

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

DISSERTATION

Wie erkennen Lymphozyten das Gehirn?

Analyse des Bewegungsmusters der CD4+ und CD8+T-Zellen
im Rahmen der Antigenerkennung
im nichtentzündeten Hirngewebe

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät

Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Nadiezda Grohmann

aus Penza

Gutachter/in: 1. Prof. Dr. med. F. Zipp
 2. Prof. Dr. med. H.-D. Volk
 3. Priv.-Doz. Dr. D. Merkler

Datum der Promotion: 03.06.2012

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	7
1 EINLEITUNG UND ZIELSTELLUNG.....	10
1.1 Grundzüge der zellulären Immunität.....	10
1.1.1 Antigen-präsentierende Zellen	11
1.1.2 Haupthistokompatibilitätskomplex.....	11
1.1.3 Die T-Zell-vermittelte Immunität	13
1.2 Immunprivileg des Zentralen Nervensystems	18
1.3 MS als autoimmune Erkrankung	19
1.3.1 Der MS-Plaques	20
1.3.2 Die Rolle der T-Zellen	20
1.3.3 Migration der T-Zellen im ZNS.....	22
1.3.4 T-Zell-vermittelte ZNS-Entzündung	25
1.3.5 Degenerative Prozesse	25
1.4 Aktuellen Therapiemöglichkeiten.....	25
1.5 Ziel der Arbeit.....	27
2 MATERIAL UND METHODEN	29
2.1 Laborartikel.....	29
2.1.1 Puffer, Lösungen, Zellkultur- und Hirnschnittkulturmedien	29
2.1.2 Interleukine	30
2.1.3 Peptide	31
2.1.4 Fluorochrome für die Zwei-Photonen Mikroskopie	31
2.1.5 Antikörper und Sekundärfarbstoffe	31
2.1.6 Sonstige Reagenzien und Chemikalien	32
2.1.7 Kunststoffartikel	33
2.1.8 Verwendete Software	33
2.1.9 Geräte.....	33
2.2 Tiermodelle	34
2.2.1 C57BL/6	34

2.2.2	Ovalbumin als Modellantigen	34
2.3	T-Zell-Hirnschnitt Kokultur	35
2.3.1	Prinzip.....	35
2.3.2	Akute Hippokampusschnitte.....	35
2.3.3	Chronische Hippokampusschnitte	36
2.4	Zellbiologische Methoden	36
2.4.1	Zellgewinnung	37
2.4.2	Generierung der OVA spezifischen CD4+ und CD8+T-Zellen	38
2.4.3	Färbung.....	38
2.4.4	Proliferationsassay.....	38
2.5	Magnetische Zellsortierung.....	39
2.5.1	Prinzip.....	39
2.5.2	CD4+ und CD8+ Zellsortierung.....	39
2.6	Durchflusszytometrie	39
2.6.1	Prinzip.....	39
2.6.2	Oberflächenfärbung	40
2.6.3	Intrazelluläre Färbung.....	40
2.6.4	Lebend-Tod-Färbung	41
2.7	Zwei-Photonen Mikroskopie	42
2.7.1	Prinzip.....	42
2.7.2	Aufbau	44
2.7.3	Messung am Zwei-Photonen Mikroskop.....	45
3	ERGEBNISSE.....	46
3.1	T-Zellen.....	46
3.1.1	OT1 Zellen.....	46
3.1.2	OT2 Zellen.....	47
3.2	Bewegungsparameter der T-Zellen	47
3.2.1	Geschwindigkeit	48
3.2.2	Entfernungsrate.....	48

3.2.3	Abweichungsindex	48
3.2.4	Bewertung der Zellbewegung.....	49
3.3	Bewegungsmuster der T-Zellen im ZNS.....	49
3.3.1	CD8+T-Zellen.....	49
3.3.2	CD4+T-Zellen.....	51
3.4	Antigenerkennung im ZNS.....	53
3.4.1	Spezifisches Antigen.....	53
3.4.2	Unspezifisches Antigen	58
3.4.3	Kreuzreaktivität der OT1 Zellen.....	67
3.4.4	Proteinantigen	68
3.5	Mechanismen der Antigenpräsentation im ZNS	71
3.5.1	Brefeldin A und OT1 Zellen	71
3.6	OT1 CD8+T-Zellen und neuronaler Tod	73
4	DISKUSSION.....	75
4.1	Antigenerkennung und Migration	76
4.1.1	T-Zell-Stop-Signal	77
4.2	Mechanismen der Antigenpräsentation im ZNS	78
4.2.1	Antigenpräsentation an die CD8+T-Zellen im ZNS	79
4.2.2	Antigenpräsentation an die CD4+T-Zellen im ZNS	84
4.3	Die Auswirkungen der T-Zell-Antigen-Interaktion im ZNS und ihre Bedeutung für die Multiple Sklerose.....	84
	ZUSAMMENFASSUNG.....	87
	LITERATURVERZEICHNIS.....	88
	LEBENS LAUF	104
	DANKSAGUNG	105

PUBLIKATIONSLISTE..... 106

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG 107

Abkürzungsverzeichnis

2PM	Zwei Photonen Mikroskopie
AAD	7-Aminoactinomycin D
ACSF	<i>engl.: artificial cerebrospinal fluid</i> - künstlicher Liquor cerebrospinalis
APZ	Antigen präsentierende Zelle
APC	Allophycocyanin
AS	Aminosäure
BDNF	<i>engl.: brain derived neurotrophic factor</i> - vom Gehirn stammender Wachstumsfaktor
BSA	Bovines Serumalbumin
CD	<i>engl.: cluster of differentiation</i> - Unterscheidungsgruppen
CFSE	Carboxyfluoreszein-diazetatsuccinimidylester
CMTMR	5-(und-6)-(((4-chloromethyl)benzoyl)amino)tetramethylrhodamin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
EAE	experimentelle autoimmune Enzephalitis
FACS	<i>engl.: fluorescence activated cell sorting</i> - Durchflusszytometrie
FCS	Fetales Kälber Serum <i>engl.: fetal calf serum</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSC	<i>engl.: forward scatter</i> -Vorwärtsstreulicht
g	Gravitationskraft
GA	Glatiramerazetat
HLA	Humanes Leukozyten Antigen
i.v.	intravenös

IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IMDM	<i>Iscove's Mod Dulbecco's Medium</i>
MB	magnetische Mikropartikel
MHC	engl. <i>major histocompatibility complex</i> - Hauptgewebeverträglichkeitskomplex
MOG	Myelin Oligodendrozyten Glykoprotein
N	Anzahl
NA	Numerische Apertur
NaCl	Natriumchlorid
NF-κB	nukleärer Faktor κB
NGF	engl.: <i>nerve growth factor</i> - Nervenwachstumsfaktor
NT3	engl.: <i>neurotrophin-3</i> - Neurotrophin
OT	Mausstamm mit für Ovalbumin transgenem T-Zellrezeptor
OVA	Ovalbumin
PBS	engl.: <i>phosphate buffered saline</i> - Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PE	Phycoerithrin
PerCp	Peridin Chlorophyl Protein
PFA	Paraformaldehyd
PI	Propidiumiodid
PMA	Phorbol 12-Myristat 13-Acetat
RPMI	Rosewell Park Memorial Institute Medium
s	Sekunde
SEM	engl.: <i>standard error of the mean</i> - Standardfehler des Mittelwerts

SSC	<i>engl.: side scatter</i> - Seitwärtsstreulicht
TZR	T-Zellrezeptor
Tc	zytotoxische T-Zelle
TGF	<i>engl.: transforming growth factor</i> – transformierender Wachstumsfaktor
Th	T-Helferzelle
TNF	Tumornekrosefaktor
Treg	regulatorische T-Zelle
Ts	Supressorische T-Zelle
U	Einheit
v	Geschwindigkeit
W	Watt
ZNS	Zentrales Nervensystem
α -m	anti murin

1 Einleitung und Zielstellung

Multiple Sklerose

Die Multiple Sklerose (MS) ist eine chronisch-entzündliche Erkrankung des Zentralen Nervensystems. Mit dem durchschnittlichen Manifestationsalter zwischen dem 20. und 40. Lebensjahr gilt die MS als die häufigste Ursache der Behinderung im jungen Erwachsenenalter nicht-traumatischer Genese in Ländern der westlichen Zivilisation. Die klinische Erscheinung der MS ist durch die sensiblen, motorischen, autonomen und neurokognitiven Ausfälle des Nervensystems gekennzeichnet. Der Krankheitsverlauf ist sehr variabel und das Spektrum reicht von einem einzigen Schub ohne neurologisches Defizit bis zur raschen, fortschreitenden Behinderung. Je nach klinischem Verlauf werden die schubförmige, die primär chronisch-progrediente und die sekundär chronisch-progrediente Form der MS unterschieden [Lublin and Reingold 1996]. In der Ätiologie spielen sowohl die genetischen als auch die Umweltfaktoren eine Rolle. Die Prävalenz der Multiplen Sklerose schwankt zwischen 60-200/100.000 in Nord-Europa, Australien, Neuseeland und Nord-Amerika und 6-20/100.000 in den Gebieten mit einem geringem Erkrankungsrisiko in Äquatornähe. Für die genetische Prädisposition spricht höhere Prävalenz der MS unter Familienmitgliedern mit dem höchsten Wert zwischen monozygotischen Zwillingen (ca. 30%). Es wurde jedoch kein einfacher Vererbungsmodus nachgewiesen, sodass man bei der MS von einer polygen bedingten Erkrankung ausgeht [Dyment *et al.* 2004]. Die Rolle der epigenetischen Mechanismen in der HLA(*human leukocyte Antigen*)-Region wird diskutiert, was die Einflüsse der Umweltfaktoren auf die genetische Suszeptibilität zeigt [Ramagopalan *et al.* 2008]. Zusammengefasst sprechen zahlreiche klinische und epidemiologische Befunde für eine multifaktorielle Genese der MS. Die positive Assoziation mit bestimmten HLA-Allelen und Mutationen in den immunrelevanten Rezeptoren bei den MS Kranken verdeutlichen die Rolle des Immunsystems. Die individuelle Fähigkeit des ZNS Gewebes zur Regeneration entscheidet nicht zuletzt über das Ausmaß und die Qualität der ZNS-Entzündung und bestimmt den klinischen Verlauf (Übersicht in [Sospedra and Martin 2005]).

1.1 Grundzüge der zellulären Immunität

Das Immunsystem erkennt Pathogene, Zellen, Fremdkörper und Substanzen durch zelluläre und humorale Abwehrmechanismen, die sich funktionell ergänzen. Dabei wird zwischen der natürlichen unspezifischen Immunabwehr und der erworbenen spezifischen Immunität

unterschieden. Den Hauptbestandteil der angeborenen Immunabwehr bilden die Leukozyten. Die erworbene Immunität basiert auf Lymphozyten. Die erworbene Immunität und angeborene Immunabwehr unterstützen sich gegenseitig bei der Bekämpfung der Pathogene. Die Erforschung der Immunvorgänge zeigte, dass das Immunsystem von einem Gleichgewicht proinflammatorischer und regulatorischer Prozesse abhängig ist, um die Immunabwehr zu gewährleisten ohne gleichzeitig körpereigene Strukturen nachhaltig zu schädigen. An dem Beispiel einer Autoimmunkrankheit wie Multiple Sklerose wird deutlich, dass eine falsch gerichtete bzw. fehlregulierte Immunantwort eine verheerende Wirkung haben kann. Die genaue Kenntnis der zellulären und humoralen Abläufe im Rahmen immunpathologischer Vorgänge ist daher unentbehrlich für die Entwicklung einer gezielten Therapie.

1.1.1 Antigen-präsentierende Zellen

Alle kernhaltigen Zellen exprimieren auf ihrer Oberfläche MHC-Moleküle, welche die Abbauprodukte des kompletten zellulären Proteinkatabolismus in Form von Peptiden präsentieren. Somit haben fast alle Körperzellen die Fähigkeit zur Antigenpräsentation. Jedoch nur die professionellen Antigen-präsentierenden Zellen (APZ) sind in der Lage, die T-Zellen zu aktivieren und eine spezifische Immunabwehr einzuleiten. Zu den professionellen APZ werden die dendritischen Zellen, Makrophagen und B-Zellen gezählt. Die APZ werden durch die Gefahrensignale aktiviert und präsentieren die Peptide auf den MHC-Molekülen zusammen mit den kostimulierenden Molekülen wie CD80, CD86 und CD40. Die naiven T-Zellen, die in diesem Kontext präsentierte Antigene erkennen, werden aktiviert und entwickeln sich zu Effektorzellen. Die reifen dendritischen Zellen sind die potentesten Stimulatoren der naiven T-Zellen. Außer der antigenpräsentierenden Funktion können die APZ die Immunantwort modulieren und die T-Zell-Aktivität supprimieren, was für die periphere Toleranz eine Bedeutung hat (Übersicht bei [Janeway Immunologie 2009]).

1.1.2 Haupthistokompatibilitätskomplex

Die MHC-Moleküle sind Glykoproteine, die von einer großen Gruppe von Genen, dem Haupthistokompatibilitätskomplex (*engl.: MHC, Major Histocompatibility Complex*), auf dem Chromosom 6 kodiert werden. Die Hauptaufgabe der MHC-Moleküle ist, die Antigene zu binden und auf der Zelloberfläche zu präsentieren. Die MHC-I Moleküle werden fast auf allen kernhaltigen Zellen exprimiert. Dagegen kommen die MHC-II Moleküle fast ausschließlich

auf den professionellen APZ vor. Die im Rahmen einer Immunantwort freigesetzten Zytokine (insbesondere Interferone) regulieren die Expression der MHC-Moleküle. Die Peptid bindenden Stellen beider MHC-Moleküle sind hochpolymorph. Die MHC-I Moleküle binden acht bis zehn Aminosäuren (AS) lange Peptide. Bindung längerer Peptiden wurde aber ebenfalls beobachtet [Horig *et al.* 1999]. Die bindungsrelevanten Reste des Peptids werden Verankerungsreste genannt und entscheiden über die Bindung an ein bestimmtes MHC-I Molekül. Das bedeutet, dass ein einziges MHC-I Molekül ein breites Spektrum verschiedener Peptide binden kann. Peptide, die an MHC-II Moleküle binden, sind im Durchschnitt 10-20 AS lang.

Die T-Zellen erkennen ihr spezifisches Antigen ausschließlich in Assoziation mit einem bestimmten MHC-Molekül, was auch als MHC-Restriktion bezeichnet wird [Janeway Immunologie 2009].

1.1.2.1 Klassischer MHC-Klasse I Präsentationsweg

Die MHC-Klasse I Moleküle präsentieren die Peptide aus Proteinen, die im Zytosol abgebaut werden und stimulieren die CD8+T-Zellen. Der Abbau der Proteine im Zytosol erfolgt in einem multikatalytischen Proteasekomplex dem sog. Proteasom. Die im Proteasom abgebauten Peptide werden über einen spezialisierten Transporter TAP, *transporter associated with antigen processing*, in das endoplasmatische Retikulum geschleust (ER) und dort auf die MHC-I Moleküle geladen. Die Peptid beladenen MHC-I Moleküle vervollständigen ihre Faltung und werden an die Zelloberfläche transportiert (Übersicht bei [Janeway Immunologie2009]).

1.1.2.2 Klassischer MHC-Klasse II Präsentationsweg

Die MHC-II-Moleküle präsentieren hauptsächlich die Peptide aus dem extrazellulären Raum und stimulieren die CD4+T-Zellen. Die über Phagozytose oder Makropinozytose aufgenommenen Proteine werden in sauren Endosomen proteolytisch gespalten und anschließend auf die MHC-II Moleküle geladen. Der genauer Mechanismus und Zellkompartiment der Peptidbeladung der MHC-II Moleküle ist noch nicht vollständig geklärt [Villadangos und Ploegh 2000].

1.1.2.3 Kreuzpräsentation

Die Aufnahme der exogenen Proteine und ihre Präsentation auf den MHC-I Molekülen wird als Kreuzpräsentation bezeichnet und wurde bisher als eine spezielle Eigenschaft der professionellen APZ erachtet. Die Kreuzpräsentation ermöglicht, über den MHC-I-Weg u.a. eine direkte zytotoxische Immunantwort gegen Viren und Tumorzellen einzuleiten (Übersicht bei [Yewdell *et al.* 1999]).

Die Kreuzpräsentation kann auf verschiedenen Wegen erfolgen. Zum einen können die internalisierten Proteine aus dem Endosom ins Zytosol geschleust werden und dort über den klassischen MHC-I-Weg (Proteasom- und TAP-abhängig) prozessiert und präsentiert werden [Kovacsovic-Bankowski und Rock 1995]. Eine weitere Möglichkeit bietet eine direkte Beladung der MHC-I Moleküle mit den internalisierten Peptiden im endosomalen-lysosomalen Kompartiment, was TAP/Proteasom unabhängig abläuft [Pfeifer *et al.* 1993]. Desweiteren wurde ein spezielles Zellkompartiment sog. Ergosom, der eine Fusion aus ER und Phagosom darstellt, beschrieben. In diesem Kompartiment könnte ebenfalls eine effektive Bindung der internalisierten exogenen Peptide an die MHC-I Moleküle stattfinden [Guermontprez *et al.* 2003].

1.1.3 Die T-Zell-vermittelte Immunität

T-Lymphozyten sind die Schlüsselemente der adaptiven, erworbenen Immunabwehr. Sie erkennen hochspezifisch ein pathogenes Agens und sind in der Lage, ein immunologisches Gedächtnis zu generieren, was bei erneutem Kontakt mit dem gleichem Agens eine schnellere und effektivere Immunantwort ermöglicht.

Die Spezifität der T-Zell-vermittelten Immunantwort ist u.a. dadurch bedingt, dass die T-Zellen nur Antigene erkennen, die auf Oberflächen der körpereigenen Zellen präsentiert werden. Dabei müssen die präsentierten Antigene an die MHC-Moleküle gebunden sein. Die reifen T-Zellen, die ihrem Antigen noch nie begegnet sind, werden als naive T-Zellen bezeichnet. Für die Teilnahme an einer adaptiven Immunreaktion muss eine naive T-Zelle ihr Antigen auf einem MHC-Molekül erkennen (Signal 1) und gleichzeitig ein kostimulierendes Signal auf der Antigen präsentierenden Zelle empfangen (Signal 2) [Janeway Immunologie2009].

