mit Anhäufungen CD11c-GFP<sup>+</sup> dendritischer Zellen (Abb. 14 A). Darüber hinaus konnte ein aktives Abtasten der verzweigten Ausläufer CD11c-GFP<sup>+</sup> dendritischer Zellen durch 2d2.tdRFP<sup>+</sup> Th17-Zellen beobachtet werden (Abb. 14 B).



## Ergebnisse



**Abbildung 14: Intravitale Zweiphotonenmikroskopie im Hirnstamm während Transfer-EAE**

Die transferierten enzephalitogenen 2d2.tdRFP+ Th17-Zellen sind rot, die GFP-exprimierenden CD11c+ dendritischen Zellen grün abgebildet. Gezeigt sind jeweils Aufnahmen zu Beginn der Zweiphotonenmikroskopie sowie nach 9, 19, 29, 39 und 46 Minuten. Deutlich sichtbar ist die lebhafte Interaktion zwischen beiden Zellpopulation (A) und wie die Th17-Zellen die dendritischen Zellen aktiv abtasten (B).

## 5 Diskussion

Die Bedeutung dendritischer Zellen in der autoimmunen Neuroinflammation ist nicht vollständig geklärt und es sind sowohl schützende als auch schädigende Effekte beschrieben (Zozulya et al., 2010). Als Gründe für die umstrittene Rolle dendritischer Zellen in der Pathogenese der EAE sind unter anderem die begrenzte Aussagekraft *ex-vivo* durchgeführter Experimente und der lange Zeit bestehende Mangel an geeigneten *in-vivo* Methoden zu nennen. Daher war es das Hauptziel dieser Arbeit, die tatsächliche *in-vivo* Funktion dendritischer Zellen während sich entwickelnder und chronischer Neuroinflammation genauer zu charakterisieren. Durch den Einsatz eines transgenen Mausmodells, das die Depletion dendritischer Zellen erlaubt, leistet die vorgelegte Arbeit einen Beitrag zum integrativen Verständnis der vielseitigen Funktionen dieser Zellen in der autoimmunen Entzündung im ZNS.

Im Folgenden sollen die hier vorgestellten Ergebnisse im Kontext der aktuellen Literatur diskutiert und abschließend ein Ausblick auf mögliche Chancen und Risiken einer therapeutischen Beeinflussung dendritischer Zellen bei chronisch-entzündlichen ZNS-Erkrankungen gewagt werden.

### 5.1 Dendritische Zellen im autoimmun-entzündeten ZNS

Das historische Konzept des „Immunprivilegs“ betrachtete das ZNS aufgrund seiner geringen Transplantatabstoßung und der fast undurchdringlichen Blut-Hirn-Schranke als einen Ort stark herabgesetzter Immunreaktivität. Wenngleich dies heute einer differenzierteren Sichtweise gewichen ist (Galea et al., 2007), schien die Beobachtung, dass dendritische Zellen im gesunden ZNS-Parenchym nicht nachweisbar sind, zu dieser Vorstellung zu passen (Hart und Fabre, 1981).

In der Folge infektiöser oder autoimmuner Entzündung kommt es jedoch zur raschen Akkumulation dendritischer Zellen im perivaskulären Raum des ZNS, dem zentralen Ort der lokalen (Re-)Aktivierung von T-Zellen (Zozulya et al., 2010). Die Herkunft dieser Zellen ist unklar und es gibt sowohl Hinweise für eine Differenzierung aus residenter Mikroglia (Fischer und Reichmann, 2001), als auch für die Rekrutierung peripherer Zellen (Bailey et al., 2007).

Die Aufklärung des kausalen Beitrags dendritischer Zellen in der Pathogenese der Multiplen Sklerose ist bisher nur begrenzt gelungen und die vorliegende Literatur

erlaubt diesbezüglich nur sehr vorsichtige Aussagen. Autoptisch konnte man im perivaskulären Raum aktiver wie auch chronischer Multiple-Sklerose-Läsionen Myelinhaltige dendritische Zellen nachweisen, die z.T. einen „reifen“ Phänotyp hatten und sich in räumlicher Nähe zu proliferierenden Lymphozyten befanden (Serafini et al., 2006). Dies ist ein möglicher Hinweis für ihre Beteiligung an der lokalen Aktivierung und Expansion enzephalitogener T-Zellen. Darüber hinaus konnte im Blut und Liquor von Multiple-Sklerose-Patienten eine erhöhte Anzahl und vermehrte Aktivierung dendritischer Zellen nachgewiesen werden (Huang et al., 1999; Pashenkov et al., 2001). Auch die unter Therapie mit Glucocorticoiden oder Interferon- $\beta$  – etablierter Behandlungsregimes in der Multiplen Sklerose – beobachtete verminderte Häufigkeit und veränderte Expression von Oberflächenmarkern sind mögliche Belege für eine pathophysiologische Rolle dieser Zellen (Zozulya et al., 2010).

### **5.2 Protektive Rolle dendritischer Zellen im Modell der aktiven EAE**

Die generelle Bedeutung dendritischer Zellen für die Aufrechterhaltung der Toleranz wird durch das Auftreten autoimmuner Phänomene bei ihrer dauerhaften Entfernung in transgenen Tieren deutlich (Ohnmacht et al., 2009). Auch im Modell der EAE gibt es Anhaltspunkte für eine protektive Funktion dendritischer Zellen und eine enge Vernetzung mit dem regulatorischen T-Zellkompartiment. Dies zeigen Experimente, bei denen die selektive Einschleusung des Autoantigens MOG in dendritische Zellen die Differenzierung enzephalitogener T-Zellen und damit den Ausbruch der EAE unterdrücken konnte (Hawiger et al., 2004). Darüber hinaus führte der wiederholte Transfer von mit TNF- $\alpha$  und Myelinprotein inkubierten dendritischen Zellen zur Induktion Antigen-spezifischer IL-10 produzierender T-Zellen und vermittelte eine EAE-Resistenz (Menges et al., 2002). Es wurden auch definierte Subpopulationen identifiziert, die durch Sekretion anti-inflammatorischer Zytokine die T-Zell-Proliferation supprimieren und so den Krankheitsverlauf abmildern können (Li et al., 2008; Legge et al., 2002). Es bleibt jedoch umstritten, ob dendritische Zellen auch *während* der sich entwickelnden Immunantwort und bei gleichzeitiger Exposition gegenüber pro-inflammatorischen Stimuli immunmodulatorisch wirken können.

#### **5.2.1 Dendritische Zellen limitieren klinischen Schweregrad und Th17-vermittelte ZNS-Schädigung während aktiver EAE**

Zwei wichtige Studien haben den Einfluss von dendritischen Zellen in der EAE untersucht. So zeigten Whartenby et al., dass die Reduktion dendritischer Zellen durch

gezielte Manipulation ihrer Differenzierung in einem fortgeschrittenen Stadium der aktiven EAE einen günstigen Effekt hat (Whartenby et al., 2005). Damit in Einklang beobachteten Greter et al. ein vermehrtes Auftreten neurologischer Defizite, wenn dendritische Zellen vor dem Transfer enzephalitogener T-Zellen zur Proliferation angeregt wurden (Greter et al., 2005).

In der hier vorgelegten Arbeit wurde hingegen die Depletion zum frühest möglichen Zeitpunkt begonnen. Überraschenderweise und anders als in der Spätphase war bei diesen Experimenten der klinische Verlauf der aktiven EAE in Abwesenheit dendritischer Zellen deutlich schwerer. So wurden ein früheres Auftreten der ersten Krankheitssymptome, ein erhöhter durchschnittlicher Schweregrad und atypische klinische Manifestationen beobachtet. Dabei handelte es sich um Störungen der Propriozeption, Gang- und Standataxie sowie spastische Lähmungen. Derartige atypische Symptome sind im Kontext Th17-prädominanter EAE beschrieben (Domingues et al., 2010) und stehen möglicherweise in Zusammenhang mit einer primär das Gehirn und weniger ausprägt das Rückenmark betreffenden Neuroinflammation (Stromnes et al., 2008). Auch das Auftreten einer 100% Inzidenz und spontaner Mortalität in der DTX-behandelten Gruppe, beides in C57BL/6 Wildtyp-Tieren nicht zu beobachtende Phänomene, legen eine nicht-redundante, protektive Funktion dendritischer Zellen während der aktiven EAE nahe. Ein unspezifischer pro-inflammatorischer Effekt des DTX als Ursache des schweren Verlaufes ist unwahrscheinlich, da DTX-behandelte C57BL/6→C57BL/6 Knochenmarkchimären keine Auffälligkeiten zeigten. Darüber hinaus konnten qualitative Veränderungen des entzündlichen Geschehens durch die Toxinapplikation mittels histologischer Untersuchung des ZNS erkrankter Tiere ausgeschlossen werden.

Eine mögliche Erklärung für den Widerspruch zwischen den hier vorgelegten Ergebnissen und der in der Literatur beschriebenen pro-inflammatorischen Rolle dendritischer Zellen ist, dass dabei entweder speziell die Effektorphase der EAE untersucht wurde (Whartenby et al., 2005) oder bereits differenzierte, enzephalitogene T-Zellen zur Krankheitsinduktion eingesetzt wurden (Greter et al., 2005). Dies erlaubt jedoch keine Aussage über die Funktion dendritischer Zellen während der initialen Phase nach aktiver Immunisierung. Die Fähigkeit, autoimmune Neuroinflammation auch aktiv zu kontrollieren, verdeutlicht die Arbeit von Laouar et al., bei der die Inaktivierung

der Signalvermittlung von TGF- $\beta$  in dendritischen Zellen zu einer deutlich schwerer verlaufenden aktiven EAE führte (Laouar et al., 2008).

Der hier beschriebene vorzeitige Krankheitsbeginn zeigt, dass dendritische Zellen ihre immunregulatorischen Fähigkeiten während der initialen Phase der EAE-Pathogenese, die dem manifesten Krankheitsausbruch vorausgeht, ausüben. Die dieser Regulation zugrunde liegenden Mechanismen sind nicht zweifelsfrei identifiziert. Angesichts der pathophysiologisch zentralen Rolle des T-Zellkompartiments kann jedoch ein modulierendes Eingreifen in Aktivierung und Differenzierung naiver T-Zellen vermutet werden. Diese Prozesse spielen sich bei der aktiven EAE hauptsächlich in den sekundär lymphatischen Organen ab. In den ableitenden Lymphknoten zeigte sich nach Depletion dendritischer Zellen kurz vor Krankheitsausbruch eine verminderte Anzahl CD4<sup>+</sup> Th-Zellen. Zusammen mit der leicht erhöhten Fraktion aktivierter CD4<sup>+</sup> Th-Zellen im ZNS nach dem Auftreten klinischer Symptome ist dies ein Hinweis für eine beschleunigte T-Zell-Differenzierung und -ZNS-Migration in der Abwesenheit dendritischer Zellen.

Es ist bekannt, dass der Schweregrad der EAE in direkter Beziehung zu Anzahl und Differenzierung der CD4<sup>+</sup> Th-Zellen im ZNS steht, wobei die Gewebeschädigung durch Th17-Zellen am aggressivsten ist (Hofstetter et al., 2007). Auch in der hier vorliegenden Arbeit fand sich eine klare Korrelation zwischen klinischem Verlauf und Differenzierungstyp der CD4<sup>+</sup> Th-Zellen im ZNS erkrankter Tiere. So zeigten sich dort während der akuten Krankheitsphase vergleichbare Häufigkeiten von Leukozyten, CD4<sup>+</sup> Th- und CD8<sup>+</sup> zytotoxischen T-Zellen, unabhängig von der Präsenz dendritischer Zellen. Die Fraktionen pro-inflammatorischer Th1- und Th17-Zellen hingegen waren in der Abwesenheit dendritischer Zellen signifikant erhöht. Dies deckt sich mit der bereits zitierten Arbeit von Laouar et al., in der ebenfalls eine vermehrte ZNS-Infiltration von Th1- und Th-17-Zellen beobachtet wurde, wenn die Signalvermittlung von TGF- $\beta$  in dendritischen Zellen gestört war (Laouar et al., 2008).

### **5.2.2 Dendritische Zellen fördern Induktion und ZNS-Akkumulation von Treg-Zellen nach aktiver Immunisierung**

In den letzten Jahren konnte in zahlreichen Veröffentlichungen gezeigt werden, dass dendritische Zellen nicht nur durch ihre direkte Wirkung auf T-Effektorzellen, sondern auch durch die Interaktion mit Treg-Zellen zur Aufrechterhaltung der peripheren

Toleranz beitragen. Dabei sind sie in der Lage, Treg-Zellen zu induzieren (Luo et al., 2007; Yamazaki et al., 2007) und vermitteln möglicherweise auch deren anti-inflammatorischen Effekt (Tang et al., 2006). Weiterhin sind beide Zellpopulationen über eine Rückkoppelungsschleife eng miteinander verbunden, so dass der Abfall dendritischer Zellen auch zu einer gestörten Homöostase der Treg-Zellpopulation führt (Darrasse-Jèze et al., 2009). Im Modell der EAE wird Treg-Zellen, insbesondere den ins ZNS einwandernden Zellen, eine schützende Wirkung zugeschrieben (McGeachy et al., 2005). Dabei beobachtet man nach aktiver Immunisierung zunächst eine Expansion Myelin-spezifischer Treg-Zellen in den sekundär lymphatischen Organen und anschließend eine Akkumulation im ZNS (Korn et al., 2007b).

In der hier vorgelegten Arbeit wurde im autoimmun-entzündeten ZNS der Knochenmarkchimären ohne dendritische Zellen eine deutliche Verminderung FoxP3+ Treg-Zellen beobachtet. Da dies auf eine gestörte Proliferation von Treg-Zellen nach Immunisierung zurückzuführen sein könnte, erfolgte eine genauere Charakterisierung des regulatorischen T-Zellkompartimentes zu unterschiedlichen Zeitpunkten und in verschiedenen Organen. Bei fehlender Präsenz dendritischer Zellen war die Zahl FoxP3+ Treg-Zellen in der Milz und den drainierenden Lymphknoten bereits kurz nach der Immunisierung stark vermindert. Während der akuten Krankheitsphase fand sich dort zwar eine relative Anreicherung von FoxP3+ Treg-Zellen, was jedoch am ehesten durch die beschleunigte Abwanderung CD4+ T-Effektorzellen erklärt werden kann. Theoretisch wäre als Ursache aber auch eine gestörte Migration von Treg-Zellen aus den Lymphknoten in Folge der Depletion dendritischer Zellen denkbar. In der Milz und im ZNS von Tieren ohne dendritische Zellen fand sich zum Zeitpunkt der schwersten klinischen Manifestation, eine geringere Häufigkeit FoxP3+ Treg-Zellen. Zusammenfassend legt dies eine nicht-redundante Rolle dendritischer Zellen bei der Expansion induzierbarer Treg-Zellen nach aktiver Immunisierung nahe. Es ist anzunehmen, dass als Folge dieser gestörten Induktion konsekutiv auch die Anzahl der Treg-Zellen im Zielorgan der Autoimmunreaktion reduziert sind. Diese Hypothese wird gestützt durch Experimente, die im Anschluss an diese Promotionsarbeit in derselben Arbeitsgruppe durchgeführt wurden und bei denen sich eine reduzierte Induzierbarkeit von Treg-Zellen *in-vitro* nach Depletion dendritischer Zellen zeigte.

### 5.3 Dendritische Zellen fördern die T-Zellproliferation *in-vivo*

Angesichts des einzigartigen Potentials dendritischer Zellen zur Stimulation der T-Zellproliferation *in-vitro* (Nussenzweig und Steinman, 1980), stellte sich die Frage, wie es in der Abwesenheit genau jener Zellpopulation dennoch zu einer so aggressiv verlaufenden ZNS-Invasion von T-Zellen kommen kann.

Um die Proliferation MOG-spezifischer T-Zellen *in-vivo* zu untersuchen, erfolgte der Transfer CFSE-gefärbter CD4<sup>+</sup> 2d2 Splenozyten kurz vor der Immunisierung. In einer drei Tage später durchgeführten Analyse zeigte sich, dass die Depletion dendritischer Zellen während dieser initialen Krankheitsphase zu einer reduzierten Proliferation der transferierten T-Zellen in Lymphknoten und Milz führte. Dazu passend verfügten aus DTX-behandelten Tieren isolierte Antigen-präsentierende Zellen kurz vor Ausbruch der klinischen Erkrankung über eine verminderte Fähigkeit, naive MOG<sub>35-55</sub>-spezifische T-Zellen *in-vitro* zur Teilung anzuregen. Dieser Effekt war nicht Antigen-spezifisch, sondern wurde auch bei der Immunisierung mit OVA<sub>339-351</sub> beobachtet.