1.1.3.1 Die naiven T-Zellen

Die reifen naiven CD4⁺ und CD8⁺T-Zellen pendeln zwischen Blutkreislauf und Lymphorganen. Das lymphatische Gewebe erreichen sie über die postkapillären Venulen mit hohem Endothel (*engl.*: HEV *high endothelial venules*). Dort durchmustern sie täglich tausende MHC-Peptid-Komplexe auf APZ was die positive Selektion durch Selbst-MHC-Erkennung verstärkt und die Überlebenssignale an die T-Zellen vermittelt. Die T-Zellen, die ihrem Antigen nicht begegnen, wandern zurück in das periphere Blut. Erkennt die T-Zelle ihr spezifisches Antigen auf der APZ, wird ihre Wanderung beendet und es folgen klonale Vermehrung und Differenzierung der naiven T-Zelle zu der bewaffneten Effektorzelle. Die bewaffneten Effektorzellen verlassen anschließend das lymphatische Gewebe und wandern zu dem Infektionsherd.

Naive T-Zellen sind durch Expression von verschiedenen Oberflächenmarkern charakterisiert. So sind L-Selektin (CD62L) und der CC-Chemokinrezeptor 7 (CCR-7) für das Auffinden der Lymphknoten verantwortlich. Dagegen fehlen auf den naiven T-Zellen die Aktivierungsmarker wie z.B. CD69(ein Lektin, auch *VEA*: *very early antigen* genannt), CD25, die α -Kette des Interleukin-2-Rezeptors, und CD95L(Fas-Ligand) sowie Wanderungsmarker wie z.B. CD44 (Übersicht in [Janeway Immunologie2009]).

1.1.3.2 Aktivierung von T-Zellen

Für die Entstehung der bewaffneten Effektor-T-Zellen werden zwei Signale benötigt, die räumlich und zeitlich koordiniert ablaufen. Das erste Signal entsteht durch die Bindung des T-Zell-Rezeptors und seiner Korezeptoren CD4 oder CD8 an den Peptid-MHC-Komplex. Das zweite, kostimulierende Signal erfolgt über die Bindung der B7-Moleküle (CD80 und CD86) der APZ an das CD28 Molekül auf der T-Zelle und führt zu einer klonalen Vermehrung der naiven T-Zellen. Das kostimulierende Signal muss dabei von derselben Antigen präsentierenden Zelle ausgesandt werden, die das Antigen präsentiert hat. Diese koordinierte Wechselwirkung ist bereits nach wenigen Stunden ausreichend, um die Proliferation und Programmierung zu einer T-Effektorzelle auszulösen. Die T-Zelle tritt in die G1 Phase des Zellzyklus ein und induziert die Synthese von Interleukin-2 (IL-2) und der α -Kette des Interleukin-2-Rezeptors (CD25), wodurch ein hoch affiner IL-2-Rezeptor entsteht. Das Interleukin-2 wirkt autokrin und löst eine starke Proliferation und Differenzierung der naiven T-Zellen zu den Effektorzellen aus. Die aktivierten T-Zellen exprimieren weitere Proteine wie

CD40 Ligand (CD154) und 4-1BB, die für die klonale Vermehrung und Differenzierung sorgen. Die aktivierten proliferierenden T-Zellen entwickeln sich nach 4-5 Tagen zu den bewaffneten T-Effektorzellen. Die Effektorzellen benötigen keine kostimulierenden Signale mehr und können direkt ihre Zielzelle angreifen. Im Vergleich zu naiven T-Zellen reicht eine viel geringere Antigendichte und -menge aus, um die Effektorzellen zu aktivieren. Desweiteren exprimieren die Effektorzellen Adhäsionsmoleküle wie LFA-1 (*lymphocyte function-associated antigen 1*), CD2 Moleküle sowie Integrin VLA-4 (*very late antigen-4*), was ihnen eine stärkere Bindung an die Zielzelle und Migration zu dem Entzündungsort ermöglicht [Janeway Immunologie2009]. Die Terminierung der T-Zell-Reaktion wird u.a. über die Expression des CTLA-4 Moleküls (engl. *cytotoxic T-lymphocyte antigen 4*) vermittelt, das an die B7 Moleküle bindet und eine weitere Proliferation aktivierter T-Zellen hemmt [Walunas *et al.* 1994].

1.1.3.3 Die CD8+T-Zellen

Die aktivierten CD8+T-Zellen entwickeln sich zu den zytotoxischen T-Zellen und erkennen ihr Antigen im Kontext der MHC-I Moleküle. Begegnen die CD8+Effektorzellen ihrem Antigen, sezernieren sie zytotoxische Moleküle, die zu dem programmierten Zelltod der Zielzelle führen. Die Apoptose der Zielzellen kann dabei auf verschiedenen Wegen induziert werden. Die von den CD8+ Effektorzellen sezernierten Perforine (engl. *pore forming protein*) bilden Poren in der Membran der Zielzelle. Die in den intrazellulären Granula gespeicherten Serinproteasen, sog. Granzyme (engl. *granula associated enzymes*), gelangen durch die Poren ins Zellinnere und lösen über Kaspase-Aktivierung eine Apoptose der Zielzelle aus. Auch unabhängig von Perforin können Granzyme in die Zielzelle gelangen und in einem Kaspase-unabhängigen Weg den Zelltod induzieren (Übersicht bei [Smyth *et al.* 2001]). Bindung des Fas-Liganden (CD95L), der auf aktivierten CD8+T-Zellen und auch auf Th1-Zellen exprimiert wird, an das Fas(CD95) Molekül auf den Zielzellen bewirkt ebenfalls eine Kaspase-Aktivierung und anschließende Apoptose der Zielzellen. Ferner sezernieren die CD8+T-Zellen eine Reihe von Zytokinen wie Interferon- γ , TNF- α und TNF- β , die der Infektionsabwehr dienen. So hemmt Interferon- γ direkt die virale Replikation und stimuliert die Präsentation viraler Peptide auf den MHC-I Molekülen [Schroder *et al.* 2004]. Eine Untergruppe der zytotoxischen CD8+T-Zellen, so genannte Tc2-Zellen, ist durch ihre vermehrte Interleukin-4 und geringe Interferon- γ Expression charakterisiert. Diese IL-4 produzierenden CD8+T-Zellen dienen vor allem als Helferzellen für B-Zell-vermittelte

Immunglobulin Produktion und zeigen kaum zytotoxische Aktivität [Maggi *et al.* 1994]. Über die suppressorische Wirkung der CD8+T-Zellen (Ts-Zellen) ist bisher wenig bekannt. Im Unterschied zu den regulatorischen CD4+T-Zellen sind die Ts-Zellen antigenspezifisch und entfalten ihre suppressorische Wirkung über einen direkten Zellkontakt [Smith and Kumar 2008].

Die aktivierten CD8+T-Zellen teilen sich mindestens fünf bis neun Mal, wobei eine aktivierte CD8+T-Zelle viele Zielzellen abtöten kann. Die Aktivierung von CD8+T-Zellen ist deshalb strikt reguliert und erfordert eine direkte oder indirekte Hilfe von T-Helferzellen (Übersicht bei [Janeway Immunologie2009]).

1.1.3.4 CD4+T-Zellen

CD4+T-Zellen exprimieren als Korezeptor das CD4 Molekül und erkennen mit ihrem T-Zellrezeptor Antigene im Kontext der MHC-II Moleküle. Die Expression der MHC-II-Moleküle ist auf professionelle APZ beschränkt. Die Hauptaufgabe der CD4+T-Zellen ist, die Immunantwort zu koordinieren, was über unterschiedliche Mechanismen geschehen kann. Je nach Differenzierung, die sich u.a. an ihrer Zytokin-Expression bestimmen lässt, werden die CD4+T-Zellen in mehrere Gruppen eingeteilt. Auf der molekularen Ebene ist hierbei ein jeweils für die Untergruppe spezifischer Transkriptionsfaktor von Bedeutung. Die Unterteilung in die Th1 und Th2 Zellen [Mosmann *et al.* 1986] spiegelt jeweils die extremen Reaktionsverhältnisse wider und sollte deshalb als eine Vereinfachung betrachtet werden. In der letzten Zeit wurde eine neue eigenständige Untergruppe, die Th17 -Zellen, beschrieben und ihre Beteiligung an den autoimmunen Prozessen intensiv erforscht [Harrington *et al.* 2005]. Seit der Erstbeschreibung der CD4+CD25+Foxp3+T-Zellen, die eine starke regulatorische Aktivität aufweisen, stehen auch die regulatorischen CD4+T-Zellen im Mittelpunkt der Forschung [Sakaguchi *et al.* 1995].

Die Differenzierung in einen der Zelltypen erfolgt im Anfangsstadium der Immunreaktion. Dabei spielen die lokalen Zytokine, Art der Erreger, sowie die Menge und genaue Sequenz des antigenen Peptids eine Rolle [Janeway Immunologie2009].

Je nach Erreger wird die Immunantwort von einer der T-Zell-Subpopulation dominiert. So werden die intrazellulären Erreger, wie z.B. *Leishmania major*, von Th1-Zellen erfolgreich bekämpft [Scott *et al.* 1988]. Gegen Parasiten, wie zum Beispiel Würmer, ist eine Th2-Antwort notwendig [Urban, Jr. *et al.* 1991]

1.1.3.4.1 Th1-Zellen

Wenn in der frühen Phase der Immunantwort die Zytokine wie Interleukin (IL)-12, IFN γ , TNF α überwiegen, kommt es zu einer Th1 gerichteten zellulären Abwehrreaktion [Seder *et al.* 1993]. Über die Sekretion von IFN γ vermitteln die Th1 Zellen eine starke Aktivierung der Makrophagen und fördern ihre Ausbildung zu potenten Fresszellen. Die aktivierten Makrophagen verstärken ihrerseits die Th1-Zellantwort über vermehrte IL-12 Produktion. Weiterhin werden die zytotoxischen T-Zellen aktiviert und die B-Zellen zum Klassenwechsel angeregt, die daraufhin opsonierende Antikörper synthetisieren. Die von Th1-Zellen sezernierten Zytokine fördern somit die Entzündungsreaktion und werden als proinflammatorische Zytokine bezeichnet. Sie dienen der Bekämpfung von intrazellulären Bakterien und Virusinfektionen. Für die Differenzierung der CD4+T-Zellen zu den Th1-Zellen ist der Transkriptionsfaktor T-bet notwendig [Szabo *et al.* 2000]. Sowohl Th1- als auch Th2-Zellen inhibieren die Differenzierung des jeweils anderen Subtyps. So hemmen IL-12 und Interferon- γ die Ausbildung von Th2-Zellen und IL-4 die Differenzierung von Th1-Zellen [Fernandez-Botran *et al.* 1988].

1.1.3.4.2 Th2

Das IL-4 und IL-6 vermitteln die Differenzierung der aktivierten CD4+T-Zellen zu den Th2 Zellen. Der dafür entscheidende Transkriptionsfaktor ist GATA-3 [Hofer *et al.* 2002]. Die Th2-Zellen spielen eine wichtige Rolle in der humoralen Immunantwort und sind durch die Produktion von Zytokinen wie TNF- β , IL-4, IL-5, IL-10 und IL-13 charakterisiert. Die Th2 Zellen aktivieren die B-Zellen und regen die Bildung von neutralisierenden Antikörperklassen an. Das von den Th2 Zellen sezernierte IL-10 ist ein wichtiger Überlebensfaktor für die B-Zellen und fördert ihre Differenzierung [Rousset *et al.* 1992].

1.1.3.4.3 Th17

Kennzeichnend für die Th17-Zellen ist die Produktion des Zytokins IL-17. Ähnlich wie Th1-Zellen gehören die Th17 zu den proinflammatorischen Zellen, die vor allem im Rahmen der chronischen Entzündungen auftreten [Infante-Duarte *et al.* 2000]. Die Produktion des IL-17 wird u.a. durch Interleukin-23 induziert [Aggarwal *et al.* 2003]. IL-23 wird von den aktivierten dendritischen Zellen und Makrophagen sezerniert und induziert die Proliferation der IL-17- produzierenden CD4+T-Zellen [Langrish *et al.* 2005]. Weitere Zytokine wie TGF β und auch IL-6 sind für die Th17 Entwicklung essentiell [Veldhoen *et al.* 2006]. Die

Entdeckung des Transkriptionsfaktors ROR γ T, der die Entwicklung der CD4⁺T-Zellen zu Th17 Zellen steuert, führte zu Erkennung der Th17 Zellpopulation als eigenständige Untergruppe [Ivanov *et al.* 2006]. Die Th1 bzw. Th2 Zytokine wie IFN- γ und IL-4, hemmen die Entwicklung von Th17-Zellen, während diese Zytokine auf bereits differenzierte Th17-Zellen keinen Einfluss haben [Harrington *et al.*, 2005].

1.1.3.5 Gedächtniszellen

Das außerordentliche Merkmal des adaptiven Immunsystems ist sein Gedächtnis. Dank der Gedächtniszellen kommt es bei erneutem Kontakt dieser Zellen mit ihrem Antigen zu einer schnelleren und wirksameren Immunantwort. Im Gegensatz zu naiven Zellen sind die Gedächtniszellen unmittelbar nach dem Antigenkontakt in der Lage, ihre Effektorfunktionen zu entwickeln. Die Mechanismen der Ausbildung des immunologischen Gedächtnisses sind immer noch weitgehend unklar. Bei B-Zellen spielen die langlebigen Plasmazellen oder B-Gedächtniszellen eine Rolle [Dorner and Radbruch 2005]. Die meisten Antigen-spezifischen T-Zellen sterben durch aktivierungsinduzierten Tod nachdem sie Ihre Effektorfunktion erfüllt haben [Baumann *et al.* 2002]. Die überlebenden spezifischen Zellen bilden das sog. T-Zellgedächtnis [Sallusto and Lanzavecchia 2000]. Es wurde gezeigt, dass die Gedächtniszellen sich aus Effektorzellen entwickeln können [Lohning *et al.* 2008].

1.2 Immunprivileg des Zentralen Nervensystems

Das Zentrale Nervensystem ist ein hoch differenziertes Gewebe und besteht aus vorwiegend nicht mehr regenerationsfähigen Zellen, sodass jede Immunreaktion einen irreparablen Schaden anrichten kann. Aus immunologischer Sicht gehört das ZNS zu den sog. immunprivilegierten Organen, was durch mehrere physiologische und anatomische Aspekte begründet ist. Bereits Paul Ehrlich beobachtete, dass das ZNS durch die sog. Blut-Hirn-Schranke, die nur selektiv für bestimmte Moleküle durchlässig ist, von dem peripheren Milieu getrennt ist [Ehrlich 1885]. Ferner wurde die immunologische Sonderstellung des ZNS durch die Experimente von Medawar unterstützt. Er zeigte, dass direkt ins Gehirn eingepflanzte Fremdtransplantate keine Immunantwort induzieren, jedoch eine periphere Stimulation mit diesem Fremdgewebe eine Abstoßungsreaktion auch im ZNS einleiten kann [Medawar P 1948]. Die histologischen Untersuchungen zeigten, dass hoch spezialisierten Endothelzellen der Hirngefäße eng über *tight junctions* miteinander verbunden und nur für bestimmte Moleküle durchlässig sind [Hickey 2001]. Das Fehlen der lymphatischen Gefäße und kaum

nachweisbare MHC-I und MHC-II Expression auf ZNS Zellen unterstrichen das Immunprivileg des ZNS [Joly *et al.* 1991] [Joly and Oldstone 1992] [Lampson 1995]. Die Erforschung der Immunpathogenese der ZNS-Erkrankungen zeigte jedoch schnell, dass das ZNS sich keineswegs der Kontrolle des Immunsystems entzieht. Die Immunzellen können die Blut-Hirn-Schranke passieren und patrouillieren das ZNS nicht nur im Rahmen einer Entzündungsreaktion, sondern auch im Normalzustand [Wekerle *et al.* 1987] [Hickey *et al.* 1991]. Der Eintritt der Immunzellen ins ZNS kann auf drei Wegen geschehen: über den Plexus choroideus, über den subarachnoidalen Raum (engl. *subarachnoidal space SAS*) und über den perivaskulären Raum (sog. Virchow-Robin Raum) [Ransohoff *et al.* 2003]. Über die Hirnnerven ist das ZNS mit den peripheren lymphatischen Organen verbunden, was eine begrenzte Drainage der ZNS-Antigene in die Peripherie ermöglicht [Cserr and Knopf 1992] [Goldmann *et al.* 2006]. Das ZNS unterliegt somit einer strikten Immunüberwachung, bei einer streng regulierten MHC-Expression (Übersicht bei [Becher *et al.* 2006]). Eine fehlerhafte Immunregulation in diesem feinbalancierten System kann erheblichen Schaden anrichten, was am Beispiel der Multiplen Sklerose deutlich wird.

1.3 MS als autoimmune Erkrankung

Die MS wird als eine T-Zell vermittelte Autoimmunerkrankung angesehen, die sich auf dem Boden einer genetischen Prädisposition und unter dem Einfluss der Umweltfaktoren entwickelt [Hohlfeld 1997]. Die Präsenz der autoreaktiven T-Zellen ist ein Bestandteil eines gesunden Immunsystems [Genain *et al.* 1994]. Ferner sind die ZNS-Antigen spezifischen T-Zellen an den wichtigen Prozessen wie Wundheilung, Angiogenese, Neuroprotektion und Neurogenese im gesunden ZNS beteiligt [Ziv *et al.* 2006]. Die Entwicklung einer pathologischen Autoimmunität kann zum einen durch eine gestörte Immunregulation mit Verlust der Selbsttoleranz und zum anderen durch einen exogenen Triggermechanismus wie Infektion zustande kommen. Das infektiöse Agens kann dabei über strukturelle Ähnlichkeit mit dem ZNS-Peptid, sog. molekulare Mimikry, die enzephalitogenen T-Zellen aktivieren oder über *bystander activation* eine Immunreaktion gegen ZNS-Gewebe in Gang setzen [Steinman *et al.* 2002] [Lang *et al.* 2002]. Die genaue Ätiologie der Erkrankung bleibt jedoch nach wie vor ungeklärt.