Interessanterweise fanden sich zu diesem Zeitpunkt dennoch vergleichbare Frequenzen von Th1- und Th17-Zellen in der Milz von Knochenmarkchimären beider Gruppen. Dies legt nahe, dass es in der Abwesenheit dendritischer Zellen zwar zu einer Einschränkung der T-Zellproliferation kommt, die Differenzierung von T-Effektorzellen jedoch nicht beeinträchtigt ist. Dafür sprechen auch von Jan Voß in unserer Arbeitsgruppe durchgeführte Versuche, die eine vergleichbare Induzierbarkeit von Th17-Zellen *in-vitro* unabhängig von der Präsenz dendritischer Zellen ergaben.

Ungeklärt bleibt jedoch, welche Antigen-präsentierende Zellpopulation in der Abwesenheit konventioneller dendritischer Zellen die Proliferation Myelin-spezifischer T-Zellen maßgeblich vermittelt. Mögliche Kandidaten sind in erster Linie B-Zellen und Makrophagen, da diese über die Fähigkeit zur stabilen Antigenpräsentation im MHC-II-Kontext bei gleichzeitiger Expression kostimulatorischer Moleküle verfügen (Murphy et al., 2008). Plasmazytoide dendritische Zellen werden zwar in dem hier verwendeten Tiermodell nicht depletiert, ihre Fähigkeit zur Stimulation enzephalitogener T-Zellen ist jedoch gering (Bailey et al., 2007; Irla et al., 2010).

## **5.4 Pro-inflammatorische Rolle dendritischer Zellen im Modell der Transfer-EAE**

Die pathophysiologische Bedeutung Antigen-präsentierender Zellen für die autoimmune Neuroinflammation wird durch die Tatsache verdeutlicht, dass in der Abwesenheit von MHC-II-Molekülen aufgrund fehlender T-Zellaktivierung und -Restimulation keine EAE auslösbar ist. Lokale ZNS-residente Zellen wie Astrozyten, Mikroglia und Endothelzellen exprimieren *in-vivo* kaum MHC-II und sind zur Krankheitsinduktion nicht in der Lage (Becher et al., 2006). Greter et al. konnten zeigen, dass die selektive Expression von MHC-II in dendritischen Zellen für die Auslösung der passiven EAE ausreichend ist (Greter et al., 2005). Außerdem sind aus dem ZNS von EAE-erkrankten Mäusen isolierte dendritische Zellen in ihrer Fähigkeit zur Stimulation naiver Myelin-spezifischer T-Zellen anderen Zellpopulationen wie Makrophagen und Mikroglia deutlich überlegen (McMahon et al., 2005). Vor allem die Subgruppe der myeloiden dendritischen Zellen kann dabei Myelinpeptide sehr effektiv präsentieren und aggressive, enzephalitogene Th17-Zellen induzieren (Bailey et al., 2007). Für diese Begünstigung der Differenzierung zu Th17-Zellen scheint die Aktivierung von TGF- $\beta$  durch dendritische Zellen entscheidend zu sein (Melton et al., 2010).

Diese Berichte über die zentrale Rolle dendritischer Zellen bei Induktion und Chronifizierung autoimmuner Neuroinflammation stehen in deutlichem Widerspruch zu den hier beobachteten immunmodulierenden Effekten dendritischer Zellen während aktiver EAE. Zumindest in Teilen ist diese Diskrepanz dadurch zu erklären, dass dabei das Modell der passiven EAE verwendet und meist nur die Effektorphase der Erkrankung im ZNS untersucht wurde (Greter et al., 2005; McMahon et al., 2005)

### **5.4.1 Dendritische Zellen verstärken klinischen Schweregrad und ZNS-Invasion enzephalitogener Th17-Zellen während Transfer-EAE**

Die Transfer-EAE wird durch Injektion bereits differenzierter, Myelin-spezifischer T-Effektorzellen in naive Tiere induziert. Dadurch werden die immunologischen Prozesse während des initialen Kontaktes zwischen T-Zellen und ihrem Antigen in den sekundär lymphatischen Organen umgangen. Um die Funktion dendritischer Zellen während der Effektorphase der EAE besser zu verstehen, erschien es sinnvoll, die Auswirkungen ihrer Depletion auch in diesem Modell zu untersuchen und mit den Experimenten nach aktiver Immunisierung zu vergleichen.



Interessanterweise zeigte sich dabei, wie in der Literatur beschrieben, ein pro-inflammatorischer Effekt dendritischer Zellen (Greter et al., 2005; McMahon et al., 2005). So erkrankten die Tiere mit einem intakten dendritischen Zellkompartiment deutlich schwerer. Die DTX-vermittelte Auslöschung dieser Zellen milderte dagegen den klinischen Verlauf ab und reduzierte die Erkrankungshäufigkeit.

Mittels intravitale Zweiphotonenmikroskopie konnte eine ausgeprägte Kollokalisierung und Interaktion dendritischer Zellen mit enzephalitogenen Th17-Zellen in aktiven EAE-Läsionen des Hirnstammes dokumentiert werden. Auch wurde ein aktives Abtasten der Ausläufer dendritischer Zellen durch die MOG<sub>35-55</sub>-spezifischen Th17-Zellen beobachtet. Diese Daten belegen, dass es im entzündeten ZNS *in-vivo* zu einer tatsächlichen Interaktion zwischen dendritischen Zellen und T-Zellen kommt und sie lassen vermuten, dass dies für die lokale Reaktivierung enzephalitogener Th17-Zellen von Bedeutung ist.

Korrelierend mit dem klinischen Schweregrad litten die Tieren, deren dendritische Zellen nicht ausgelöscht worden waren, unter einer vermehrten ZNS-Invasion von Myelin-spezifischen Th17-Zellen. Zusammen mit einem ebenfalls erhöhten Anteil an Th1-Zellen und einer Reduktion von Treg-Zellen zeigte sich bei ihnen eine deutliche Verschiebung zugunsten pro-inflammatorischer T-Effektorzellen. In der Milz dagegen waren die Th17-Zellen bei Vorhandensein dendritischer Zellen vermindert. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass dendritische Zellen durch lokale Reaktivierung die Migration enzephalitogener Th17-Zellen in das ZNS erleichtern können (Greter et al., 2005).

### **5.5 Duale Funktion dendritischer Zellen während autoimmuner Entzündung**

Die Ergebnisse der vorgelegten Arbeit lassen darauf schließen, dass dendritische Zellen in Abhängigkeit von Krankheitsphase und Organ (sekundär lymphatisches Gewebe vs. ZNS) in der Lage sind, unterschiedliche Funktionen auszuüben. So vermittelten dendritische Zellen während der initialen Phase der aktiven EAE, die die Differenzierung und Proliferation naiver T-Zellen in den peripheren lymphatischen Organen erfordert, einen schützenden Effekt. Ihre Abwesenheit führt hier zu einem deutlich aggressiveren, pro-inflammatorisch veränderten ZNS-Infiltrat und beeinträchtigt zusätzlich die Induktion von Treg-Zellen.

Dagegen führte die Präsenz dendritischer Zellen im Modell der Transfer-EAE zu einem

deutlich schwereren klinischen Verlauf und erleichterte die ZNS-Invasion bereits differenzierter, enzephalitogener Th17-Zellen. Diese pro-inflammatorische Wirkung während der Effektorphase autoimmuner Neuroinflammation entfalten dendritische Zellen vermutlich durch lokale Reaktivierung von T-Zellen im perivaskulären Raum des ZNS.

Die molekularen Mechanismen, durch die dendritische Zellen in der Lage sind, die Balance zwischen Th17- und Treg-Zellen zu modulieren, sind Gegenstand von Folgeprojekten und wurden in der vorliegenden Arbeit nicht vollkommen geklärt. Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten daraufhin, dass die Steuerung der T-Zelldifferenzierung der wahrscheinliche Effektormechanismus ist, der letztlich über klinischen Verlauf und entstehenden Gewebeschaden entscheidet.