1.3.1 Der MS-Plaques

Die erste umfassende histologische und klinische Beschreibung der Multiplen Sklerose erfolgte durch Charcot 1868, der der Erkrankung den Namen *sclerose en plaque* gab [Charcot JM 1868]. Als pathologisches Markenzeichen der disseminiert auftretenden MS-Läsionen gilt die fokale Demyelinisierung mit einem unterschiedlich stark ausgeprägten axonalen Verlust. Diese fokale Entmarkung wird von der entzündlichen Immunreaktion mit der Beteiligung der CD4+ und CD8+T-Zellen, weniger B-Zellen, Plasmazellen und einer verstärkten Aktivierung der Makrophagen und Mikroglia begleitet. Die MS-Läsionen können im gesamten ZNS auftreten. Bestimmte Regionen wie der Sehnerv, der Hirnstamm, die weiße Substanz des Rückenmarks, das Kleinhirn und die periventrikuläre weiße Substanz sind aber bevorzugt betroffen [Lucchinetti *et al.* 2000].

1.3.2 Die Rolle der T-Zellen

Die meisten Erkenntnisse über die Pathogenese der MS wurden aus den Untersuchungen an dem von Rivers erstmals beschriebenen Tiermodell der MS EAE (engl. *EAE experimental autoimmune encephalomyelitis*) gewonnen [Rivers 1933] (Übersicht bei [Gold *et al.* 2006]). Die Auslösung einer EAE über den Transfer der aktivierten enzephalitogenen T-Zellen in die gesunden Empfänger verwies auf die zentrale Rolle der T-Zellen in der Pathogenese der Erkrankung [Wekerle *et al.* 1994]. Dies wurde durch weitere Beobachtungen gestützt. Die aktivierten autoreaktiven T-Zellen wurden in höherer Anzahl im Liquor und in den Entzündungsherden von MS-Kranken gefunden [Zhang *et al.* 1994]. Die genetische Assoziation der MS wurde vor allem für die HLA-Gene nachgewiesen (Übersicht bei [Oksenberg *et al.* 2008]). Die Bedeutung der T-Zellen in der Krankheitsentwicklung unterstrich letztlich die Wirksamkeit der immunsuppressiven Therapien, die vor allem die T-Zell-Aktivität modulieren (Übersicht [Barten *et al.* 2010]).

1.3.2.1 CD4+T-Zellen

Die unterschiedliche Bedeutung und Beteiligung der CD4+ und CD8+T-Zellen an der Immunpathogenese der MS wurden seit langem diskutiert. Die starke genetische Assoziation der MS mit den MHC-II Genen sowie klinischen und histopathologischen Ähnlichkeiten der durch CD4+T-Helferzellen induzierten EAE mit der MS lenkten die Aufmerksamkeit auf diese T-Zell-Subpopulation. Die für das basische Myelinprotein spezifischen T-Helfer Zellen

wurden in den MS-Läsionen gefunden [Oksenberg *et al.* 1993] und über längere Zeit als zentrale Effektorzellen betrachtet. Die für die Th1-Zell-Aktivität charakteristischen Zytokine wie IFN- γ und IL-12 wurden vermehrt in den aktiven MS-Läsionen und im Liquor der MS Kranken nachgewiesen [Nicoletti *et al.* 1996] [Drulovic *et al.* 1997]. Die therapeutische Gabe von IFN- γ führte zur Exazerbation der Erkrankung bei den MS Patienten [Panitch *et al.* 1987] und die erhöhte Expression des IL-12p40 mRNA war mit der verstärkten Krankheitsaktivität verbunden [Boxel-Dezaire *et al.* 1999]. Die vorherrschende Rolle der Th1-Zellen wurde jedoch durch die Untersuchungen an den für IL-12, TNF- α und IFN- γ defizienten Mäusen in Frage gestellt. Es zeigte sich, dass trotz Depletion der wichtigsten CD4+Th1-Zell-Zytokine eine EAE in diesen Tieren auslösbar war [Becher *et al.* 2002] [Frei *et al.* 1997] [Chu *et al.* 2000]. Im Gegensatz dazu hatte die Depletion des IL-23 eine Resistenz der Tiere gegen EAE zur Folge [Cua *et al.* 2003]. IL-23 ist eines der wichtigsten Zytokine für die Stabilisierung der Th17-Zellen [McGeachy *et al.* 2009]. Seit der Beschreibung dieser neuen T-Zellpopulation wurde ihre Funktion in den autoimmunen Erkrankungen intensiv untersucht. In der MS scheinen die CD4+Th17 Effektorzellen für die Aufrechterhaltung der Entzündungsreaktion verantwortlich zu sein [McFarland and Martin 2007]. Die verstärkte IL-17-Expression wurde in den aktiven MS-Läsionen nachgewiesen [Lock *et al.* 2002]. Jedoch weder Th1 noch Th17-Zellen sind alleine für die Auslösung und Progression der MS ausreichend. Die kontroverse Diskussion um ihre funktionelle Bedeutung zeigt die Komplexität der Erkrankung und weist auf die Beteiligung weiterer Faktoren hin.

1.3.2.2 CD8+T-Zellen

Die Rolle der CD8+ zytotoxischen T-Zellen in der Pathogenese der MS gewann in den letzten Jahren immer mehr an Bedeutung. Es zeigte sich, dass die alleinige Depletion der CD4+T-Zellen keinen Einfluss auf die Krankheitsaktivität hatte [van Oosten *et al.* 1997], jedoch eine globale Depletion der CD4+ und CD8+T-Zellen mit einem monoklonalen Antikörper Anti-CD52 zu einer deutlichen Reduktion der Krankheitsschübe führte [Coles *et al.* 1999]. Die CD8+T-Zellen wurden in deutlich höherer Anzahl als CD4+T-Zellen in den MS-Läsionen und im Liquor der MS-Patienten nachgewiesen. Im Gegensatz zu den CD4+T-Zellen war die CD8+T-Zellpopulation in den entzündlichen MS-Läsionen untereinander viel einheitlicher. Bis zu 30 % der CD8+T-Zellen waren monoklonalen Ursprungs [Junker *et al.* 2007] [Babbe *et al.* 2000] und persistierten über mehrere Jahre im peripheren Blut und im Liquor der MS-Patienten [Skulina *et al.* 2004]. Die Untersuchungen der genetischen Assoziation der MHC-I

Allele mit der MS zeigten, dass HLA-A3 Allele mit einer erhöhten Suszeptibilität korrelieren, wogegen HLA-A2 Allele eine protektive Wirkung haben könnten [Burfoot *et al.* 2008]. Die regulatorische Funktion der CD8+T-Zellen wird daher ebenfalls diskutiert [Jiang *et al.* 1992], (Übersicht bei [Friese and Fugger 2005]). In den experimentellen Studien lösten die CD8+T-Zellen eine EAE aus, die histopathologisch und klinisch mehr der MS ähnelte als eine CD4+T-Zell-vermittelte Erkrankung [Sun *et al.* 2001] [Huseby *et al.* 2001]. Es ist aber noch unklar, welche Subtypen der CD8+T-Zellen das ZNS in der MS infiltrieren. Aus den MS-Läsionen wurden MBP-spezifische IFN γ und TNF α produzierende CD8+T-Zellen isoliert [Zang *et al.* 2004]. Weitere Untersuchungen zeigten, dass auch IL-17 produzierende CD8+T-Zellen in den aktiven und chronisch aktiven MS-Läsionen präsent sind [Tzartos *et al.* 2008]. Ihre Bedeutung für die Krankheitsaktivität muss noch geklärt werden.

Die CD8+T-Zellen können sowohl über lösliche Faktoren als auch über eine direkte Zytotoxizität den Gewebeschaden vermitteln. Die CD4+T-Zellen entfalten ihre Wirkung vor allem über lösliche Faktoren und regulieren die Entzündungsreaktion. Die unterschiedliche Beteiligung der CD4+ und CD8+T-Zellsubpopulationen in verschiedenen Individuen trägt zur Heterogenität der pathologischen Ausprägung und klinischen Erscheinung der MS bei.

1.3.3 Migration der T-Zellen im ZNS

Die Aktivierung und klonale Expansion der autoreaktiven enzephalitogenen T-Zellen erfolgt in der Peripherie. Die aktivierten T-Zellen exprimieren verstärkt Adhäsionsmoleküle und passieren die Blut-Hirn-Schranke [Wekerle *et al.* 1987]. Die Reaktivierung der T-Zellen mit ihrem spezifischen Antigen erfolgt MHC-abhängig im ZNS und wird vor allem durch die CD11c+ dendritischen Zellen und eingewanderten Makrophagen vermittelt [Becher *et al.* 2006] [Greter *et al.* 2005]. Die genaue anatomische Lokalisation der Reaktivierung der T-Zellen im ZNS ist noch nicht vollständig geklärt und wird kontrovers diskutiert [Goverman 2009] [Kivisakk *et al.* 2009].

Nach ihrer Reaktivierung wandern die CD4+ und CD8+T-Zellen ins ZNS-Parenchym ein. Das Hirnparenchym ist ein kompaktes Gewebe, in dem die Nervenzellfortsätze von den Gliazellen umhüllt sind und die extrazelluläre Matrix ein dichtes perineurales Netz bildet [Fox und Caterson 2002]. Die Visualisierung des Migrationsverhaltens der aktivierten CD4+ und CD8+T-Zellen im Hirngewebe zeigte, dass die T-Zellen sich mit einer hohen Geschwindigkeit durch das kompakte Hirnparenchym bewegen können und ZNS-Zellen kontaktieren

[Kawakami *et al.* 2005b] [Nitsch *et al.* 2004] [Wilson *et al.* 2009]. Die proteolytischen Enzyme wie Metalloproteinasen, Disintegrine und Granzyme, die von den aktivierten T-Zellen sezerniert werden [Opdenakker *et al.* 2003], könnten dabei die Bewegung der T-Zellen durch das dichte Hirnparenchym erleichtern und auch eine direkte neurotoxische Wirkung entfalten [Newman *et al.* 2001]. Ferner zeigte sich, dass die Migration der CD4+ und CD8+T-Zellen im Hirngewebe an unterschiedliche Kompartimente gebunden ist [Siffrin *et al.* 2009]. Da die T-Zellen über MHC-Moleküle mit den ZNS -Zellen interagieren, weist dies darauf hin, dass die unterschiedliche MHC-Expression im ZNS die T-Zell-vermittelte Pathologie beeinflussen kann.

1.3.3.1 MHC-I Expression im ZNS

MHC-Klasse-I-Moleküle finden sich auf allen kernhaltigen Zellen und bilden einen Teil des zellulären Immunsystems. Im Gegensatz zu den anderen Studien [Lampson1995] zeigten Schatz und Kollegen *in vivo*, dass die Neurone im normalen, nichtentzündlichen Hirngewebe MHC-I Moleküle exprimieren. Eine Besonderheit der MHC-I Expression im ZNS stellt ihre Abhängigkeit von der neuronalen Aktivität dar. Die MHC-I Moleküle werden sowohl während der ZNS-Entwicklung als auch im erwachsenen Hirngewebe in den elektrisch aktiven Arealen verstärkt exprimiert [Corriveau *et al.* 1998]. Diese funktionelle Anpassung der MHC-I-Expression an den Aktivitätsstatus der Neurone weist auf die mögliche Funktion der MHC-I Moleküle in der Regulation der synaptischen Plastizität im Rahmen der ZNS Entwicklung hin [Boulanger und Shatz 2004]. Die Hochregulation der MHC-I Expression u.a. auf Neuronen und Oligodendrozyten wurde im Rahmen einer Infektion *in vivo* nachgewiesen [Redwine *et al.* 2001]. Die *in vitro* durchgeführten Studien zeigten, dass generell alle ZNS-Zellen, sowohl Gliazellen als auch die Neurone, die MHC-I-Moleküle unter der Zytokin-Stimulation, insbesondere IFN γ , exprimieren können [Neumann *et al.* 2002]. Die Untersuchungen des Autopsiegewebes der MS-Kranken zeigten eine konstitutive Expression der MHC-I Moleküle auf Endothelzellen, perivaskulären Makrophagen und manchen Mikrogliazellen. In den entzündlichen MS-Läsionen wurde aber MHC-I Expression auf fast allen ZNS-Zellen insbesondere auf Astrozyten, Oligodendrozyten, Neuronen und Axonen nachgewiesen, was mit der Entzündungsaktivität der Läsionen zusammenhing . Dies weist darauf hin, dass im Rahmen der ZNS-Entzündung potenziell fast alle ZNS-Zellen zum Angriffsziel der zytotoxischen T-Zellen werden können [Hoftberger *et al.* 2004].

1.3.3.2 MHC-II Expression im ZNS

Im gesunden ZNS ist die MHC-II Expression vor allem auf den Makrophagen und dendritischen Zellen nachweisbar [Kivisakk *et al.* 2009]. Die MHC-II Expression auf den Mikrogliazellen und Astrozyten ist vernachlässigbar gering und wird zum Teil durch die elektrisch aktiven Neurone über die Sekretion der neurotrophen Faktoren wie BDNF (*brain derived neurotrophic factor*), NGF (*nerve growth factor*) und NT3 (*neurotrophin-3*) unterdrückt [Neumann *et al.* 1998]. Im Rahmen der ZNS-Entzündung wird die MHC-II Expression auf Mikroglia und Astrozyten hochreguliert. Die aktivierte Mikroglia exprimiert verstärkt nicht nur MHC-II Moleküle, sondern auch kostimulatorische Moleküle wie CD40, CD80, CD86 und Zytokine wie IL-12 und IL-23, was die Zytokinfreisetzung in den T-Zellen stimuliert [Becher *et al.* 2000] [Aloisi 2001]. Aktivierte Mikrogliazellen entwickeln phagozytierende und antigenpräsentierende Eigenschaften und spielen eine Schlüsselrolle in der Aufrechterhaltung der ZNS-Entzündung im Rahmen der EAE [Heppner *et al.* 2005].

Die Rolle der Astrozyten als Antigen präsentierende Zellen wird kontrovers diskutiert [Aloisi *et al.* 2000] [Weber *et al.* 1994] [Constantinescu *et al.* 2005]. Die ruhenden und aktivierten Astrozyten haben das Potential die T-Zellen zu aktivieren, wobei die naiven T-Zellen nur von IFN- γ aktivierten Astrozyten stimuliert werden können [Nikceвич *et al.* 1997]. Die antigenpräsentierende Fähigkeit der aktivierten Astrozyten ist insgesamt viel geringer im Vergleich zu den dendritischen Zellen und Mikrogliazellen [Aloisi *et al.* 1999]. Über lösliche Faktoren wie TGF- β können Astrozyten eine immunmodulierende Wirkung ausüben und so zu der Immuntoleranz des ZNS beitragen [Hailer *et al.* 1998].

Die MHC-II-Expression auf den Oligodendrozyten konnte auch unter den entzündlichen Bedingungen und IFN- γ Stimulation nicht nachgewiesen werden, wogegen eine schwache MHC-I Expression nachweisbar war [Lee und Raine 1989] [Gobin *et al.* 2001].

Zusammengenommen ist im gesunden ZNS eine konstitutive MHC-II Expression auf den perivaskulären Makrophagen und eingewanderten dendritischen Zellen nachweisbar, was für die Reaktivierung der autoimmunen CD4+T-Zellen von Bedeutung ist. Im Rahmen der fortschreitenden Entzündungsreaktion exprimieren Mikrogliazellen und Astrozyten verstärkt die MHC-II- und kostimulatorischen Moleküle und wandeln sich zu den potenten Antigen präsentierenden Zellen, die die Entzündungsreaktion regulieren (Übersicht bei [Goverman2009]).

1.3.4 T-Zell-vermittelte ZNS-Entzündung

Die erfolgreiche Reaktivierung der enzephalitogenen T-Zellen im ZNS hat einen gegen Myelin gerichteten Angriff zur Folge, an dem mehrere Immunzellen u.a. T-Lymphozyten, Makrophagen, Mikroglia und B-Lymphozyten beteiligt sind. Die verstärkte Expression der Adhäsionsmoleküle an Endothelzellen im ZNS fördert Rekrutierung weiterer hämatogener Zellen wie Makrophagen und Granulozyten (Übersicht bei [Sospedra and Martin2005]). Eine besondere Rolle spielen dabei die Plasmazellen, die myelinreaktive Antikörper sezernieren [Hemmer *et al.* 2002] sowie aus der Peripherie rekrutierte Makrophagen und Mikroglia aus dem ZNS. Die lokal produzierten Entzündungsmediatoren und reaktiven Sauerstoffspezies führen zu Myelindegradation und axonalem Schaden, was letztendlich die funktionellen Ausfälle verursacht.

1.3.5 Degenerative Prozesse

Neben den entzündlichen Prozessen mit Verlust von Myelin und Oligodendrozyten kommt es zu einem neuronalen und axonalen Schaden, der auch eine neurodegenerative Komponente hat [Zipp und Aktas, 2006]. In den immunpathologischen Untersuchungen fanden sich neben den typischen Plaques in der weißen Substanz auch kleine, kortikale Läsionen [Kidd *et al.* 1999]. Weitere Untersuchungen zeigten einen apoptotischen Untergang von Neuronen im Cortex [Peterson *et al.* 2001]. Diese Läsionen wurden vorwiegend bei den progredienten Krankheitsverläufen festgestellt und könnten ein Korrelat zu der kernspintomographisch nachweisbaren kortikalen Atrophie darstellen [Sailer *et al.* 2003]. Eine direkte primär neuronale Schädigung tritt bei MS Patienten bereits in der Anfangsphase der Erkrankung auf und korreliert mit der Reduktion des neuronalen Markers N-Azetyl-Aspartat in der sog. *normal appearing gray matter* (aus dem Engl. normal aussehende weiße Substanz) in der Magnetresonanz Spektroskopie [Inglese *et al.* 2004].