Die Komplexität und Kontextabhängigkeit der Interaktion zwischen dendritischen Zellen und T-Zellkompartiment wird besonders am Beispiel der Treg-Zellen deutlich. So zeigten Pasare und Medzhitov, dass dendritische Zellen nach Aktivierung durch Pathogen-assoziierte Strukturen die anti-inflammatorische Wirkung von Treg-Zellen aufheben können. Interessanterweise war dazu die Produktion von IL-6 durch dendritische Zellen notwendig (Pasare und Medzhitov, 2003). Genau dieses Zytokin konnte später als relevanter Faktor für die Differenzierung von Th17-Zellen identifiziert werden (Bettelli et al., 2006b). Neben diesen immunogenen Fähigkeiten zur Hemmung von Treg- und zur Induktion von T-Effektorzellen verfügen dendritische Zellen aber auch über ein einzigartiges Potential zur Expansion von Treg-Zellen (Yamazaki et al., 2003).

Dendritische Zellen haben also eine herausgehobene pathophysiologische Bedeutung bei der Steuerung von T-Zellantworten. Dies verdeutlicht die Tatsache, dass die Wechselwirkung zwischen beiden Zellklassen zu peripherer Toleranz, protektiver Immunität aber auch autoimmuner Erkrankung führen kann. Trotz großer Fortschritte im Verständnis dieser Interaktion sind weitere Forschungsbemühungen notwendig. Dabei spielen transgene Mausmodelle eine wichtige Rolle, da mit ihrer Hilfe die *in-vivo*-Bedeutung distinkter Subpopulationen und ihrer molekularen Steuerungswege untersucht werden können. Ein Beispiel hierfür ist ein Mausstamm, der das Enzym Cre-Rekombinase unter dem CD11c-Promoter exprimiert. In Kombination mit anderen gentechnischveränderten Mausstämmen kann so die Funktion zahlreicher Signalwege

in dendritischen Zellen untersucht werden (Caton et al., 2007). So gelang es bereits nachzuweisen, dass die fehlende Aktivierung von TGF- $\beta$  durch dendritische Zellen zu einer Störung des regulatorischen T-Zellkompartiments und dem Ausbruch eines autoimmunen Syndroms führt (Travis et al., 2007).

### **5.6 Therapeutische Manipulation dendritischer Zellen**

Eine Vielzahl der therapeutischen Innovationen, die in den letzten Jahren erfolgreich aus der immunologischen Grundlagenforschung in die klinische Patientenversorgung übertragen werden konnten, basieren auf dem Einsatz von in B-Zellen produzierten Antikörpern. Dendritische Zellen hingegen sind ein vielversprechender Ansatzpunkt für die Entwicklung T-Zell-basierter therapeutischer Strategien (Steinman und Banchereau, 2007). Ihre immunogenen Fähigkeiten könnten zur Bekämpfung von Infektionen und malignen Neoplasien, ihre tolerogene Wirkung bei der Behandlung von Allergien, autoimmunen Erkrankungen oder der Transplantatabstoßung eingesetzt werden. Von der Entwicklung dieser Antigen-spezifischen Behandlungsansätze erhofft man sich eine spezifischere und dadurch nebenwirkungsärmere Wirkung. Derartige Therapien sind jedoch bisher hauptsächlich im Tiermodell erprobt worden und stehen noch nicht zur Behandlung humaner Erkrankungen zur Verfügung (Steinman und Banchereau, 2007).

Auch in der Multiple-Sklerose-Therapie ist kein speziell auf dendritische Zellen wirkendes Medikament verfügbar. Interessanterweise scheinen aber die beiden am häufigsten zur immunmodulatorischen Therapie der Multiplen Sklerose eingesetzten Medikamente, Interferon- $\beta$  und Glatirameracetat, auch über die Interaktion mit myeloischen, Antigen-präsentierenden Zellen zu wirken (Weber et al., 2007; Prinz et al., 2008).

Im Modell der EAE gibt es Berichte über eine erfolgreiche Behandlung durch die gezielte Manipulation dendritischer Zellen. So konnten Hirata et al. zeigen, dass dendritische Zellen, die neben dem MOG-Peptid auch das Apoptose-induzierende Molekül TRAIL exprimieren, den Krankheitsverlauf abmildern können (Hirata et al., 2005). Im Gegensatz zu diesem Antigen-spezifischen Ansatz erreichten Whartenby et al. eine Besserung bestehender neurologischer Defizite durch die allgemeine Reduktion dendritischer Zellen (Whartenby et al., 2005).

In dieser Arbeit fand sich, wie oben dargestellt, ein schützender Effekt dendritischer Zellen während der initialen Krankheitsphase der EAE. Eine Therapie der Multiplen

Sklerose zu einem so frühen Zeitpunkt ist jedoch nicht möglich, da diese Phase der klinischen Manifestation und damit der Diagnose vorausgeht. Interessanter im Hinblick auf mögliche Therapiestrategien ist die hier gefundene protektive Wirkung einer Depletion dendritischer Zellen während der Effektorphase der EAE. Ein Beispiel für eine gezielte therapeutisch genutzte Depletion einer Zellpopulation ist der Einsatz des monoklonalen Antikörpers Rituximab. Dieser richtet sich gegen das Oberflächenmolekül CD20 und führt dadurch zum Absterben von B-Zellen (Edwards und Cambridge, 2006). Rituximab wird nicht nur erfolgreich bei bestimmten rheumatischen Erkrankungen eingesetzt, sondern hat möglicherweise auch einen günstigen Effekt auf den Verlauf der Multiplen Sklerose (Hauser et al., 2008). Eine Gefahr derartiger Behandlungsstrategien ist jedoch das Auftreten einer starken Immunsuppression und konsekutiver Infektionen (Carson et al., 2009). Dies gilt es besonders vor dem Hintergrund zu bedenken, dass es bei dem hier verwendeten transgenen Mausmodell durch die Depletion dendritischer Zellen zu einer Beeinträchtigung der Immunität gegenüber einer Vielzahl von Erregern kommt (Bar-On und Jung, 2010). Auch der Langzeiteffekt einer Auslöschung dendritischer Zellen auf das Immunsystem ist unklar und kann im Mausmodell ein myelo-proliferatives Syndrom verursachen (Birnberg et al., 2008).

Die hier vorgelegten Ergebnisse demonstrieren die Fähigkeit dendritischer Zellen, die Balance zwischen Th17- und Treg-Zellen im Modell der EAE aktiv zu regulieren. Dabei zeigten dendritische Zellen eine von Krankheitsphase und Organ abhängige Modulation der T-Zelldifferenzierung, die mit dem Ausmaß der ZNS-Infiltration durch T-Effektorzellen bzw. Treg-Zellen sowie dem klinischen Schweregrad korrelierte. Die hier beobachteten schützenden und schädigenden Effekte dendritischer Zellen während autoimmuner Neuroinflammation verdeutlichen das Potential, aber auch die möglichen Risiken einer therapeutischen Manipulation dieser Zellpopulation.

## 6 Literaturverzeichnis

Anderson, M.S., E.S. Venanzi, L. Klein, Z. Chen, S.P. Berzins, S.J. Turley, H. von Boehmer, R. Bronson, A. Dierich, C. Benoist, and D. Mathis. 2002. Projection of an immunological self shadow within the thymus by the aire protein. *Science*. 298:1395-1401.

Bailey, S.L., B. Schreiner, E.J. McMahon, and S.D. Miller. 2007. CNS myeloid DCs presenting endogenous myelin peptides 'preferentially' polarize CD4+ T(H)-17 cells in relapsing EAE. *Nat. Immunol.* 8:172-180.

Banchereau, J., F. Briere, C. Caux, J. Davoust, S. Lebecque, Y.J. Liu, B. Pulendran, and K. Palucka. 2000. Immunobiology of dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.* 18:767-811.

Banchereau, J., and R.M. Steinman. 1998. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*. 392:245-252.

Bar-On, L., and S. Jung. 2010. Defining dendritic cells by conditional and constitutive cell ablation. *Immunol. Rev.* 234:76-89.