1.4 Aktuellen Therapiemöglichkeiten

Die Therapie der MS Patienten richtet sich hauptsächlich nach dem klinischen Verlauf der Erkrankung. Die gegenwärtigen Therapiemöglichkeiten beeinflussen dabei vor allem die inflammatorische Phase, was zwar eine deutliche Verminderung der Schubhäufigkeit bewirkt, jedoch die Progredienz der Erkrankung nicht aufhalten kann. Zu den Immunmodulatoren gehören Interferon- β und Glatirameracetat (GA). Die Wirkung von Interferon- β (Betaferon®),

Rebif®, Avonex®) wird über die Hemmung der Proliferation von Leukozyten und der MHC II-abhängigen Antigenpräsentation sowie die Reduzierung von Th1 Zytokinproduktion vermittelt. Eine Hemmung der Migration der T-Zellen über die Blut-Hirn-Schranke wird durch die Reduktion der Sekretion von Metalloproteinase-9 sowie der Expression von VLA-4 auf T-Zellen erreicht [Hartung *et al.* 2004]

Ein weiterer Immunmodulator Glatiramerazetat (GA) ist ein synthetisches Polypeptid, das aus den Salzen der vier Aminosäuren Glutaminsäure, Lysin, Alanin und Tyrosin („GLAT“) besteht. Wegen seiner molekularen Zusammensetzung hat GA eine Ähnlichkeit mit Myelin-basischem Protein (MBP), wodurch seine Wirkung zum Teil erklärt werden kann. GA konkurriert mit MBP um die Bindungsstelle am MHC-II Molekül und beeinträchtigt damit die Antigenpräsentation [Teitelbaum *et al.* 1988]. Im peripheren Immunkompartiment verhindert GA eine Aktivierung von MBP-reaktiven T-Zellen. Es wird auch davon ausgegangen, dass GA einen Shift von pro-inflammatorischen Th1 Zellen zu anti-inflammatorischen Th2 Zellen bedingt [Dhib-Jalbut *et al.* 2003]. Zur Eskalationstherapie bei aggressivem Verlauf der MS werden Mitoxantron (Ralenova®) und Natalizumab (Tysabri®) eingesetzt. Im Vergleich zu den Interferonen und Glatiramerazetat haben sie ein erheblich schwereres Nebenwirkungsprofil. Mitoxantron wirkt direkt immunsuppressiv, interkaliert mit DNA und hemmt u.a. die Proliferation von B-Zellen, T-Zellen und Makrophagen. Wegen seiner Zytotoxizität kann die Einnahme erhebliche Nebenwirkungen wie Kardiotoxizität und Leukopenie verursachen und das Risiko für sekundäre Leukämien erhöhen [Fox 2004]. Natalizumab wurde als erster monoklonaler Antikörper zur Therapie der schubförmigen Multiplen Sklerose zugelassen. Natalizumab bindet an die α -4-Untereinheit der VLA-4 Moleküle und verhindert somit die Migration der T-Zellen über das ZNS-Endothel [Yednock *et al.* 1992]. Unter einer Kombinationstherapie von Natalizumab mit Interferon- β kam es bei einigen wenigen Patienten zu einer opportunistischen ZNS-Infektion, der progressiven multifokalen Leukenzephalopathie, die durch das JC-Virus, ein bei ca. 50-60% der Bevölkerung latent vorliegendes Virus, verursacht wird [Polman *et al.* 2006; Rudick *et al.* 2006]. Daraufhin wurde Natalizumab vom Markt genommen und 2006 nach neuer Risikobewertung zur Monotherapie der aggressiven schubförmigen Form der MS zugelassen. Das erste oral verfügbare MS-Medikament, Fingolimod, wurde im Januar 2011 in Europa zur Therapie der hochaktiven schubförmigen MS sowie rasch primär progredienten MS zugelassen. Fingolimod (FTY720) ist ein Sphingosin-1-Phosphat (S1P)-Rezeptor-Modulator,

der als funktioneller Antagonist an den S1P Rezeptor bindet und damit die Migration der T und B Lymphozyten aus den sekundären lymphatischen Organen verhindert. Wegen seiner lipophilen Struktur kann FTY720 die Blut-Hirn-Schranke passieren. Seine neuroprotektive Wirkung wird derzeit diskutiert [Miron *et al.* 2008] [Cohen *et al.* 2010]. Der zweite marktreife orale Wirkstoff Purinanalogen Cladribin wurde aufgrund der als nicht ausreichend betrachteten Studienlage im Hinblick auf den Verdacht der Häufung von malignen Tumorerkrankungen für die Therapie der MS nicht zugelassen [Bördlein, Dtsch. Ärzteblatt 2011], (www.aerzteblatt.de/nachrichten/44406/). Zahlreiche andere Wirkstoffe zur Therapie der MS wie Laquinimod, Alemtuzumab (Campath-1), Daclizumab, Fumarat, Teriflunomid oder autologe Stammzelltransplantation sind zur Zeit in der Phase-II der Entwicklung (Übersicht bei [Muraro and Bielekova 2007] [Cohen 2009] [Barten *et al.* 2010]).

1.5 Ziel der Arbeit

Die Multiple Sklerose ist, was die histopathologische und klinische Ausprägung angeht, eine sehr heterogene Erkrankung. Die Ätiologie der MS ist nach wie vor unbekannt und eine kausale Behandlung nicht möglich. Die bisherigen Therapieziele lagen hauptsächlich in der Milderung der klinischen Symptome und Verhinderung einer raschen Erkrankungsprogredienz. Mit der rasanten Entwicklung der Immunologieforschung in den letzten 20 Jahren wurde es möglich, die Pathogenese der Erkrankung auf der zellulären Ebene besser zu verstehen. Die aktuelle Therapie der MS basiert vor allem auf der Immunmodulation, die die Entzündungsschübe verringert und die Krankheitsprogression verzögert. In den schweren, primär progredienten Krankheitsverläufen ist jedoch diese Therapie unwirksam. Es ist daher von größter Bedeutung, die Mechanismen der Interaktionen der Immunzellen mit den residenten Zellen im ZNS zu verstehen, um gezielt in die Prozesse wie Antigenpräsentation und Antigenerkennung im ZNS eingreifen zu können, ohne das periphere Immunsystem zu beeinträchtigen und gezielt Neurone zu schützen.

Das Ziel dieser Arbeit ist es, mit Hilfe der Zwei-Photonen-Mikroskopie auf der zellulären Ebene die Interaktionen der T-Zellen mit dem ZNS-Gewebe zu beleuchten und damit Grundlagenerkenntnisse zur weiteren Therapieentwicklung zu gewinnen.

Das Verhalten der Immunzellen im ZNS nach ihrer Einwanderung wird von verschiedenen Faktoren beeinflusst, die letztendlich über den mehr oder weniger schädlichen Ausgang dieser Interaktion entscheiden. Über das Verhalten der T-Zellen im ZNS sind noch viele Fragen

Einleitung und Zielstellung

offen. Wie verhalten sich die verschiedenen T-Zell-Populationen im ZNS? Wie ist die Antigenpräsentation im gesunden ZNS reguliert? Welche ZNS Zellen sind dafür zuständig? Welche Folgen hat die T-Zell-Antigenerkennung im gesunden ZNS? Welche ZNS-Faktoren begünstigen die Aktivierung der autoimmunen T-Zellen?

2 Material und Methoden

2.1 Laborartikel

2.1.1 Puffer, Lösungen, Zellkultur- und Hirnschnittkulturmedien

Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS)		Gibco Invitrogen, Karlsruhe
FACS Puffer	PBS	
	0,5 % bovines Serumalbumin (BSA)	Serva, Heidelberg
	0,5 % Natriumazid (NaN ₃)	Merck, Darmstadt
Saponin Puffer	PBS	
	0,5 % BSA	
	0,5 % Saponin	Roth, Karlsruhe
MACS Puffer	PBS	
	0,5 % BSA	
	EDTA (Ethylendiamintetracetat)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Zellkulturmedium für murine Zellen	RPMI 1640	Gibco Invitrogen, Karlsruhe
	1 % HEPES 1M	Gibco Invitrogen, Karlsruhe
	10 % Fetales Kälberserum (FCS), hitzeinaktiviert für 30 Minuten bei 56°C	Biochrom, Berlin
	100 U/ml Penicillin	Gibco Invitrogen, Karlsruhe
	100 µg/ml Streptomycin	Gibco Invitrogen, Karlsruhe
	2mM L-Glutamin	Gibco Invitrogen, Karlsruhe
Waschmedium	RPMI 1640	Gibco Invitrogen, Karlsruhe
	1 % HEPES 1M (N-[2- Hydroxyethyl]piperazin-N'- [2-Ethansulfonsäure])	Gibco Invitrogen, Karlsruhe
	100 U/ml Penicillin	Gibco Invitrogen, Karlsruhe
	100 µg/ml Streptomycin	Gibco Invitrogen, Karlsruhe
Iscove's Mode Dulbecco's Medium (IMDM)	2 mM L-Glutamin	Gibco Invitrogen, Karlsruhe
	25 mM HEPES	Gibco Invitrogen, Karlsruhe

Material und Methoden

ACSF (<i>artificial cerebrospinal fluid</i>)	124 mM NaCl	Roth, Karlsruhe
	1,25 mM NaH ₂ PO ₄ *H ₂ O	Roth, Karlsruhe
	10 mM Glucose *H ₂ O	Merck, Darmstadt
	1,8 mM MgSO ₄	Merck, Darmstadt
	1,6 mM CaCl ₂ *2H ₂ O	Sigma-Aldrich, Steinheim
	1,6 mM KCl	Merck, Darmstadt
	3,0 mM NaHCO ₃	Merck, Darmstadt
Lysispuffer	PBS	
	1 % KHCO ₃	Merck, Darmstadt
	8,29 % NH ₄ Cl	Roth, Karlsruhe
	37,2 % Na ₂ EDTA	
Hirnschnittpräparationsmedium	MEM (Minimal Essential Medium)	Invitrogen, Karlsruhe
	1 % L-Glutamin	Gibco Invitrogen, Karlsruhe
Hirnschnittkulturmedium	50 % MEM	Gibco Invitrogen, Karlsruhe
	25 % HBSS (Hank's gepufferte Salzlösung)	Gibco Invitrogen, Karlsruhe
	25 % <i>normal horse serum</i> (hitzeinaktiviert)	Gibco Invitrogen, Karlsruhe
	2 % Glutamin	Boehringer, Mannheim
	10µg/ml <i>Insulin-Transferrin-Sodium Media Supplement</i>	Boehringer, Mannheim
	2,64 mg/ml Glukose	Braun, Melsungen
	0,1 mg /ml Streptomycin	Sigma, Deisenhofen
	100 U/ml Penicillin	Sigma, Deisenhofen
	0,8 µg/ml Vitamin C	Sigma, Deisenhofen
	0,04 % Bicarbonate	Sigma, Deisenhofen
	0,5 % 1M Trisbasis	Sigma, Deisenhofen

2.1.2 Interleukine

Name	Konzentration		Herkunft
IL-2	100 U/l	human, rekombinant	Chiron Therapeutics, Hayward, USA
IL-4	200 U/l	murin, rekombinant	R&D Systems, Wiesbaden
IL-12	2,5 ng/ml	murin, rekombinant	R&D Systems, Wiesbaden

2.1.3 Peptide

MOG ₄₀₋₅₄ YRSPFSRVVHLYRNG	Activotec, Cambridge, UK
OVA ₂₅₇₋₂₆₄ SIINFEKL	Pepceuticals, Leicester, UK
OVA ₃₂₃₋₃₃₉ ISQAVHAAHAEINEAGR	Pepceuticals, Leicester, UK
PLP ₁₃₉₋₁₅₁ HSLGKWLGHDPKF	Pepceuticals, Leicester, UK

2.1.4 Fluorochrome für die Zwei-Photonen Mikroskopie

5-(und-6)-(((4-chloromethyl)benzoyl)amino)tetramethylrhodamin CMTMR	Molecular Probes Invitrogen, Eugene, USA
Fluoreszeinisothiocyanat (FITC)-Dextran	Molecular Probes Invitrogen, Eugene, USA
Fluo-4 grüner fluoreszierender Kalziumindikator	Molecular Probes Invitrogen, Eugene,

2.1.5 Antikörper und Sekundärfarbstoffe

Tab.1: neutralisierende murine Zellkultur Antikörper

Name	Klon	Konzentration	Herkunft
α-m-IL-4	11B11	5 µg/ml	BD-Bioscience, Heidelberg
α-m-IL-12	C17.8	5 µg/ml	BD-Bioscience, Heidelberg
α-m-Interferon γ	AN18.17.24	5 µg/ml	BD-Bioscience, Heidelberg

Tab. 2: murine Oberflächenantikörper

Name	Klon	Konzentration	Herkunft
α-m-CD4-Biotin	GK 1.5	5 µg/ml	BD, Bioscience, Heidelberg
α-m-CD4-FITC	GK 1.5	5 µg/ml	BD, Bioscience, Heidelberg
α-m-CD8-FITC	53-6.7	5 µg/ml	BD, Bioscience, Heidelberg
α-m-CD25-APC	PC 61	1 µg/ml	BD, Bioscience, Heidelberg
α-m-CD69-PE	H1.2F3	2 µg/ml	BD, Bioscience, Heidelberg
α-INFγ gekoppelt an α-m-CD45	αIFN- 4SB3/ αCD45 5B1		Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
α-IL4 gekoppelt an α-m-CD45	α-IL-4 1A6-10/ αCD45 5B1		Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
α-IL10 gekoppelt an α-m-CD45	α-IL10 JES5-16E3/ αCD45 5B1		Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach

Tab. 3: Antikörper gekoppelt an magnetische Mikropartikel (MB)

Name	Herkunft
α-m-CD4 MB	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
α-m-CD8 MB	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
α-m-CD90 MB	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
CD4 Isolierungssatz	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
CD8 Isolierungssatz	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
α-PE MB	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach

Material und Methoden

Tab. 4: murine Intrazellulärantikörper

Name	Klon	Konzentration	Herkunft
α-m-IL4-APC	11B11	2 µg/ml	BD Bioscience, Heidelberg
α-m-IL4-PE	11B11	2 µg/ml	BD Bioscience, Heidelberg
α-m-IL10-PE	JES5-16E3	2 µg/ml	BD Bioscience, Heidelberg
α-m-IL10-APC	JES5-16E3	2 µg/ml	BD Bioscience, Heidelberg
α-m-INFγ-FITC	XMG1.2	5 µg/ml	eBioscience, San Diego, USA
α-m-INFγ-PE	XMG1.2	2 µg/ml	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
α-m-Perforin APC	eBioMAK-D	2 µg/ml	eBioscience, San Diego, USA
α-m-TNFα-APC	MP6-XT22	2 µg/ml	BD Bioscience, Heidelberg

Tab. 5: Sekundärantikörper, Isotypenkontrollen und Sonstige

Name	Klon	Konzentration	Herkunft
APC Isotyp IgG1		2,5 µg/ml	BD Bioscience, Heidelberg
FITC Isotyp IgG2		5 µg/ml	BD Bioscience, Heidelberg
PE Isotyp IgG1	R3-34		BD Bioscience, Heidelberg
PE Isotyp IgG2A rat	R35-95		BD Bioscience, Heidelberg
Ratten IgG	/	20 µg/ml	Sigma-Aldrich , Steinheim
SA-APC	/	1µg/ml	BD Bioscience, Heidelberg
SA-PerCP	/	1µg/ml	BD Bioscience, Heidelberg
α-m-Fcγ III/II Rezeptor (CD16/CD32)	2.4G2	5 µg/ml	BD Bioscience, Heidelberg
7-AAD	/	0,25 µg/test	BD Bioscience, Heidelberg

2.1.6 Sonstige Reagenzien und Chemikalien

Agarose	Merck, Darmstadt
Aqua ad injectabilia	Braun, Melsungen
Brefeldin A	Sigma-Aldrich , Steinheim
Complete Freud's Adjuvants (CFA)	Difco, Detroit, USA
DMSO	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ethanol	Merck, Darmstadt
Glucose 20 %	Braun, Melsungen
Ionomycin	Sigma-Aldrich , Steinheim
Isofluran	Abbot, Wiesbaden
Ketamin	Curamed, Karlsruhe, Deutschland
NaCl 0,9 %	Braun, Melsungen
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Percoll	Sigma-Aldrich, Steinheim
Phorbol-Myristat-Acetat (PMA)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Saccharose	Merck, Darmstadt
Trypanblau (0,4 %)	Biochrom, Berlin
[³ H] Thymidin	Amersham, Piscataway, USA
Xylazinhydrochlorid 2 %	Bayer, Leverkusen, Deutschland

2.1.7 Kunststoffartikel

24, 48 und 96 Loch Platten, Petrischalen	Becton Dickinson, Heidelberg
Kanülen, Spritzen	Braun, Melsungen
Kryo-Tubes	Nunc, Roskilde, Dänemark
MACS Separationssäulen, Magneten und Ständer	Miltenyi Biotech GmbH, Bergisch Gladbach
Pipettenspitzen	Biozym, Hessisch Oldendorf
Reaktionsgefäße (safe lock tubes)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland, Falcon
Zellsieb (70µm Porengröße)	BD Bioscience, Heidelberg
Chirurgiebesteck	Aesculap, Tuttlingen

2.1.8 Verwendete Software

CellQuest	BD Bioscience, Heidelberg
Velocity	Improvion, Tübingen
Graphpad Prism 5	Graphpad Software Inc., USA
SPSS	SPSS, München
Cellquest	BD, Bioscience

2.1.9 Geräte

Durchflusszytometer FACSCalibur	BD Bioscience, Heidelberg
Eppendorf Centrifuge 5416 und 5417R	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Inkubatoren	Heraeus Kendro, Langenselbold
Lichtmikroskop	Leica, Heidelberg, Deutschland
Magnet für Zellsortierung	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
Megafuge 1.OR	Heraeus Kendro, Langenselbold
Neubauerzählkammer	Brand, Wertheim
Pipetten	BD Bioscience, Heidelberg
Pipettierhilfe Pipetus	Hirschmann Laborgeräte , Herrenberg
Sterilbank, Herasafe	Heraeus Kendro, Langenselbold
Stickstofftank	Messer, Sulzbach
Beta-Szintillationszähler MicroBeta Wallac	Perkin Elmer, Rodgau - Jügesheim
Vibratom "NVSLM1"	Shandon Pittsburgh, USA
Waage (für Chemikalien)	Mettler Gießen Deutschland
Wasserbad	Medingen, Wiesloch

2.2 Tiermodelle

Die Versuchstiere wurden in speziellen Tierhaltungsräumen (klimatisiert, 12:12-Hell-Dunkel-Rhythmus) unter Standardbedingungen (individuell belüftete Makrolonkäfige, pelletiertes Mauseinfutter, Holzgranulateinstreu und täglich frisches Wasser) im Tierstall des Neurowissenschaftlichen Forschungszentrums an der Charité Berlin gehalten und dort von geprüften Versuchstierpflegern betreut. Alle Versuche wurden im Rahmen der tierschutzrechtlichen Bestimmungen des Landes Berlin durchgeführt.

2.2.1 C57BL/6

Der Maustamm C57BL/6 ist ein Standardtiermodell, das in der Grundlagenforschung häufig verwendet wird. Die Tiere wurden von Charles River Sulzfeld, Deutschland, bezogen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde C57BL/6 Maustamm für die T-Zellkultur und Erstellung der akuten und chronischen Hirnschnitte benutzt.

2.2.2 Ovalbumin als Modellantigen

Das Ovalbumin ist ein 42 kDa großes Protein aus Hühnereiweiß und gehört zu der Gruppe der Serpine (Serpineproteaseinhibitoren) [Nisbet *et al.* 1981]. In dieser Arbeit wurde Ovalbuminsystem als Modellantigen verwendet.

2.2.2.1 OT-1

In der Position zwischen Aminosäuren (AS) 257-264 des Ovalbumins (OVA₂₅₇₋₂₆₄) wurde eine acht Aminosäuren lange Sequenz SIINFEKL identifiziert, die immunodominant und H-2K^b restringiert ist [Rotzschke *et al.* 1991]. Die Induktion einer CD8⁺T-Zell Antwort gegen OVA₂₅₇₋₂₆₄ machte es zum geeigneten Modellantigen für immunologische Fragestellungen. Die sog. OT1 Maus ist ein transgenes Mausmodell für den passenden spezifischen T-Zellrezeptor, der mit V α 2 und V β 5 variablen Regionen die Ovalbuminsequenz (OVA₂₅₇₋₂₆₄, SIINFEKL) im Kontext des MHC I H-2K^b Moleküls erkennt [Hogquist *et al.* 1994].

2.2.2.2 OT-2

In der Position zwischen AS 323-339 des Ovalbumins wurde eine ISQAVHAAHAEINEAGR Sequenz identifiziert, die I-A^b restringiert ist und von den CD4⁺T-Zellen erkannt wird [Sette *et al.* 1987]. Das OT2-Mausmodell wurde analog zu dem OT1-Modell generiert. Die OT2-Mäuse haben einen transgenen T-Zell-Rezeptor, der Ovalbuminsequenz

ISQAVHAAHAEINEAGR im Kontext der MHC-II I-A^b Moleküle erkennt [Barnden *et al.* 1998].

2.3 T-Zell-Hirnschnitt Kokultur

2.3.1 Prinzip

Für die Untersuchung der Verhaltensweise der Immunzellen im lebenden Hirngewebe wurde eine T-Zell-Hirnschnitt Kokultur verwendet. Die mittlere Schicht der akuten Hirnschnitte enthält lebendes Gewebe [Misgeld and Frotscher 1982]. Die *in vitro* generierten OVA spezifischen CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen wurden in künstlichem Liquor cerebrospinalis (ACSF *artificial cerebrospinal fluid*) mit murinen Hirnschnitten koinkubiert. Mit einem Zwei-Photonen Mikroskop wurde das Migrationsverhalten der T-Zellen unter verschiedenen Bedingungen visualisiert.

2.3.2 Akute Hippokampusschnitte

Für die akuten Gehirnschnitte wurden acht bis zehn Tage alte C57BL/6 Mäuse verwendet. Nach einer tödlichen Inhalation mit Isofluran wurde auf einer gekühlten Metallplatte der Thorax eröffnet. In die linke Herzkammer wurden 300 µl FITC-Dextran (8µg/300 ml NaCl) injiziert. Unmittelbar nach der Dekapitation wurde der Schädel eröffnet und das Gehirn entnommen. Mit einem Vibratom wurden 400µm dicke, transversale Gehirnschnitte angefertigt. Die Hippokampusregion wurde einzeln aus den Schnitten herauspräpariert. Die Hippokampusschnitte wurden anschließend in die abgedunkelte Inkubationskammer auf eine Membran gelegt und bei Raumtemperatur für mind. 60 min belassen. Das Hirngewebe musste nach Extraktion permanent in mit 95 % O₂ und 5 % CO₂ begastem ACSF, der Elektrolyte und Glucose enthält, getaucht sein. Alle Präparationsschritte wurden in einer Umgebungstemperatur von ca. 4 °C durchgeführt.

2.3.2.1 Fluo-4 Färbung

Die Darstellung der Kalziumaktivität in den Neuronen lässt auf ihre Aktivität zurückschließen. Für einige Kokultur Experimente wurden die hippokampalen Hirnschnitte mit Kalzium-sensitivem Fluoreszenzfarbstoff Fluo-4 gefärbt. Fluo-4 ist ein Acethoximethyl-Ester, der durch die Zellmembran frei diffundiert. Im Zytosol wird die lipophile Estergruppe durch Esterasen abgespalten. In der gespaltenen Form kann Fluo-4 die Zellmembran nicht mehr passieren und bindet die intrazellulären Kalziumionen. Das Absorptionsmaximum für

Kalziumbeladenen Fluo-4 liegt bei 480nm und Emissionsmaximum bei 520nm. Für die Färbung der akuten Hirnschnitte wurde Fluo-4 in DMSO gelöst und mit ACSF zu einer Endkonzentration von 10µM verdünnt. Die Zugabe von 0,02 % Pluronic Acid erhöhte die Löslichkeit des Farbstoffes und damit seine Aufnahme in die Zellen. Die gefärbten Hirnschnitte wurden 30 min lang bei 33 °C inkubiert und anschließend in die Messkammer des Zwei-Photonen-Mikroskops transferiert.

2.3.3 Chronische Hippokampusschnitte

Die Zubereitung der chronischen Hirnschnitte erfolgte wie bereits bei Kluge 1998 beschrieben [Kluge *et al.* 1998]. Alle Arbeitsschritte wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die organotypischen Hirnschnittkulturen wurden aus den Hirnen der dekapitierten acht bis zehn Tage alten C57/BL6 Mäusen angelegt. Unmittelbar nach Präparation wurde das den Hippokampus enthaltende Hirnteil ins eiskalte Hirnschnittpräparationsmedium überführt und mit einem Vibratom 350µm dicke koronare Schnitte angefertigt. Die Hirnschnitte wurden anschließend ins vorgewärmte Hirnschnittkulturmedium überführt und über 1 Woche bei 35 °C und 5 % CO₂ in Kultur gehalten. Die *in vitro* aktivierten OT1-Zellen (50 000 OT1 Zellen/Hirnschnitt) wurden auf die Hirnschnitte pipettiert, nach 12 h wurde das OVA₂₅₇₋₂₆₄ (20 x 25nM) Antigen dazugegeben. 24 h später wurden die Hirnschnitte mit Propidiumiodid (PI) gefärbt. Dazu wurden Hirnschnitte mit 5µg/ml PI für 30 min im Brutschrank inkubiert und anschließend im Kulturmedium gewaschen. Danach erfolgte die Fixierung der Hirnschnitte in 4 % Paraformaldehyd. Zum Dichteausgleich mit dem Gefriermedium wurden die Hirnschnitte für 2 Tage in 0,8M Saccharose bei 4 °C, und dann in 1,4M Saccharose für 3 Tage gelagert. Anschließend wurden die Schnitte im Gefriermedium fixiert und mit Hilfe des Kryostats in 20µm dicke Scheiben geschnitten. Mit Hilfe des Fluoreszenz Mikroskops (BX 50, Olympus) wurden in der Tiefe von 60 µm die Bildaufnahmen erstellt. Die Anzahl der PI-positiver Neurone im Gyrus dentatus pro 100 000µm² Fläche wurden mit Hilfe des benutzerdefinierten Programms, basierend auf der AMBA Software ausgewertet.

2.4 Zellbiologische Methoden

Beim Umgang mit Zellmaterial wurde unter einer Sterilbank gearbeitet. Die Sterilbank wurde regelmäßig mit Ethanol desinfiziert und mit UV- Licht bestrahlt. Alle Materialien, die in Kontakt mit Zellen kamen, wurden sterilisiert. Die zur Sektion der Tiere verwendeten Instrumente wurden gewaschen und anschließend mit 70 % Ethanol desinfiziert. Die

Inkubation der Zellen erfolgte unter Standardbedingungen bei einer Temperatur von 37 °C, einer Luftfeuchte von 95% und einer CO₂ Konzentration von 5 %.

2.4.1 Zellgewinnung

2.4.1.1 Milz

Die Mäuse wurden durch eine zervikale Dislokation getötet und mit 70 % Ethanol desinfiziert. Durch einen medianen Längsschnitt am Bauch wurde das Peritoneum freigelegt und mit einem Schnitt entlang des linken Rippenbogens eröffnet. Mit einer desinfizierten Pinzette wurde die Milz gelöst und in das Waschmedium überführt. Die folgenden Schritte erfolgten unter der Sterilbank und auf Eis bzw. bei 4 °C. Mit Hilfe eines Spritzenstempels wurde die Milz in einem Nylonsieb zerkleinert und die entstandene Zellsuspension in 50ml Waschmedium gewaschen. Alle Waschschrirte wurden wie folgt durchgeführt: die Zellen wurden in 50ml Volumen in einem 50ml Reaktionsgefäß aufgenommen und mit 500 x g 5 min lang zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das entstandene Pellet resuspendiert. Die in der Milz vorhandenen Erythrozyten wurden in einem hypoosmolaren Lysispuffer lysiert, da sie im Vergleich zu den weißen Blutkörperchen einen geringeren osmotischen Widerstand aufweisen. Zur Erythrozytolysc wurde das entstandene Zellpellet mit 10ml hypoosmolarem Lysispuffer und 5ml Waschmedium versetzt und sofort abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen wurden erneut gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 10ml Waschmedium aufgenommen und gezählt. Für diesen Schritt wurde die Zellsuspension 1:1 mit Trypanblau gemischt und auf eine Neubauerzählkammer aufgetragen. Unter dem Lichtmikroskop wurden die vitalen Zellen in 16 Feldern eines Quadrats gezählt (N). Die vitalen Zellen nahmen kein Trypanblau auf. Die Gesamtzahl der Zellen ergab sich wie folgt: Gesamtzahl = N x 2 (Verdünnungsfaktor) x 10 (Volumen) x 10⁴. Nach einem letzten Waschschrirte wurden die Zellen in das Kulturmedium in einer Konzentration 2,5 - 3 x 10⁶ Zellen pro ml aufgenommen.

2.4.1.2 Lymphknoten

Die Lymphknoten wurden an der Mesenterialwurzel und in der Inguinalregion freigelegt und entfernt. Alle folgenden Schritte waren identisch zur Aufarbeitung der Milzzellen, bis auf Erythrozytolysc, die hier nicht notwendig war.

2.4.2 Generierung der OVA spezifischen CD4+ und CD8+T-Zellen

Die CD8+T-Zellen von OT1 Mäusen wurden mit 25nM OVA₂₅₇₋₂₆₄ und die CD4+T-Zellen von OT2 Mäusen mit 0,3µM OVA₃₂₃₋₃₃₉ inkubiert. Die Differenzierung der OT-2 Zellen zur Th1 Subpopulation wurde durch Zugabe von 2,5ng/ml Interleukin-12 und 5µg/ml α-Interleukin-4 initiiert. Alle Zellen wurden im Kulturmedium mit dem Wachstumsfaktor Interleukin-2 (100 U/ml) gehalten. Die Proliferation und Morphologie der T-Zellen wurden durch tägliche lichtmikroskopische Beobachtungen beurteilt. Zur Restimulation der T-Zellen wurden mit 30Gy bestrahlte, CD90 depletierte (MACS), syngene, naive Milzzellen verwendet, die im Verhältnis 1:3 (T-Zellen:APC) mit entsprechendem OVA-Antigen (50nM OVA₂₅₇₋₂₆₄, 0,6µM OVA₃₂₃₋₃₃₉) zu der T-Zellkultur zugesetzt wurden. Die Zytokinproduktion der T-Zellsubpopulationen wurde durchflusszytometrisch nach der PMA/Iono Stimulation kontrolliert. Die T-Zellen wurden vier bis sieben Tage nach der Restimulation für die Kokultorexperimente verwendet.

2.4.3 Färbung

Für die Untersuchungen am Zwei-Photonen Mikroskop wurden die T-Zellen mit einem Farbstoff behandelt. Dabei sollte die Färbung möglichst keinen Einfluss auf die T-Zell Funktion und Vitalität haben. Das fluoreszierende Chloromethylderivat CMTMR (*5-(and -6)-(((4-chloromethyl)benzoyl)amino)tetra-methyl-rhodamine*) diffundiert frei durch die Zellmembran lebender Zellen. Durch die Reaktion mit Glutathion-S-Transferase ist CMTMR nicht mehr membrangängig und verbleibt in der Zelle. Die gefärbten T-Zellen bleiben dabei in ihrer Funktion unbeeinträchtigt [Ruiz *et al.* 1996]. Anschließend wurden die T-Zellen in RPMI mit 2,5µM CMTMR unter Kulturbedingungen 30 Minuten inkubiert und zweimal gewaschen. Bis zur Messung wurden die T-Zellen im Zellkulturmedium unter Kulturbedingungen gehalten.

2.4.4 Proliferationsassay

Die Proliferation der CD8+T-Zellen (OT1) in Gegenwart verschiedener Peptide wurde mit Hilfe eines Proliferationsassays ermittelt. Dazu wurden die OT1-Zellen wie oben beschrieben isoliert und über sieben Tage in der Kultur gehalten. Am siebten Tag wurden auf der 96 Loch Platte (2×10^5 Zellen/Loch) die OT1 -Zellen mit bestrahlten antigenpräsentierenden Zellen im Verhältnis 1:3 ausgesät. Die entsprechenden Antigene (OVA₂₅₇₋₂₆₄, OVA₃₂₃₋₃₃₉ MOG₄₀₋₅₄,

MOG₃₅₋₅₅) wurden in verschiedenen Konzentrationen dazugegeben. Die Zellen wurden über 48h im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde 0,5µCi [³H]Thymidin zu den Zellen pipettiert. Während der Zellteilung wird [³H]Thymidin in die DNS der Zelle inkorporiert. Je mehr Zellteilungen (je höher die Proliferation) die Zelle durchgeht, desto mehr [³H] Thymidin wird in die DNS eingebaut. Nach der Inkubationszeit von 18h wurden die Zellen geerntet und in Aqua bidest gewaschen, was zu einer Auflösung der Zellemembran und Freilegung der DNS führte. T-Zellfragmente und DNS wurden durch eine Filtermembran gesiebt, die nur Zellteile von einer Größe < 1,5µm Durchmesser passieren ließ. Die intakte DNS blieb somit im Sieb. Die DNS wurde anschließend auf der Membran getrocknet und die Radioaktivität mit Hilfe des Beta-Szintillationszählers ermittelt. Je höher die Radioaktivität, desto höher die Proliferation.

2.5 Magnetische Zellsortierung

2.5.1 Prinzip.

Die Isolierung bestimmter T-Zellsubpopulationen erfolgte mit Hilfe des MACS-Zellsortierungssystems (*High-Gradient Magnetic Cell Sorting*) [Miltenyi *et al.* 1990]. Das MACS-System beruht auf der spezifischen Bindung von Antikörpern, die mit magnetischen Mikropartikeln beladen sind. Die Zellen, die Antikörper gebunden haben, werden bei der Passage durch eine ferromagnetische Säule zurückgehalten. Die unmarkierten Zellen passieren dabei die Säule ungehindert. Wird die Säule aus dem Magnetfeld entfernt, können die markierten Zellen ebenfalls ausgespült werden.

2.5.2 CD4+ und CD8+ Zellsortierung

Für die Kokultorexperimente mit CD4+ oder CD8+T-Zellen wurden die Zelllinien jeweils mit α -m-CD4 MB bzw. α -m-CD8 MB inkubiert, um eine Zellpopulationsreinheit von > 95 % zu erreichen. Die Reinheit wurde anschließend durchflusszytometrisch bestimmt.

2.6 Durchflusszytometrie

2.6.1 Prinzip

Zur Bestimmung der Expression von Oberflächenmolekülen sowie intrazellulären Zytokinen und Zytokinsekretion von T-Zellsubpopulationen wurde die Durchflusszytometrie verwendet. In der Durchflusszytometrie werden anhand der Analyse der Streueigenschaften und

Fluoreszenz einzelner Zellen die verschiedenen Zelleigenschaften ermittelt. Die Zellen fließen dabei hintereinander durch eine Messkammer und werden von der Seite mit einem Laserlicht angestrahlt. Durch das erzeugte Streulicht lässt sich die Größe und Granularität der Zellen ermitteln. Eine Markierung der Zellen mit fluoreszierenden Antikörpern erlaubt die Bestimmung weiterer Zelleigenschaften. Dazu werden die Zellen mit Antikörpern markiert, die direkt oder über sekundäre Antikörper an Fluoreszenzfarbstoffe gekoppelt sind. Die Intensität des emittierten Lichts ist proportional zu der Menge der gebundenen fluoreszierenden Antikörper. Die verschiedenen Farbstoffe emittieren Licht in nur leicht überlappenden Bereichen, sodass zur Bestimmung verschiedener Merkmale Mehrfachfärbungen möglich sind. Zur Messung der Streuung und Fluoreszenz wurde ein FACS Calibur verwendet. Dort werden die Zellen an zwei Lasern (480nm Argonlaser und 630nm Diodenlaser, 200mW) vorbeigeleitet. Das gestreute und emittierte Licht wird durch ein System von optischen Linsen, Spiegeln, Filtern und Photodetektoren aufgenommen und das optische Signal in ein elektrisches Signal umgewandelt. Das elektrische Signal wird im Computer weiterverarbeitet, was eine graphische und statistische Auswertung der Daten ermöglicht.