Becher, B., I. Bechmann, and M. Greter. 2006. Antigen presentation in autoimmunity and CNS inflammation: how T lymphocytes recognize the brain. *J. Mol. Med.* 84:532-543.

Belkaid, Y., and W. Chen. 2010. Regulatory ripples. *Nat. Immunol.* 11:1077-1078.

Bettelli, E., D. Baeten, A. Jäger, R.A. Sobel, and V.K. Kuchroo. 2006a. Myelin oligodendrocyte glycoprotein-specific T and B cells cooperate to induce a Devic-like disease in mice. *J. Clin. Invest.* 116:2393-2402.

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

Bettelli, E., T. Korn, M. Oukka, and V.K. Kuchroo. 2008. Induction and effector functions of T(H)17 cells. *Nature*. 453:1051-1057.

Bettelli, E., M. Pagany, H.L. Weiner, C. Linington, R.A. Sobel, and V.K. Kuchroo. 2003. Myelin oligodendrocyte glycoprotein-specific T cell receptor transgenic mice develop spontaneous autoimmune optic neuritis. *J. Exp. Med.* 197:1073-1081.

Birnberg, T., L. Bar-On, A. Sapozhnikov, M.L. Caton, L. Cervantes-Barragán, D. Makia, R. Krauthgamer, O. Brenner, B. Ludewig, D. Brockschneider, D. Riethmacher, B. Reizis, and S. Jung. 2008. Lack of conventional dendritic cells is compatible with normal development and T cell homeostasis, but causes myeloid proliferative syndrome. *Immunity*. 29:986-997.

Brocker, T., M. Riedinger, and K. Karjalainen. 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. *J. Exp. Med.* 185:541-550.

Buch, T., F.L. Heppner, C. Tertilt, T.J.A.J. Heinen, M. Kremer, F.T. Wunderlich, S. Jung, and A. Waisman. 2005. A Cre-inducible diphtheria toxin receptor mediates cell lineage ablation after toxin administration. *Nat. Methods*. 2:419-426.

Carson, K.R., A.M. Evens, E.A. Richey, T.M. Habermann, D. Focosi, J.F. Seymour, J. Laubach, S.D. Bawn, L.I. Gordon, J.N. Winter, R.R. Furman, J.M. Vose, A.D. Zelenetz, R. Mamtani, D.W. Raisch, G.W. Dorshimer, S.T. Rosen, K. Muro, N.R. Gottardi-Littell, R.L. Talley, O. Sartor, D. Green, E.O. Major, and C.L. Bennett. 2009. Progressive multifocal leukoencephalopathy after rituximab therapy in HIV-negative patients: a report of 57 cases from the Research on Adverse Drug Events and Reports project. *Blood*. 113:4834-4840.

Caton, M.L., M.R. Smith-Raska, and B. Reizis. 2007. Notch-RBP-J signaling controls the homeostasis of CD8- dendritic cells in the spleen. *J. Exp. Med.* 204:1653-1664.

Charcot, J. 1868. Histologie de la sclérose en plaque. *Gazette des Hôpitaux*. 41:554-566.

Colonna, M., G. Trinchieri, and Y. Liu. 2004. Plasmacytoid dendritic cells in immunity. *Nat. Immunol.* 5:1219-1226.

- Cools, N., P. Ponsaerts, V.F.I. Van Tendeloo, and Z.N. Berneman. 2007. Regulatory T cells and human disease. *Clin. Dev. Immunol.* 2007:89195.
- Cua, D.J., J. Sherlock, Y. Chen, C.A. Murphy, B. Joyce, B. Seymour, L. Lucian, W. To, S. Kwan, T. Churakova, S. Zurawski, M. Wiekowski, S.A. Lira, D. Gorman, R.A. Kastelein, and J.D. Sedgwick. 2003. Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature.* 421:744-748.
- Darrasse-Jèze, G., S. Deroubaix, H. Mouquet, G.D. Victora, T. Eisenreich, K. Yao, R.F. Masilamani, M.L. Dustin, A. Rudensky, K. Liu, and M.C. Nussenzweig. 2009. Feedback control of regulatory T cell homeostasis by dendritic cells in vivo. *J. Exp. Med.* 206:1853-1862.
- Domingues, H., M. Mues, H. Lassmann, H. Wekerle, and G. Krishnamoorthy. 2010. Functional and Pathogenic Differences of Th1 and Th17 Cells in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *PLOS ONE.* 5.
- Edwards, J.C.W., and G. Cambridge. 2006. B-cell targeting in rheumatoid arthritis and other autoimmune diseases. *Nat. Rev. Immunol.* 6:394-403.
- Farrar, J.D., H. Asnagli, and K.M. Murphy. 2002. T helper subset development: roles of instruction, selection, and transcription. *J. Clin. Invest.* 109:431-435.
- Ferber, I.A., S. Brocke, C. Taylor-Edwards, W. Ridgway, C. Dinisco, L. Steinman, D. Dalton, and C.G. Fathman. 1996. Mice with a disrupted IFN-gamma gene are susceptible to the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *J. Immunol.* 156:5-7.
- Fischer, H.G., and G. Reichmann. 2001. Brain dendritic cells and macrophages/microglia in central nervous system inflammation. *J. Immunol.* 166:2717-2726.
- Galea, I., I. Bechmann, and V.H. Perry. 2007. What is immune privilege (not)? *Trends Immunol.* 28:12-18.
- Gold, R., C. Linington, and H. Lassmann. 2006. Understanding pathogenesis and therapy of multiple sclerosis via animal models: 70 years of merits and culprits in

experimental autoimmune encephalomyelitis research. *Brain*. 129:1953-1971.

Goverman, J. 2009. Autoimmune T cell responses in the central nervous system. *Nat Rev Immunol*. 9:393-407.

Greter, M., F.L. Heppner, M.P. Lemos, B.M. Odermatt, N. Goebels, T. Laufer, R.J. Noelle, and B. Becher. 2005. Dendritic cells permit immune invasion of the CNS in an animal model of multiple sclerosis. *Nat. Med.* 11:328-334.

Haak, S., A.L. Croxford, K. Kreyenborg, F.L. Heppner, S. Pouly, B. Becher, and A. Waisman. 2009. IL-17A and IL-17F do not contribute vitally to autoimmune neuroinflammation in mice. *J. Clin. Invest.* 119:61-69.

Hafler, D.A. 2004. Multiple sclerosis. *J. Clin. Invest.* 113:788-794.

Haines, J.L., M. Ter-Minassian, A. Bazyk, J.F. Gusella, D.J. Kim, H. Terwedow, M.A. Pericak-Vance, J.B. Rimmler, C.S. Haynes, A.D. Roses, A. Lee, B. Shaner, M. Menold, E. Seboun, R.P. Fitoussi, C. Gartioux, C. Reyes, F. Ribierre, G. Gyapay, J. Weissenbach, S.L. Hauser, D.E. Goodkin, R. Lincoln, K. Usuku, and J.R. Oksenberg. 1996. A complete genomic screen for multiple sclerosis underscores a role for the major histocompatibility complex. The Multiple Sclerosis Genetics Group. *Nat. Genet.* 13:469-471.

Hart, D.N., and J.W. Fabre. 1981. Demonstration and characterization of Ia-positive dendritic cells in the interstitial connective tissues of rat heart and other tissues, but not brain. *J. Exp. Med.* 154:347-361.

Hauser, S.L., E. Waubant, D.L. Arnold, T. Vollmer, J. Antel, R.J. Fox, A. Bar-Or, M. Panzara, N. Sarkar, S. Agarwal, A. Langer-Gould, and C.H. Smith. 2008. B-cell depletion with rituximab in relapsing-remitting multiple sclerosis. *N. Engl. J. Med.* 358:676-688.

Hawiger, D., R.F. Masilamani, E. Bettelli, V.K. Kuchroo, and M.C. Nussenzweig. 2004. Immunological unresponsiveness characterized by increased expression of CD5 on peripheral T cells induced by dendritic cells in vivo. *Immunity*. 20:695-705.

Heath, W.R., and F.R. Carbone. 2001. Cross-presentation, dendritic cells, tolerance and immunity. *Annu. Rev. Immunol.* 19:47-64.