2.6.2 Oberflächenfärbung

Etwa 10^6 Zellen wurden in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß aufgenommen und in FACS-Puffer gewaschen. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 50 μ l FACS Puffer resuspendiert. Um eine unspezifische Bindung der Antikörper zu verhindern, wurden die Zellen mit 20 μ g/ml Ratten IgG und 0,75 μ g/ml α -m-Fc-Fragment 10 min bei 4 °C inkubiert. Nach einem erneuten Waschschrift mit FACS-Puffer wurden Primärantikörper zugesetzt und für 10 min in den angegeben Konzentrationen mit den T-Zellen in einem Volumen von 100 μ l inkubiert. Anschließend wurden die Zellen gewaschen und mit einem Sekundärantikörper gefärbt. Vor der Messung erfolgte ein Waschschrift in 1ml FACS-Puffer, danach wurden die T-Zellen in ca. 300 μ l Puffer aufgenommen.

2.6.3 Intrazelluläre Färbung

Für die Analyse der intrazellulären Zytokinexpression wurden die Zellen für vier Stunden mit PMA und Ionomycin stimuliert. PMA ist ein potenter Mitogen, das die T-Zellen stimuliert. Ionomycin wirkt als Ionophor um PMA ins Zellinnere zu schleusen. Zur möglichst hohen intrazellulären Zytokinanreicherung wurde nach zwei Stunden Brefeldin A 5 μ g/ml zu der

Zellsuspension zugesetzt. Brefeldin A blockiert die intrazellulären Transportprozesse und führt zur Akkumulation der exprimierten Zytokine im Golgi-Komplex.

Für die Färbung der intrazellulären Zytokine müssen die markierenden Antikörper die Zellmembran durchdringen können. Zu diesem Zweck wurden die Zellen vor der Färbung fixiert und die Zellmembran permeabilisiert [Assenmacher *et al.* 1994]. Die Fixierung der Zellen erfolgt mittels Formaldehyd, der eine Quervernetzung der Proteine bewirkt. Dazu wurden die Zellen nach der Oberflächenfärbung in PBS gewaschen, dann in 1ml 2 % PFA aufgenommen und für 20 min bei 4 °C inkubiert. Es folgte ein Waschschriff in PBS und anschließend eine Zellmembranpermeabilisierung mit einem Detergenz, Saponin. Die Zellen wurden in 0,5 % Saponinpuffer gewaschen. Alle nachfolgenden Färbeschritte wurden in Saponinpuffer durchgeführt. Vor der endgültigen Färbung wurden die Zellen gewaschen und mit 20µg Ratten IgG und 0,75µg/ml α -m-Fc-Rezeptor blockiert, um unspezifische Antikörper-Bindungen zu verhindern. Der folgende Färbeschritt war identisch zur Oberflächenfärbung. Dabei wurde die unspezifische Bindung bei intrazellulär färbenden Antikörpern mit Hilfe von Isotypen-Kontrollen berücksichtigt. Als Isotypen-Kontrolle wird ein Antikörper der gleichen Klasse mit dem gleichen Flurochromen verwendet, der aber für ein nicht in der Zelle vorkommendes Antigen spezifisch ist. Als weitere Kontrolle kann die Analyse der nur mit Brefeldin A behandelten Zellen (ohne PMA/Ionomycin Stimulation) dienen.

2.6.4 Lebend-Tod-Färbung

Mit der Lebend-Tod-Färbung wird der Anteil der während des Versuchsablaufs abgestorbenen Zellen nachgewiesen. Überschreitet dieser Anteil 2 %, muss von einem schädlichen bzw. toxischen Einfluss der verwendeten Substanzen auf die Zellen ausgegangen werden. Für die Lebend-Tod-Messung wird die Substanz 7AAD (7-Aminoactinomycin D) verwendet. In gesunde Zellen dringt es sehr langsam ein, da eine intakte Zellmembran schnelle Permeation verhindert. Wird die Zelle während des Messvorgangs geschädigt oder getötet, verliert die Zellmembran ihre Funktion als Schutzbarriere. Dies führt zu einer schnellen Diffusion von 7AAD ins Zellinnere, wo es mit DNS interkaliert. Damit wird die Zelle als „tot“ markiert und vom Durchflußzytometer erfasst. Wie FITC und PE wird 7AAD vom Licht des Argonlasers mit 488nm Wellenlänge angeregt. Das Emissionsspektrum von

7AAD (Wellenlängenmaximum 610nm) liegt jedoch weiter im rotem Bereich als von FITC (530nm) und PE (570nm).

2.7 Zwei-Photonen Mikroskopie

In der vorliegenden Arbeit wurden die T-Zellen in lebendem Hirngewebe mit Hilfe eines Zwei-Photonen-Mikroskops visualisiert. In der konventionellen Fluoreszenzmikroskopie wird ein Fluoreszenzfarbstoff (Fluorochrom) durch genau ein energiereiches Photon angeregt. Wegen der energiereichen Strahlung kommt es dabei schnell zum Ausbleichen und zu phototoxischer Schädigung des Untersuchungsobjektes. Die zur Ablenkung des Streulichts eingebaute Blende beschränkt den Beobachtungsfokus auf ein kleines Areal auf der Präparatoberfläche. Die Entwicklung der Zwei-Photonen Mikroskopie, bei der statt eines energiereichen Photons die Fluorochrom - Anregung mit zwei Photonen mit jeweils halber Energie erfolgt, machte eine schonende Untersuchung in der Tiefe des lebenden Gewebes möglich. Die theoretischen Grundlagen des Zwei-Photonen-Effekts wurden von Maria Göppert-Mayer erstmals beschrieben [Maria Göppert-Mayer 1931]. Die Entwicklung leistungsstarker Laser in den 1960er Jahren [Garrett 1961] ermöglichte zwar die Zwei Photonen Anregung, war aber für das biologische Gewebe ungeeignet. Erst mit der Entwicklung der ultra-kurz gepulsten Laser-Systeme 1990 fand das Zwei-Photonen Mikroskop seine Anwendung in der Biomedizin, wo es vor allem für die Untersuchungen am lebenden Gewebe eingesetzt wird [Helmchen and Denk 2002].

2.7.1 Prinzip

In der Zwei-Photonen Mikroskopie wird ein Anregungsphoton durch zwei Photonen ersetzt, wenn diese in der Summe die gleiche Energie haben wie sonst ein Anregungsphoton. In Abbildung 1 wird das Prinzip der Zweiphotonenanregung anhand eines vereinfachten Jablonski-Diagramms dargestellt.

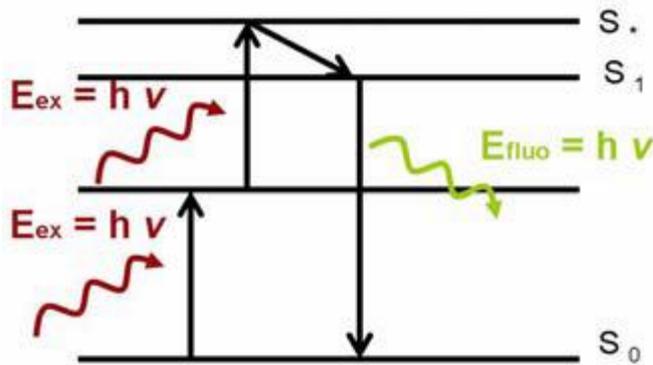


Abb.1 Schematische Darstellung der Zwei-Photonen Anregung (vereinfachtes Jablonski Diagramm). Ein Fluorophor im Ruhezustand (S_0) wird durch simultane Absorption von zwei Photonen mit niedriger Energie (E_{ex}) auf ein instabiles Niveau S_0^* versetzt. Durch die spontane Abgabe von einem energiereichen (E_{fluo}) Photon kehrt der Fluorophor von S_1 in seinen Ausgangszustand S_0 zurück, dabei ist $E_{fluo} \leq 2E_{ex}$.

Zur Anregung eines Fluorochromes müssen die beiden Photone gleichzeitig, innerhalb von $\sim 10^{-16}$ s in das Gewebe eintreffen, was unter normalen Bedingungen ein sehr seltenes Ereignis ist. Um eine Fluoreszenz zu erzeugen, ist daher eine sehr hohe Photonenflußdichte erforderlich, die durch die Fokussierung mittels eines Objektivs mit hoher numerischer Apertur und durch eine hohe Intensität des Laserlichts (mehrere kW/cm^2) erreicht werden kann.

Die für die Zwei-Photonen Mikroskopie verwendeten Laser emittieren Licht, das in sehr kurzen ~ 100 Femtosekunden langen Pulsen, mit einer Frequenz von ~ 80 MHz ausgestrahlt wird. Obwohl ein einziger Puls umgerechnet nur wenige Nanojoule (nJ) Energie hat, erreichen die Spitzenleistungen mehrere Kilowatt (kW). Nur wegen der relativ niedrigen Durchschnittsleistungen kann experimentiert werden, ohne die Probe unter dem Mikroskop zu schädigen. Die Zwei-Photonen-Anregung ist im Quadrat von der Lichtintensität abhängig, sodass nur im Fokuspunkt eine genügend hohe Photonendichte herrscht, um eine Fluoreszenz zu erzeugen. Dies ist von Vorteil, da es zum einen die Phototoxizität und Ausbleichung des umgebenden Gewebes verringert, zum anderen das Objektiv die gesamte Fluoreszenz für das zu erstellende Bild verwenden kann, ohne dass eine Lochblende nötig wäre. Die Detektion der Fluoreszenz findet dichter am Präparat statt, was wiederum ein Auffangen der im Präparat gestreuten Fluoreszenz ermöglicht. Ein weiterer Vorteil der Zwei-Photonen Mikroskopie ist

die höhere Eindringtiefe, die durch geringere Streuung des langwelligen Lichtes erreicht wird und mehrere 100 μm betragen kann (Übersicht bei [Zipfel *et al.* 2003]).

2.7.2 Aufbau

In dieser Arbeit wurde ein Zwei-Photonensystem SP2 von Leica verwendet, das mit einem aufrechten Mikroskop und einem 20 x Wasserimmersionsobjektiv (NA 0,5 Leica) ausgestattet ist. Als Lichtquelle diente ein Titan-Sapphire-Laser (Tsunami, Spectra Physics), der aus einem Pump laser: *solid-state cw laser*, 532nm, 5W (Millennia, Spectra Physics) und einem *mode locked* Titan-Spaphirelaser (Tsunami, Spectra Physics), durchschnittliche Leistung $> 0,7\text{W}$ bei 800nm, Pulslänge $< 100\text{fs}$, nominale Wiederholungsrate 80MHz, Messbereich 720-850nm, besteht. Die Fluoreszenzfarbstoffe FITC-Dextran und CMTMR werden simultan bei 840nm angeregt. Die Fluoreszenz wird durch zwei externe nicht scannende Detektoren (NDD) mit Emissionsfilter bei 500-550nm (grüner Kanal) und bei 550-600nm (roter Kanal) aufgenommen.

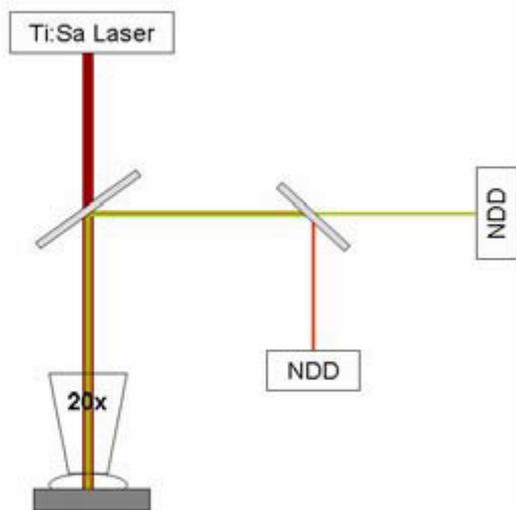


Abb.2: Schematische Darstellung des Zwei-Photonen Mikroskops.

Der Laserstrahl wird durch das Objektiv des Mikroskops auf einen Punkt des Präparats fokussiert und dann durch die im Strahlengang befindlichen beweglichen Spiegel (Scanspiegel; englisch *to scan* = rastern) in seiner Lage so verändert, dass der Fokuspunkt sich durch das Präparat bewegt, dieses also abrastert. Die dabei entstehende Fluoreszenz wird vom Objektiv aufgefangen und über dichroitische Strahlteiler spektral aufgetrennt und schließlich von Detektoren aufgefangen. Die Detektoren, sog. Photomultiplier, messen die

Helligkeit jedes Bildpunktes nacheinander. Das vollständige Bild des Präparats wird erst digital im Steuerungscomputer erstellt.

2.7.3 Messung am Zwei-Photonen Mikroskop

Die Messapparatur wurde durch einen schwingungsgedämpften Tisch (Mikroplan, St.Wendes, Deutschland) vor mechanischen Schwingungen und Erschütterungen der Umgebung abgeschirmt. Für die Messung wurden die Hirnschnitte aus der Inkubationskammer in die auf 37 °C temperierte von Luigs & Neumann erstellte Perfusionskammer unter das Objektiv transferiert und mit einem selbstgebauten Nylonnetz am Boden fixiert. Die Perfusionskammer wurde kontinuierlich langsam mit einem vorgewärmten und mit 5 % CO₂, 95 % O₂ begastem ACSF durchspült. Anschließend wurden 150.000 CMTMR gefärbte T-Zellen in 5µl Kulturmedium aufgenommen und auf den Hirnschnitt direkt pipettiert. Nach 30 min Adaptation wurde mit den Messungen begonnen. Für die Experimente mit Antigenen wurden die entsprechenden Peptide zur ACSF zugesetzt und über die Pumpe auf dem Hirnschnitt gleichmäßig verteilt. Über den Zeitraum von mindestens einer Stunde wurde jede Minute in einem Bereich von 50-200µm Tiefe alle 1,8µm ein Bild aufgenommen.

Die erstellten Bildersequenzen wurden mit dem Programm Volocity von Improvision rekonstruiert und die Zellbewegung im dreidimensionalen (XYZ) Schnitt über die Zeit (t) beobachtet und ausgewertet. Nur die Zellen, die über 5 min verfolgt werden konnten, wurden in die Auswertung eingeschlossen. Zur Bewertung der Zellbewegung wurden mit Hilfe des Programms Volocity die mittlere Geschwindigkeit, die Entfernungsrates und der Abweichungsindex der einzelnen Zellpfade berechnet. Die statistische Auswertung erfolgte mit SigmaPlot (SyStat) SPSS (SPSS) und GraphPad Prism 5.

3 Ergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das unterschiedliche Migrationsverhalten der CD4⁺ und CD8⁺T-Zellen in Gegenwart des spezifischen und unspezifischen Antigens mit Hilfe der Zwei-Photonen Mikroskopie analysiert. Zur Beobachtung des T-Zellverhaltens im lebenden Hirngewebe wurden akute organotypische, hippokampale Hirnschnitte benutzt, die in ihrer mittleren Schicht die charakteristische Struktur des neuronalen Gewebes beibehalten [Misgeld und Frotscher1982].

Die in dieser Arbeit verwendeten aktivierten OT1- und OT2-Zellen wanderten dynamisch in das kompakte Hirngewebe ein und stellten damit ein geeignetes Model für die Untersuchungen der T-Zellbewegung am Zwei-Photonen Mikroskop dar.

3.1 T-Zellen

3.1.1 OT1 Zellen

Die CD8⁺T-Zellen wurden aus einer OT1 Maus isoliert, deren T-Zellen einen für OVA₂₅₇₋₂₆₄ Peptid spezifischen transgenen α/β T-Zell-Rezeptor tragen und ihr Antigen im Kontext von H-2Kb-Komplex erkennen [Hogquist *et. al* 1994]. Nach fünf Tagen der Stimulation mit 25nM OVA₂₅₇₋₂₆₄ unter Kulturbedingungen (Abb. 1) ließen sich mehr als 80 % lebende T-Zellen nachweisen. Davon waren >98% CD8⁺. Die stimulierten CD8⁺T-Zellen zeichneten sich durch die Expression von proinflammatorischen Zytokinen wie z.B. IFN- γ Produktion aus.

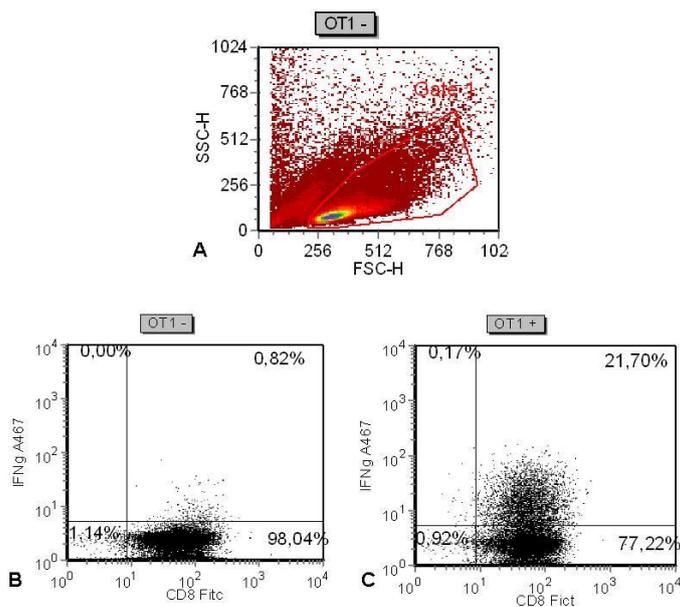


Abb. 1: FACS-Analyse der OT1 Zellen 5 Tage nach der Stimulation mit OVA₂₅₇₋₂₆₄ (unstimulierte OT1- versus PMA-stimulierte OT1+ Zellen). Prozentangaben beziehen sich auf den Lymphozytenbereich im FSC und SSC im FACS. B. 98,04% der T-Zellen sind CD8+. C. 21,7% der CD8+T-Zellen produzieren IFN γ .