- Helmchen, F., and W. Denk. 2002. New developments in multiphoton microscopy. *Current Opinion in Neurobiology*. 12:593-601.
- Heppner, F.L., M. Greter, D. Marino, J. Falsig, G. Raivich, N. Hövelmeyer, A. Waisman, T. Rülcke, M. Prinz, J. Priller, B. Becher, and A. Aguzzi. 2005. Experimental autoimmune encephalomyelitis repressed by microglial paralysis. *Nat. Med.* 11:146-152.
- Hirata, S., S. Senju, H. Matsuyoshi, D. Fukuma, Y. Uemura, and Y. Nishimura. 2005. Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis by transfer of embryonic stem cell-derived dendritic cells expressing myelin oligodendrocyte glycoprotein peptide along with TRAIL or programmed death-1 ligand. *J. Immunol.* 174:1888-1897.
- Hofstetter, H.H., K.V. Toyka, M. Tary-Lehmann, and P.V. Lehmann. 2007. Kinetics and organ distribution of IL-17-producing CD4 cells in proteolipid protein 139-151 peptide-induced experimental autoimmune encephalomyelitis of SJL mice. *J. Immunol.* 178:1372-1378.
- Hori, S., T. Nomura, and S. Sakaguchi. 2003. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science*. 299:1057-1061.
- Hsieh, C.S., S.E. Macatonia, C.S. Tripp, S.F. Wolf, A. O'Garra, and K.M. Murphy. 1993. Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages. *Science*. 260:547-549.
- Hu, D., K. Ikizawa, L. Lu, M.E. Sanchirico, M.L. Shinohara, and H. Cantor. 2004. Analysis of regulatory CD8 T cells in Qa-1-deficient mice. *Nat. Immunol.* 5:516-523.
- Huang, Y.M., B.G. Xiao, V. Ozenci, M. Kouwenhoven, N. Teleshova, S. Fredrikson, and H. Link. 1999. Multiple sclerosis is associated with high levels of circulating dendritic cells secreting pro-inflammatory cytokines. *J. Neuroimmunol.* 99:82-90.
- Huseby, E.S., D. Liggitt, T. Brabb, B. Schnabel, C. Ohlén, and J. Goverman. 2001. A pathogenic role for myelin-specific CD8(+) T cells in a model for multiple sclerosis. *J. Exp. Med.* 194:669-676.
- Irla, M., N. Küpfer, T. Suter, R. Lissilaa, M. Benkhoucha, J. Skupsky, P.H. Lalive, A. Fontana, W. Reith, and S. Hugues. 2010. MHC class II-restricted antigen presentation

by plasmacytoid dendritic cells inhibits T cell-mediated autoimmunity. *J. Exp. Med.* 207:1891-1905.

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

Jung, S., D. Unutmaz, P. Wong, G. Sano, K. De los Santos, T. Sparwasser, S. Wu, S. Vuthoori, K. Ko, F. Zavala, E.G. Pamer, D.R. Littman, and R.A. Lang. 2002. In vivo depletion of CD11c(+) dendritic cells abrogates priming of CD8(+) T cells by exogenous cell-associated antigens. *Immunity.* 17:211-220.

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

Korn, T., E. Bettelli, W. Gao, A. Awasthi, A. Jäger, T.B. Strom, M. Oukka, and V.K. Kuchroo. 2007a. IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory T(H)17 cells. *Nature.* 448:484-487.

Korn, T., J. Reddy, W. Gao, E. Bettelli, A. Awasthi, T.R. Petersen, B.T. Bäckström, R.A. Sobel, K.W. Wucherpfennig, T.B. Strom, M. Oukka, and V.K. Kuchroo. 2007b. Myelin-specific regulatory T cells accumulate in the CNS but fail to control autoimmune inflammation. *Nat. Med.* 13:423-431.

Korn, T., E. Bettelli, M. Oukka, and V.K. Kuchroo. 2009. IL-17 and Th17 Cells. *Annu. Rev. Immunol.* 27:485-517.

Krishnamoorthy, G., H. Lassmann, H. Wekerle, and A. Holz. 2006. Spontaneous opticospinal encephalomyelitis in a double-transgenic mouse model of autoimmune T cell/B cell cooperation. *J. Clin. Invest.* 116:2385-2392.

Lahl, K., C. Loddenkemper, C. Drouin, J. Freyer, J. Arnason, G. Eberl, A. Hamann, H. Wagner, J. Huehn, and T. Sparwasser. 2007. Selective depletion of Foxp3+ regulatory T cells induces a scurfy-like disease. *J. Exp. Med.* 204:57-63.

Langrish, C.L., Y. Chen, W.M. Blumenschein, J. Mattson, B. Basham, J.D. Sedgwick, T.

- McClanahan, R.A. Kastelein, and D.J. Cua. 2005. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J. Exp. Med.* 201:233-240.
- Laouar, Y., T. Town, D. Jeng, E. Tran, Y. Wan, V.K. Kuchroo, and R.A. Flavell. 2008. TGF-beta signaling in dendritic cells is a prerequisite for the control of autoimmune encephalomyelitis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105:10865-10870.
- Lassmann, H., W. Brück, and C.F. Lucchinetti. 2007. The immunopathology of multiple sclerosis: an overview. *Brain Pathol.* 17:210-218.
- Le Gros, G., S.Z. Ben-Sasson, R. Seder, F.D. Finkelman, and W.E. Paul. 1990. Generation of interleukin 4 (IL-4)-producing cells in vivo and in vitro: IL-2 and IL-4 are required for in vitro generation of IL-4-producing cells. *J. Exp. Med.* 172:921-929.
- Legge, K.L., R.K. Gregg, R. Maldonado-Lopez, L. Li, J.C. Caprio, M. Moser, and H. Zaghouani. 2002. On the role of dendritic cells in peripheral T cell tolerance and modulation of autoimmunity. *J. Exp. Med.* 196:217-227.
- Li, H., G. Zhang, Y. Chen, H. Xu, D.C. Fitzgerald, Z. Zhao, and A. Rostami. 2008. CD11c+CD11b+ dendritic cells play an important role in intravenous tolerance and the suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol.* 181:2483-2493.
- Lighvani, A.A., D.M. Frucht, D. Jankovic, H. Yamane, J. Aliberti, B.D. Hissong, B.V. Nguyen, M. Gadina, A. Sher, W.E. Paul, and J.J. O'Shea. 2001. T-bet is rapidly induced by interferon-gamma in lymphoid and myeloid cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98:15137-15142.
- Luche, H., O. Weber, T. Nageswara Rao, C. Blum, and H.J. Fehling. 2007. Faithful activation of an extra-bright red fluorescent protein in "knock-in" Cre-reporter mice ideally suited for lineage tracing studies. *Eur. J. Immunol.* 37:43-53.
- Luo, X., K.V. Tarbell, H. Yang, K. Pothoven, S.L. Bailey, R. Ding, R.M. Steinman, and M. Suthanthiran. 2007. Dendritic cells with TGF-beta1 differentiate naive CD4+CD25- T cells into islet-protective Foxp3+ regulatory T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104:2821-2826.
- Mackay, R.P., and N.C. Myrianthopoulos. 1966. Multiple sclerosis in twins and their

relatives. *Arch. Neurol.* 15:449-462.

Matzinger, P. 2007. Friendly and dangerous signals: is the tissue in control? *Nat. Immunol.* 8:11-13.

McGeachy, M.J., L.A. Stephens, and S.M. Anderton. 2005. Natural recovery and protection from autoimmune encephalomyelitis: contribution of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory cells within the central nervous system. *J. Immunol.* 175:3025-3032.

McMahon, E.J., S.L. Bailey, C.V. Castenada, H. Waldner, and S.D. Miller. 2005. Epitope spreading initiates in the CNS in two mouse models of multiple sclerosis. *Nat. Med.* 11:335-339.

Melton, A.C., S.L. Bailey-Bucktrout, M.A. Travis, B.T. Fife, J.A. Bluestone, and D. Sheppard. 2010. Expression of  $\alpha\beta 8$  integrin on dendritic cells regulates Th17 cell development and experimental autoimmune encephalomyelitis in mice. *J. Clin. Invest.* 120:4436-4444.

Menges, M., S. Rössner, C. Voigtländer, H. Schindler, N.A. Kukutsch, C. Bogdan, K. Erb, G. Schuler, and M.B. Lutz. 2002. Repetitive injections of dendritic cells matured with tumor necrosis factor alpha induce antigen-specific protection of mice from autoimmunity. *J. Exp. Med.* 195:15-21.

Mosmann, T.R., H. Cherwinski, M.W. Bond, M.A. Giedlin, and R.L. Coffman. 1986. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J. Immunol.* 136:2348-2357.

Murphy, K.M., P. Travers, and M. Walport. 2008. *Janeway's Immunobiology*. 7. ed. Taylor & Francis.

Nussenzweig, M.C., and R.M. Steinman. 1980. Contribution of dendritic cells to stimulation of the murine syngeneic mixed leukocyte reaction. *J. Exp. Med.* 151:1196-1212.

Ohnmacht, C., A. Pullner, S.B.S. King, I. Drexler, S. Meier, T. Brocker, and D. Voehringer. 2009. Constitutive ablation of dendritic cells breaks self-tolerance of CD4 T cells and results in spontaneous fatal autoimmunity. *J. Exp. Med.* 206:549-559.

Park, H., Z. Li, X.O. Yang, S.H. Chang, R. Nurieva, Y. Wang, Y. Wang, L. Hood, Z. Zhu,

- Q. Tian, and C. Dong. 2005. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat. Immunol.* 6:1133-1141.
- Pasare, C., and R. Medzhitov. 2003. Toll pathway-dependent blockade of CD4+CD25+ T cell-mediated suppression by dendritic cells. *Science.* 299:1033-1036.
- Pashenkov, M., Y.M. Huang, V. Kostulas, M. Haglund, M. Söderström, and H. Link. 2001. Two subsets of dendritic cells are present in human cerebrospinal fluid. *Brain.* 124:480-492.
- Pette, M., K. Fujita, B. Kitze, J.N. Whitaker, E. Albert, L. Kappos, and H. Wekerle. 1990. Myelin basic protein-specific T lymphocyte lines from MS patients and healthy individuals. *Neurology.* 40:1770-1776.
- Prinz, M., H. Schmidt, A. Mildner, K. Knobloch, U. Hanisch, J. Raasch, D. Merkler, C. Detje, I. Gutcher, J. Mages, R. Lang, R. Martin, R. Gold, B. Becher, W. Brück, and U. Kalinke. 2008. Distinct and nonredundant in vivo functions of IFNAR on myeloid cells limit autoimmunity in the central nervous system. *Immunity.* 28:675-686.
- Quah, B.J.C., H.S. Warren, and C.R. Parish. 2007. Monitoring lymphocyte proliferation in vitro and in vivo with the intracellular fluorescent dye carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester. *Nat Protoc.* 2:2049-2056.
- Reis e Sousa, C. 2006. Dendritic cells in a mature age. *Nat. Rev. Immunol.* 6:476-483.
- Rissoan, M.C., V. Soumelis, N. Kadowaki, G. Grouard, F. Briere, R. de Waal Malefyt, and Y.J. Liu. 1999. Reciprocal control of T helper cell and dendritic cell differentiation. *Science.* 283:1183-1186.
- Rivers, T.M., D.H. Sprunt, and G.P. Berry. 1933. OBSERVATIONS ON ATTEMPTS TO PRODUCE ACUTE DISSEMINATED ENCEPHALOMYELITIS IN MONKEYS. *J. Exp. Med.* 58:39-53.
- Sakaguchi, S., N. Sakaguchi, M. Asano, M. Itoh, and M. Toda. 1995. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J. Immunol.* 155:1151-1164.
- Sapozhnikov, A., J.A.A. Fischer, T. Zaft, R. Krauthgamer, A. Dzionek, and S. Jung. 2007.

Organ-dependent in vivo priming of naive CD4+, but not CD8+, T cells by plasmacytoid dendritic cells. *J. Exp. Med.* 204:1923-1933.

Sapozhnikov, A., and S. Jung. 2008. Probing in vivo dendritic cell functions by conditional cell ablation. *Immunol. Cell Biol.* 86:409-415.

Serafini, B., B. Rosicarelli, R. Magliozzi, E. Stigliano, E. Capello, G.L. Mancardi, and F. Aloisi. 2006. Dendritic cells in multiple sclerosis lesions: maturation stage, myelin uptake, and interaction with proliferating T cells. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 65:124-141.

Shortman, K., and S.H. Naik. 2007. Steady-state and inflammatory dendritic-cell development. *Nat. Rev. Immunol.* 7:19-30.

Siffrin, V., A.U. Brandt, J. Herz, and F. Zipp. 2007. New insights into adaptive immunity in chronic neuroinflammation. *Adv. Immunol.* 96:1-40.

Siffrin, V., H. Radbruch, R. Glumm, R. Niesner, M. Paterka, J. Herz, T. Leuenberger, S.M. Lehmann, S. Luenstedt, J.L. Rinnenthal, G. Laube, H. Luche, S. Lehnardt, H. Fehling, O. Griesbeck, and F. Zipp. 2010a. In vivo imaging of partially reversible th17 cell-induced neuronal dysfunction in the course of encephalomyelitis. *Immunity.* 33:424-436.

Siffrin, V., J. Vogt, H. Radbruch, R. Nitsch, and F. Zipp. 2010b. Multiple sclerosis - candidate mechanisms underlying CNS atrophy. *Trends Neurosci.*

Sospedra, M., and R. Martin. 2005. Immunology of multiple sclerosis. *Annu. Rev. Immunol.* 23:683-747.

Steinman, R.M., and J. Banchereau. 2007. Taking dendritic cells into medicine. *Nature.* 449:419-426.

Steinman, R.M., D. Hawiger, and M.C. Nussenzweig. 2003. Tolerogenic dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.* 21:685-711.

Stromnes, I.M., L.M. Cerretti, D. Liggitt, R.A. Harris, and J.M. Goverman. 2008. Differential regulation of central nervous system autoimmunity by T(H)1 and T(H)17 cells. *Nat. Med.* 14:337-342.

- Szabo, S.J., S.T. Kim, G.L. Costa, X. Zhang, C.G. Fathman, and L.H. Glimcher. 2000. A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell*. 100:655-669.
- Tang, Q., J.Y. Adams, A.J. Tooley, M. Bi, B.T. Fife, P. Serra, P. Santamaria, R.M. Locksley, M.F. Krummel, and J.A. Bluestone. 2006. Visualizing regulatory T cell control of autoimmune responses in nonobese diabetic mice. *Nat. Immunol.* 7:83-92.
- Targoni, O.S., J. Baus, H.H. Hofstetter, M.D. Hesse, A.Y. Karulin, B.O. Boehm, T.G. Forsthuber, and P.V. Lehmann. 2001. Frequencies of neuroantigen-specific T cells in the central nervous system versus the immune periphery during the course of experimental allergic encephalomyelitis. *J. Immunol.* 166:4757-4764.
- Teitelbaum, D., A. Meshorer, T. Hirshfeld, R. Arnon, and M. Sela. 1971. Suppression of experimental allergic encephalomyelitis by a synthetic polypeptide. *Eur. J. Immunol.* 1:242-248.
- Trapp, B.D., J. Peterson, R.M. Ransohoff, R. Rudick, S. Mörk, and L. Bö. 1998. Axonal transection in the lesions of multiple sclerosis. *N. Engl. J. Med.* 338:278-285.
- Travis, M.A., B. Reizis, A.C. Melton, E. Masteller, Q. Tang, J.M. Proctor, Y. Wang, X. Bernstein, X. Huang, L.F. Reichardt, J.A. Bluestone, and D. Sheppard. 2007. Loss of integrin alpha(v)beta8 on dendritic cells causes autoimmunity and colitis in mice. *Nature*. 449:361-365.
- Urich, E., I. Gutcher, M. Prinz, and B. Becher. 2006. Autoantibody-mediated demyelination depends on complement activation but not activatory Fc-receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103:18697-18702.
- Vaknin-Dembinsky, A., K. Balashov, and H.L. Weiner. 2006. IL-23 is increased in dendritic cells in multiple sclerosis and down-regulation of IL-23 by antisense oligos increases dendritic cell IL-10 production. *J. Immunol.* 176:7768-7774.
- Viglietta, V., C. Baecher-Allan, H.L. Weiner, and D.A. Hafler. 2004. Loss of Functional Suppression by CD4+CD25+ Regulatory T Cells in Patients with Multiple Sclerosis. *The Journal of Experimental Medicine*. 199:971 -979.
- Weber, M.S., T. Prod'homme, S. Youssef, S.E. Dunn, C.D. Rundle, L. Lee, J.C. Patarroyo, O. Stüve, R.A. Sobel, L. Steinman, and S.S. Zamvil. 2007. Type II

monocytes modulate T cell-mediated central nervous system autoimmune disease. *Nat. Med.* 13:935-943.