3.1.2 OT2 Zellen

Die CD4+T-Zellen wurden aus OT2 Mäusen isoliert, die einen für OVA₃₂₃₋₃₃₉ Peptid spezifischen transgenen α/β T-Zell-Rezeptor tragen und ihr Antigen OVA₃₂₃₋₃₃₉ im Kontext von MHC-II Molekülen erkennen [Barnden *et. al* 1998]. Während direkt nach der Isolierung aus der Milz nur ca. 20 % der T-Zellen CD4+ waren, waren unter Zellkulturbedingungen fünf Tage nach der Stimulation mit 0,3 μ M OVA₃₂₃₋₃₃₉ 96,3 % CD4+ (Abb.2). Die gerichtete Ausdifferenzierung der OT-2 Zellen in die Th1 Subpopulation erfolgte durch Zugabe von IL-12 und IL-2; eine Th2-Differenzierung wurde durch blockierende Anti-IL-4 Antikörper verhindert. Dies führte zur Differenzierung der CD4+T-Zellen mit einer Produktion des Th1-Zytokins IFN- γ .

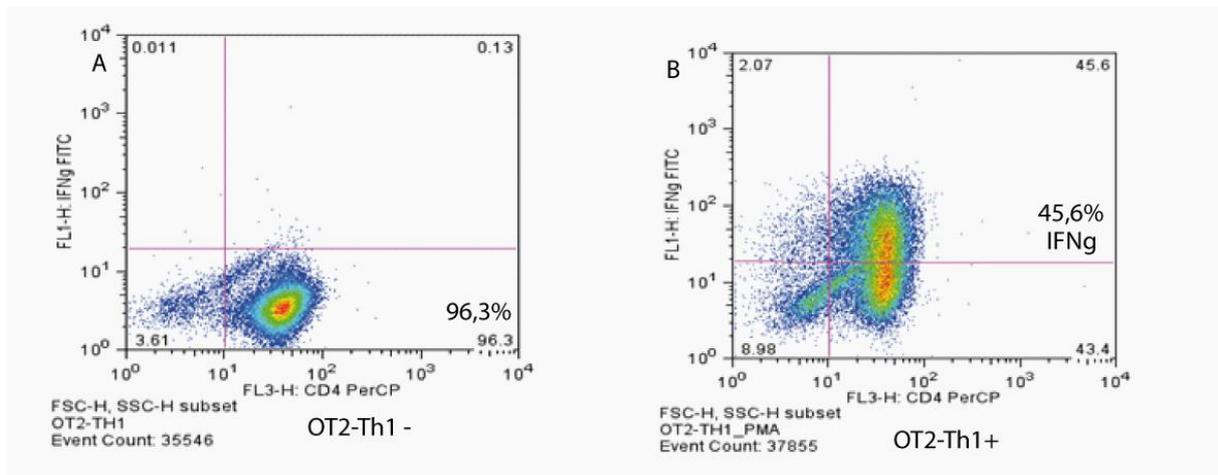


Abb. 2: FACS-Analyse der unstimulierten (A) und PMA-stimulierten (B) OT2-Th1-Zellen. Prozentangaben beziehen sich auf den Lymphozytenbereich im FSC und SSC im FACS.

3.2 Bewegungsparameter der T-Zellen

Zur Analyse des Bewegungsmusters der T-Zellen in akuten Hirnschnitten werden Parameter verwendet, die vor allem bei der Beobachtung der T-Zell-Bewegung im Lymphknoten entwickelt wurden [Sumen *et al.* 2004]. Im Rahmen dieser Arbeit wurden zur Beschreibung des Migrationsverhaltens der T-Zellen ihre mittlere momentane Geschwindigkeit, die mittlere

Geschwindigkeit, Entfernungsrates und der Abweichungsindex berechnet. Diese Parameter wurden anschließend miteinander verglichen. Dies erlaubte die Bewertung des Migrationsverhaltens der T-Zellen unter verschiedenen Versuchsbedingungen.

3.2.1 Geschwindigkeit

Die momentane T-Zellgeschwindigkeit wurde als Quotient aus der Strecke und dem entsprechenden Zeitintervall (60s - 240s) berechnet. Die mittlere momentane Geschwindigkeit wurde daraus als Mittelwert der momentanen Geschwindigkeit aller T-Zellen zu einem Zeitpunkt abgeleitet. Somit konnte die Änderung der T-Zell - Geschwindigkeit während der gesamten Beobachtungszeit registriert werden. Die mittlere momentane Geschwindigkeit eignete sich gut für die Bestimmung des zeitlichen Verlaufs der T-Zell Reaktion auf das zugegebene Antigen.

Die mittlere T-Zellgeschwindigkeit wurde als Quotient aus der gesamten Strecke (μm), die *eine* T-Zelle zurücklegte, und der entsprechenden Zeit(s) berechnet.

Faktoren wie Temperatur und Sauerstoffsättigung des Hirngewebes die die T-Zellgeschwindigkeit beeinflussen, wurden während der Experimente konstant gehalten. Da der Aktivierungszustand der T-Zellen ebenfalls auf die T-Zellgeschwindigkeit Einfluss nimmt, wurden in dieser Arbeit die T-Zellen zwischen Tag vier und acht nach der Antigen-Stimulation für die Zwei-Photonen Mikroskopie verwendet.

3.2.2 Entfernungsrates

Die Entfernungsrates wurde als Quotient aus der Entfernung, d.h. der linearen Distanz zwischen Start- und Endpunkt, und $(\text{Zeitpunkte}-1) \times \text{Zeit}$ berechnet. Die Zellen, die innerhalb einer kurzen Zeit lange Strecken zurücklegten, zeigten die größte Entfernungsrates. Mit diesem Parameter wurden vor allem die T-Zellen erfasst, die sich sehr schnell bewegten.

3.2.3 Abweichungsindex

Dieser Parameter ermittelte, wie stark die T-Zellbewegungspfade von der Geraden abweichen. Der Abweichungsindex wurde als Quotient der Entfernung, also der linearen Distanz zwischen Start- und Endpunkt und der Länge des Bewegungspfad, den die Zelle zurückgelegt hatte, berechnet. Je stärker die Abweichung, desto geringer der Abweichungsindex. Die Zellen, die sich im Prozess der Antigenerkennung befanden oder mit

den umgebenden Zellen in Kontakt traten, hatten einen niedrigen Abweichungsindex, d.h. sie änderten häufig ihre Bewegungsrichtung. Die gerichtete Bewegung der Zellen, z.B. entlang eines chemotaktischen Gradienten, zeichnete sich dagegen durch einen hohen Abweichungsindex (mit Höchstwert 1) aus [Cahalan und Parker 2008].

3.2.4 Bewertung der Zellbewegung

In dieser Arbeit wurde die Wirkung der spezifischen und unspezifischen Antigene auf das Bewegungsmuster der CD4+ und CD8+T-Zellen untersucht. Die charakteristische Änderung der Bewegungsparameter im Rahmen einer Antigenerkennung im Lymphknoten und ZNS wurde bereits in mehreren Publikationen beschrieben [Miller *et al.* 2002b] [Kawakami *et al.* 2005b] [Wilson *et al.* 2009]. Zur Auswertung unserer Experimente legten wir Kriterien fest, die eine objektive Bewertung des T-Zellbewegungsmusters unter verschiedenen Bedingungen erlaubten. Zu diesem Zweck wurden sowohl visuelle Informationen von den Aufnahmen mit Zwei-Photonen-Mikroskop als auch die berechneten Bewegungsparameter benutzt. Die Reaktion der T-Zellen auf ein Antigen wurde nur dann als spezifisch gewertet, wenn eine statistisch hoch signifikante Reduktion in allen berechneten Bewegungsparametern (mittlere und momentane T-Zellgeschwindigkeit, Entfernungsrate, Abweichungsindex) eintrat. In der visuellen Bewertung musste die Mehrheit der T-Zellen ein für Antigenerkennung typisches Bewegungsmuster (Abrundung des Zellkörpers, kreisende Bewegungen an der Stelle) aufweisen. Die davon abweichenden Reaktionen wurden als unspezifisch bewertet.

3.3 Bewegungsmuster der T-Zellen im ZNS

3.3.1 CD8+T-Zellen

Innerhalb der ersten 30 min wanderten die meisten CD8+OT1-Zellen tief in das Hirnparenchym ein. Ein geringer Teil der OT1-Zellen blieb an der Hirnschnittoberfläche haften. Die Mehrheit der CD8+OT1-Zellen bewegte sich schnell und ungerichtet durch das kompakte Hirngewebe mit einer mittleren Geschwindigkeit von $0,052 \pm 0,0007 \mu\text{m/s}$ (Daten aus 808 Zellbewegungsvektoren von 3 Experimenten). Die mobilen OT1 Zellen stießen dabei ihre breitere Vorderflanke (*leading edge*) vorwärts und zogen das Hinterteil (*Uropodium*) hinterher. Dieser T-Zellbewegungsmuster wurde bereits *in vivo* und *in vitro* beschrieben [Hugues *et al.* 2004] [Negulescu *et al.* 1996]. Einige T-Zellen bewegten sich Torpedo-artig, schraubend durch das kompakte Hirngewebe.

Ergebnisse

Die Auswertung der mittleren T-Zellgeschwindigkeit zeigte, dass $89,1 \% \pm 0,23 \%$ der OT1 Zellen sich über die gesamte Beobachtungszeit dauernd in der Bewegung befanden. Die restlichen $10,9 \% \pm 0,23 \%$ der OT1-Zellen bewegten sich sehr langsam ($< 0,024 \mu\text{m/s}$) und wurden als stationäre OT1 Zellen bezeichnet. Die stationären OT1-Zellen hatten eine abgerundete Zellform und blieben entweder an der Oberfläche oder nach einer kurzen Einwanderungszeit tiefer im Hirnschnitt an einer Stelle haften (siehe Abb.3).

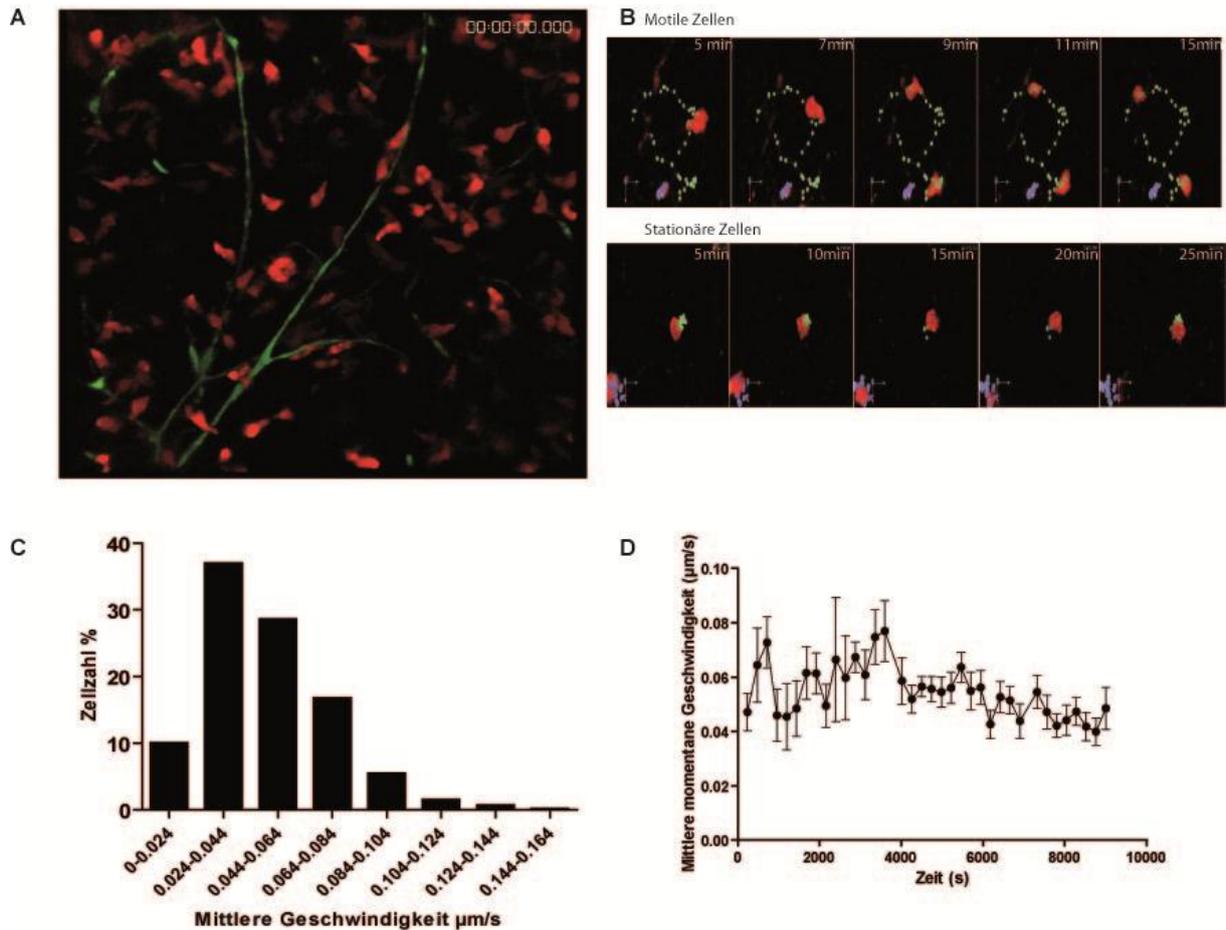


Abb. 3: Bewegungsmuster der CD8+OT1-Zellen im lebenden Hirngewebe. **A.** Ungerichtete Bewegung der OT1 Zellen im Hirnparenchym. Zwei-Photonen Mikroskopie zeigt CMTMR gefärbte OT1 Zellen (rot) in der mittleren Schicht des Hirnschnitts. Gefäße sind mit FITC-Dextran gefüllt (grün). **B.** Schnell wandernde OT1 Zellen (oben) mit breiteren vorderen Flanke (*leading edge*) und Uropod. Stationäre OT1 Zellen (unten) kreisen mit abgerundetem Zellkörper an einer Stelle herum. **C.** Geschwindigkeitsprofil der OT1 Zellen im Hirnschnitt.

D. Die mittlere momentane Geschwindigkeit der OT1 Zellen pro Zeitpunkt \pm Standardfehler des Mittelwerts.

Die Auswertung der mittleren Geschwindigkeit, der Entfernungsrates sowie des Abweichungsindex der OT1 Zellen am Anfang und Ende der Messung zeigten keine signifikante Änderung der Parameter (MWU-Test). Mit der Zeit wanderten immer mehr OT1 Zellen in das Hirngewebe ein (Abb.4).

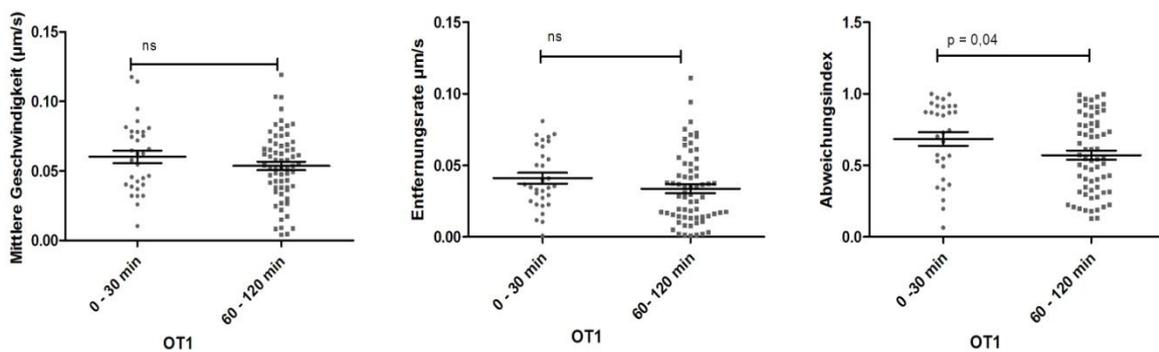


Abb. 4: Bewegungsparameter der OT1 Zellen. Mittlere Geschwindigkeit, Entfernungsrates und Abweichungsindex (MWU-Test).

3.3.2 CD4+T-Zellen

Die CD4+OT2-Th1 Zellen wanderten wie OT1 Zellen innerhalb der ersten 30 min nach dem Transfer auf den Hirnschnitt in das Hirngewebe ein. Im Gegensatz zu den OT1 Zellen zeigten sie jedoch eine gerichtete Migration zu den Gefäßen, wie bereits beschrieben bei [Siffrin *et al.* 2009]. Die OT2-Th1 Zellen bewegten sich mit einer mittleren Geschwindigkeit von $0,065 \pm 0,001 \mu\text{m/s}$ (Auswertung von 589 Zellbewegungsvektoren aus 4 Experimenten) schneller als OT1 Zellen. Die Zunahme der mittleren momentanen Geschwindigkeit nach ca. 1,3h (siehe Abb.6) war mit der Bewegung der OT2 Zellen an den Gefäßen verbunden. Die Auswertung der Bewegungsparameter der OT2 Zellen am Anfang und Ende der Messung zeigte ebenfalls eine signifikante Zunahme der mittleren Geschwindigkeit gegen Ende der Messung (siehe Abb.5). Die mittlere momentane Geschwindigkeit der im Hirnparenchym wandernden OT1 Zellen blieb dagegen über die gesamte Beobachtungszeit weitgehend unverändert bzw. verringerte sich nur geringfügig im Laufe der Zeit (siehe Abb.6).