Whartenby, K.A., P.A. Calabresi, E. McCadden, B. Nguyen, D. Kardian, T. Wang, C. Mosse, D.M. Pardoll, and D. Small. 2005. Inhibition of FLT3 signaling targets DCs to ameliorate autoimmune disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102:16741-16746.

Williams, M.A., and M.J. Bevan. 2007. Effector and memory CTL differentiation. *Annu. Rev. Immunol.* 25:171-192.

Wing, K., and S. Sakaguchi. 2010. Regulatory T cells exert checks and balances on self tolerance and autoimmunity. *Nat. Immunol.* 11:7-13.

Yamazaki, S., A.J. Bonito, R. Spisek, M. Dhodapkar, K. Inaba, and R.M. Steinman. 2007. Dendritic cells are specialized accessory cells along with TGF- for the differentiation of Foxp3+ CD4+ regulatory T cells from peripheral Foxp3 precursors. *Blood.* 110:4293-4302.

Yamazaki, S., T. Iyoda, K. Tarbell, K. Olson, K. Velinzon, K. Inaba, and R.M. Steinman. 2003. Direct expansion of functional CD25+ CD4+ regulatory T cells by antigen-processing dendritic cells. *J. Exp. Med.* 198:235-247.

Yednock, T.A., C. Cannon, L.C. Fritz, F. Sanchez-Madrid, L. Steinman, and N. Karin. 1992. Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis by antibodies against alpha 4 beta 1 integrin. *Nature.* 356:63-66.

Zaft, T., A. Sapozhnikov, R. Krauthgamer, D.R. Littman, and S. Jung. 2005. CD11c<sup>high</sup> dendritic cell ablation impairs lymphopenia-driven proliferation of naive and memory CD8<sup>+</sup> T cells. *J. Immunol.* 175:6428-6435.

Zheng, W., and R.A. Flavell. 1997. The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells. *Cell.* 89:587-596.

Zhou, L., J.E. Lopes, M.M.W. Chong, I.I. Ivanov, R. Min, G.D. Victora, Y. Shen, J. Du, Y.P. Rubtsov, A.Y. Rudensky, S.F. Ziegler, and D.R. Littman. 2008. TGF-beta-induced Foxp3 inhibits T(H)17 cell differentiation by antagonizing RORgamma<sup>t</sup> function. *Nature.* 453:236-240.

Zhu, J., H. Yamane, and W.E. Paul. 2010. Differentiation of effector CD4 T cell



## Literaturverzeichnis

populations (\*). *Annu. Rev. Immunol.* 28:445-489.

Zozulya, A.L., B.D. Clarkson, S. Ortler, Z. Fabry, and H. Wiendl. 2010. The role of dendritic cells in CNS autoimmunity. *J. Mol. Med.* 88:535-544.

## Abkürzungsverzeichnis

AIRE	engl.: autoimmune regulator – autoimmuner Regulator
APC	engl.: antigen-presenting cell – Antigen-präsentierende Zelle
BSA	bovines Serumalbumin
CD	engl.: cluster of differentiation – Unterscheidungsmerkmale
CFA	komplettes Freudsches Adjuvans
CFSE	Carboxyfluoreszein-diazetatsuccinimidylester
CNS	engl.: central nervous system – zentrales Nervensystem
CTLA-4	engl.: cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 – zytotoxisches T-Lymphozyten Antigen 4
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribinukleinsäure
DTX	Diphtherietoxin
EAE	experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis
FACS	engl.: fluorescence activated cell sorting - Durchflusszytometrie
FCS	fetales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FoxP3	engl.: forkhead-box-protein P3
FSC	engl.: forward scatter - Vorwärtsstreulicht
g	Gravitationskraft
GFP	engl.: green fluorescent protein – grün fluoreszierendes Protein
Gy	Gray
HE	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HLA	humanes Leukozyten Antigen
IFN	Interferon
i.v.	intravenös
IL	Interleukin
IMDM	Iscove´s Mod Dulbecco´s Medium
LFB	Luxol-Fast-Blue-Färbung
LN	engl.: lymph node - Lymphknoten
m	murin
mg	Milligramm
ml	Milliliter
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter

## Abkürzungsverzeichnis

MACS	engl.: magnet associated cell sorting – magnetbasiertes Zellsortierungssystem
MHC	engl.: major histocompatibility complex - Hauptgewebeverträglichkeitskomplex
MOG	Myelin Oligodendrozyten Glykoprotein
n	Anzahl
OVA	Ovalbumin
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PE	Phycoerithricin
PerCp	Peridin Chlorophyl Protein
PFA	Paraformaldehyd
RORyt	engl.: RAR-related orphan receptor gamma
RNS	Ribonukleinsäure
rpm	engl.: revolutions per minute – Umdrehungen pro Minute
RPMI	Rosewell Park Memorial Institute Medium
SA	Streptavidin
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
SSC	engl.: side scatter - Seitwärtsstreulicht
tdRFP	engl.: tandem-dimer red fluorescent protein – Tandem-Dimer rot fluoreszierendes Protein
TGF	engl.: transforming growth factor – transformierender Wachstumsfaktor
TNF	Tumornekrosefaktor
Th	T-Helferzelle
Tr1	engl.: type 1 T regulatory cell – Typ 1 regulatorische T-Zelle
Treg	regulatorische T-Zelle
U	engl.: unit - Einheit
VLA-4	engl.: very-late-Antigen-4
wt	Wildtyp
ZNS	zentrales Nervensystem

## **Tierschutz**

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

Genehmigungsnummer für Tierversuche G0090-09 vom 13.07.2009

Tötungsnummer: T0271-08

## **Danksagung**

Sehr herzlich möchte ich mich bei meiner Doktormutter Prof. Frauke Zipp für die uneingeschränkte Förderung, kontinuierliche Anregung und freundliche Überlassung des Themas bedanken.

Besonderer Dank gebührt Volker Siffrin, der diese Arbeit von Anfang an mit seiner fachlichen Expertise und einem hohen Maß an Verlässlichkeit begleitet und so erst in dieser Form ermöglicht hat. Die von Kollegialität und Offenheit geprägte Zusammenarbeit mit ihm habe ich sehr genossen und sie hat einen maßgeblichen Anteil an meiner anhaltenden Begeisterung für die experimentelle Neuroimmunologie.

Weiterhin möchte ich Magda Paterka, Natalie Asselborn, Josephine Herz, Thordis Hohnstein, Tina Leuenberger und Helena Radbruch für ihre großartige Hilfsbereitschaft danken. Ihre tatkräftige Anleitung bei meinen ersten Gehversuchen in der Laborarbeit waren für mich ebenso wertvoll, wie das sich bald darauf entwickelnde freundschaftliche und humorvolle Miteinander.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, ihre Unterstützung war stets bedingungslos und das in mich gesetzte Vertrauen groß.

## **Lebenslauf**

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

## Publikationsliste

Radbruch, H., Siffrin, V., Brandt, A.U., Herz, J., Boldakowa, N., Leuenberger, T., **Werr, J.**, Hahner, A., Schulze-Topphoff, U., Nitsch, R., and Zipp, F. (2009). Differential immune cell dynamics in the CNS cause CD4+ T cell compartmentalization. *Brain* 132, 1247-1258.

**Werr, J.\***, Siffrin, V.\* , Voss, 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 Erstautoren) *eingereicht*

## **Eidstattliche Erklärung**

Ich, Johannes Werr, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Identifizierung schützender und schädigender Effekte dendritischer Zellen in zwei Tiermodellen der Multiplen Sklerose“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Ich habe mich anderwärts nicht um einen Doktorgrad beworben und besitze keinen entsprechenden Doktorgrad.

Mir ist die dem Verfahren zugrunde liegende Promotionsordnung bekannt.

Berlin, den 20.06.2011

Johannes Werr