Ergebnisse

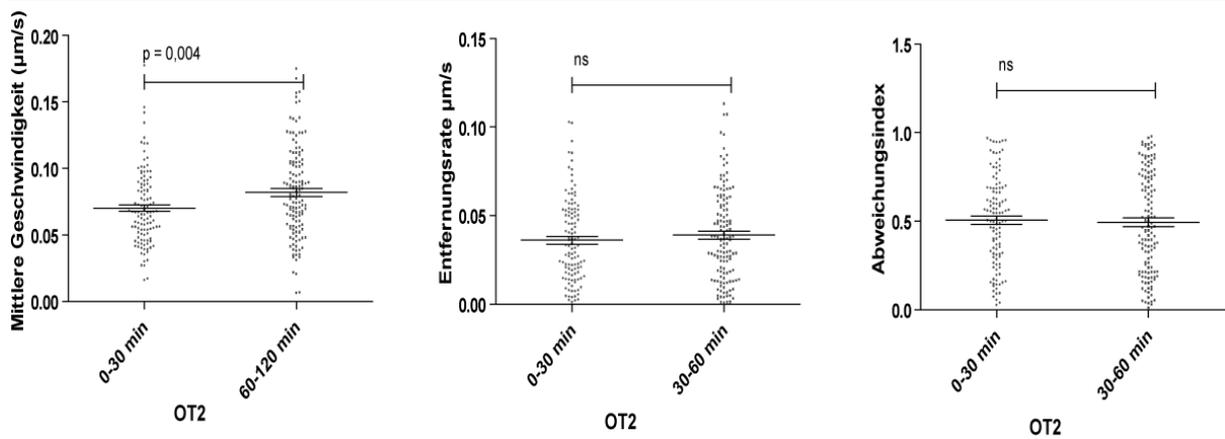


Abb. 5: Bewegungsparameter der OT2 Zellen (statistische Auswertung mit MWU-Test)

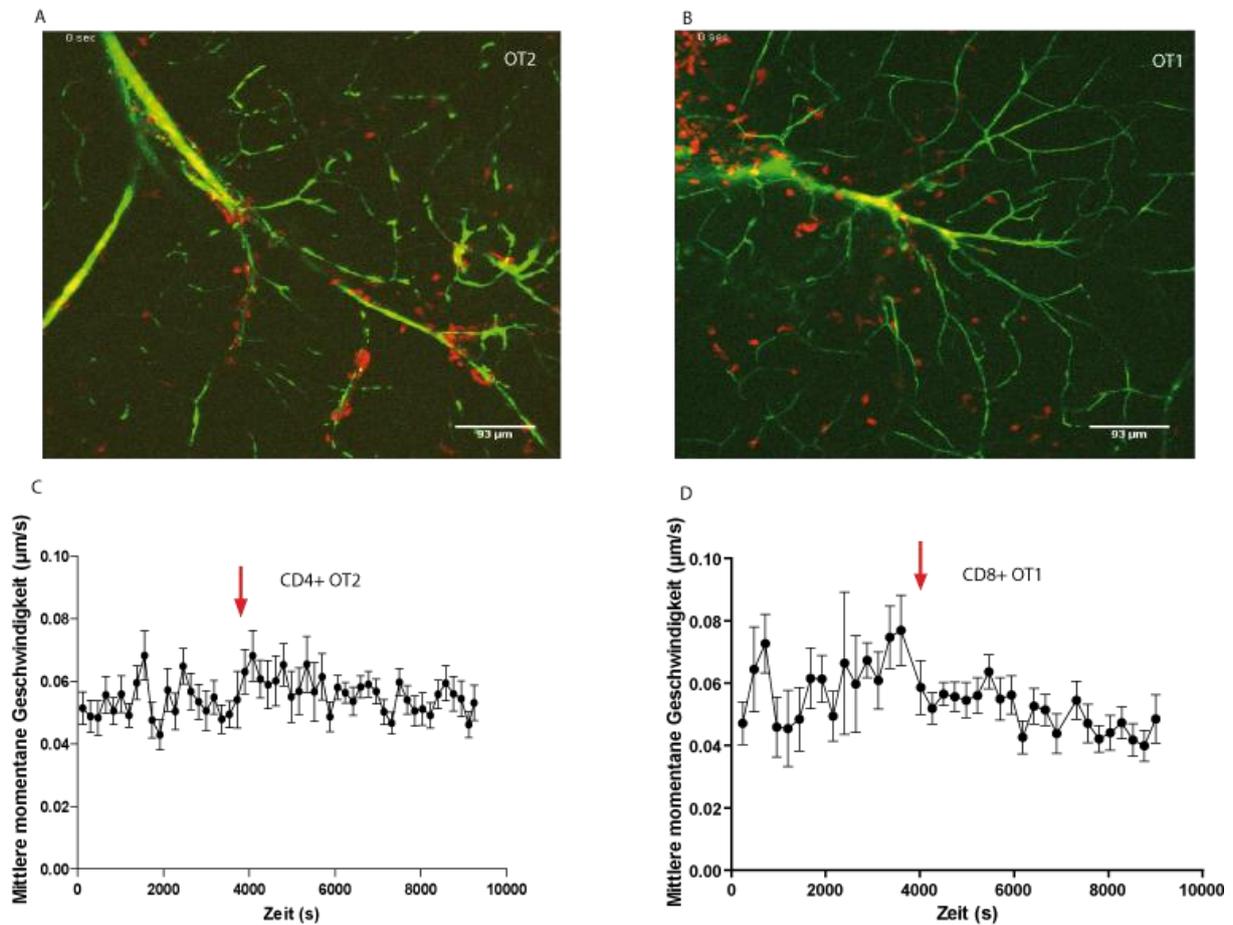


Abb. 6: Bewegungskarakteristika der CD4+OT2-Th1 und CD8+OT1 Zellen. **A.** OT2-Zellen bewegen sich vorwiegend entlang der Gefäße. **B.** OT1-Zellen wandern im Hirnparenchym. **C- D.** Geschwindigkeitsprofil der CD4+ und CD8+T-Zellen im Zeitverlauf. Mittlere Geschwindigkeit pro Zeitpunkt \pm Standardfehler des Mittelwerts. **C.** OT2-Th1 Zellen bewegen sich nach der Einwanderungszeit von ca. 1,3h hauptsächlich an den Gefäßen, was

sich in der Erhöhung der Zellgeschwindigkeit widerspiegelt (roter Pfeil). **D.** Die OT1-Zellen bewegen sich nach der Einwanderung in das Hirnparenchym etwas langsamer (roter Pfeil). Repräsentative Daten aus 3 Experimenten pro Zellpopulation.

Unter den eingewanderten OT2-Th1 Zellen waren $94,1\% \pm 2,8\%$ in dauernder, schneller Bewegung, während $5,9\% \pm 2,8\%$ der Zellen stationär blieben, d.h. sich mit einer mittleren Geschwindigkeit von weniger als $0,024\mu\text{m/s}$ bewegten. In der Verteilung der mittleren Geschwindigkeit von OT2-Th1 und OT1 Zellen gab es ebenfalls Unterschiede. So bewegte sich der größte Anteil der OT2-Th1 Zellen mit einer Geschwindigkeit zwischen $0,044\text{--}0,064\mu\text{m/s}$ wogegen bei OT1 Zellen der Großteil der Zellen mit einer Geschwindigkeit zwischen $0,024\text{--}0,044\mu\text{m/s}$ wanderte. Der Anteil der Zellen, die sich sehr schnell ($> 10,4\mu\text{m/s}$) bewegten, war ebenfalls bei OT2-Th1 Zellen größer als bei OT1 Zellen (siehe Abbildung 7).

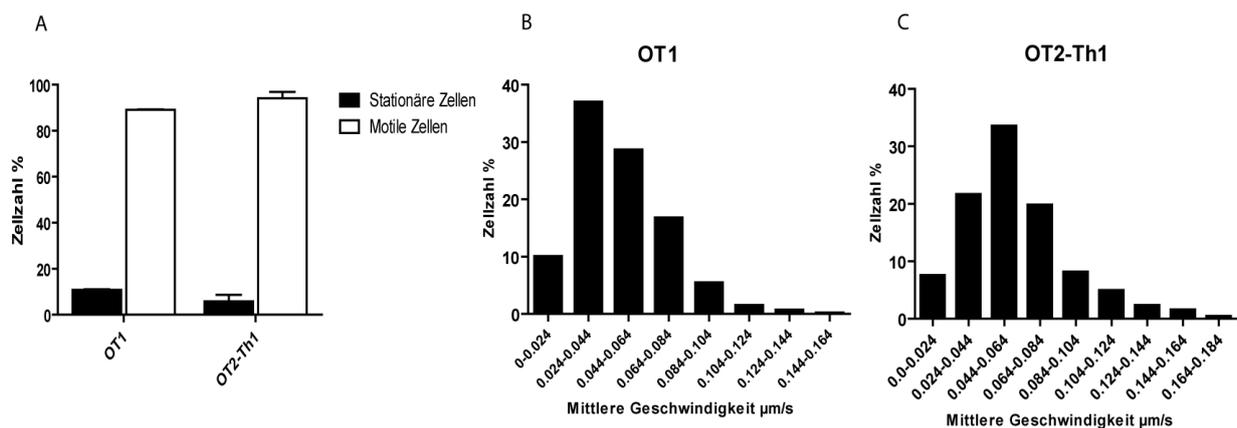


Abb. 7: Geschwindigkeitsverteilung der OT2-Th1 und OT1 Zellen. **A.** $5,9\% \pm 2,8\%$ der OT2-Th1 Zellen und $10,9\% \pm 0,2\%$ der OT1 Zellen waren stationär ($v < 0,024\mu\text{m/s}$). **B.** Geschwindigkeitsverteilung bei OT1 Zellen, $36,9\%$ der Zellen bewegten sich zwischen $0,024\text{--}0,044\mu\text{m/s}$. **C.** Geschwindigkeitsverteilung der OT2-Th1 Zellen: $33,5\%$ der Zellen bewegten sich zwischen $0,044\text{--}0,064\mu\text{m/s}$.

3.4 Antigenerkennung im ZNS

3.4.1 Spezifisches Antigen

Im Rahmen der Antigenerkennung kommt es zu einer charakteristischen Bewegungsänderung der T-Zellen. Sobald die T-Zellen ihr Antigen erkennen, verlangsamen sie stark ihre Bewegungsgeschwindigkeit und runden sich ab. In unserer Arbeit untersuchten wir das

Bewegungsverhalten der CD8⁺- und CD4⁺T-Zellen in Gegenwart ihres spezifischen Antigens im nicht-entzündeten Hirngewebe. Um eine gleichmäßige Antigenverteilung im Hirngewebe zu erreichen, wurden die Antigenlösungen jeweils in die Perfusionsflüssigkeit, den künstlichen Liquor (ACSF), direkt pipettiert. Die Zugabe der Antigene erfolgte nachdem die T-Zellen bereits in das Hirngewebe eingewandert waren.

3.4.1.1 OT1-Zellen und OVA 257-264

Die Zugabe des OVA₂₅₇₋₂₆₄ Peptids (CD8 OVA) hatte einen sofortigen Effekt auf das Migrationsverhalten der OT1 Zellen. Es reichte bereits eine 25nM Konzentration des OVA₂₅₇₋₂₆₄-Peptids, um die OT1-Zell-Reaktion auf das Antigen auszulösen. Wenige Minuten (< 10 min) nach der Zugabe des OVA₂₅₇₋₂₆₄-Peptids kam es zu einer rapiden Reduktion der OT1-Zellgeschwindigkeit. Die Zellen rundeten sich ab und kreisten an einer Stelle herum. Der Anteil der stationären OT1 Zellen erhöhte sich von 10,3 % ± 0,6 % ohne Antigen auf 69,4 % ± 5,7 % nach OVA-Zugabe. 20 Minuten nach Antigenzugabe waren fast alle beobachteten OT1-Zellen stationär und verharrten in diesem Zustand über die gesamte Aufnahmezeit. Die erfolgten (>3) Wiederholungen des Experiments zeigten das gleiche Ergebnis.

Ergebnisse

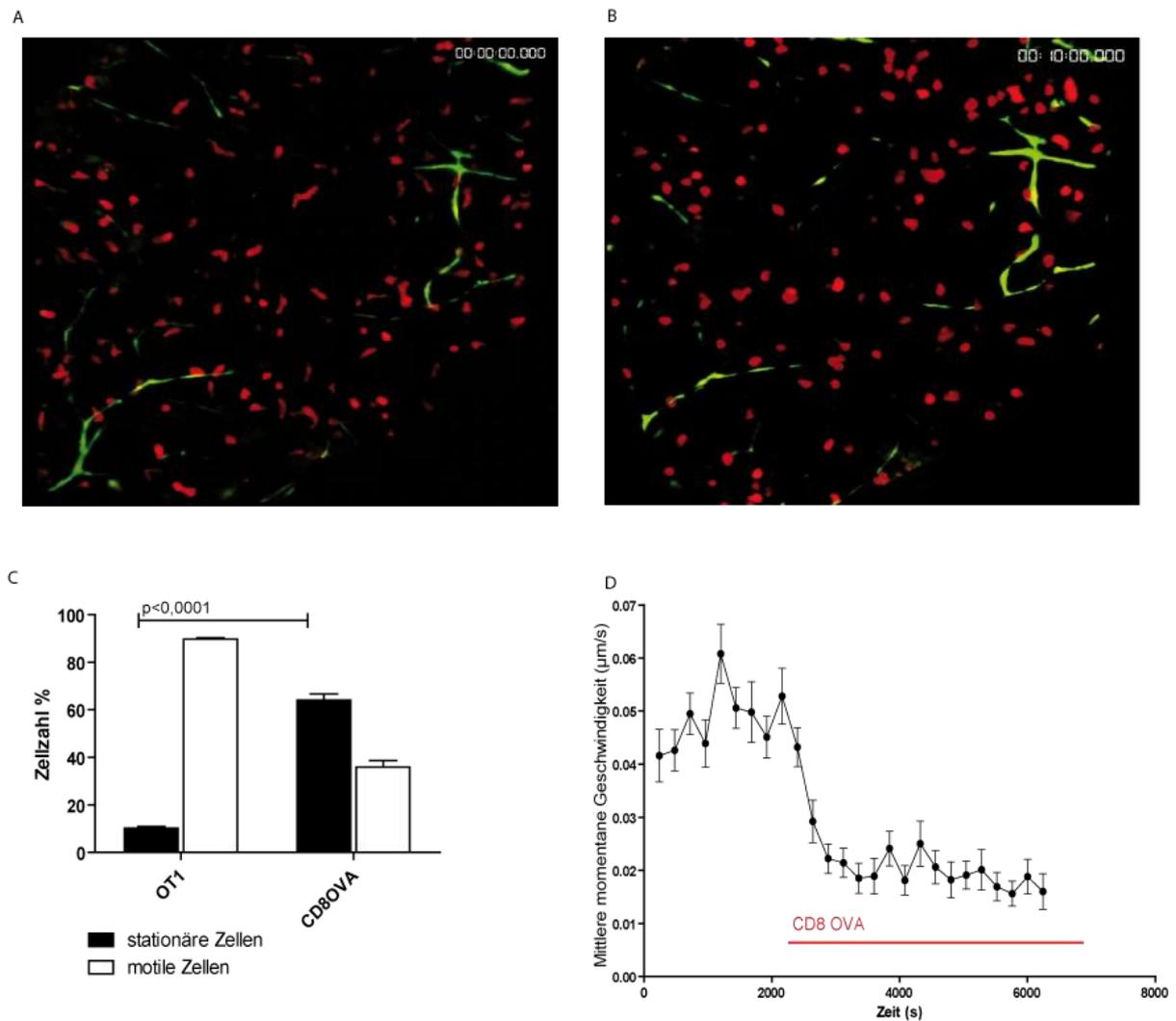


Abb. 8: OT1 Zellen und das spezifische Antigen, statistische Auswertung mit MWU-Test. **A.** OT1 Zellen vor und **B.** 10 min nach der OVA₂₅₇₋₂₆₄-Zugabe. Zwei-Photonen Mikroskopie, repräsentative Daten von 3 Filmaufnahmen. **C.** Der Anteil der stationären OT1 Zellen nach der Antigenzugabe ist signifikant höher im Vergleich zur Kontrolle ohne Antigen. **D.** Die mittlere momentane Geschwindigkeit der OT1 Zellen pro Zeitpunkt (alle 3min). Die rote Linie bezeichnet die Phase nach der OVA₂₅₇₋₂₆₄ Zugabe. Die mittlere momentane Geschwindigkeit in der Bewegungsphase: $0,049 \pm 0,001 \mu\text{m/s}$; nach der Peptid-Zugabe: $0,020 \pm 0,001 \mu\text{m/s}$. Die Daten sind als Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwerts aus 172 Zellbewegungsvektoren dargestellt.

Die Änderung des Migrationsverhaltens der OT1 Zellen nach Zugabe des OVA₂₅₇₋₂₆₄-Peptids entsprach der spezifischen Reaktion der T-Zellen auf das Antigen. Die Reduktion der mittleren momentanen Geschwindigkeit der OT1 Zellen nach OVA₂₅₇₋₂₆₄ Zugabe von

Ergebnisse

0,049±0,001µm/s auf 0,020±0,001µm/s erwies sich im MWU-Test als statistisch hochsignifikant ($p < 0,0001$). Ferner führte die Antigenzugabe zu einer hoch signifikanten ($p < 0,0001$ im MWU-Test) Reduktion aller Bewegungsparameter der OT1 Zellen. Die mittlere Geschwindigkeit fiel von $0,051 \pm 0,001\mu\text{m/s}$ auf $0,0175 \pm 0,0006\mu\text{m/s}$ nach OVA₂₅₇₋₂₆₄ - Zugabe und die Entfernungsrates von $0,032 \pm 0,001\mu\text{m/s}$ auf $0,0069 \pm 0,0004\mu\text{m/s}$. Da OT1 Zellen nach Antigenzugabe vorwiegend um einen Punkt kreisten, sind die Werte des Abweichungsindex von $0,59 \pm 0,012$ auf $0,36 \pm 0,013$ gesunken (Daten aus 3 Experimenten, Auswertung von 675 Zellbewegungsvektoren siehe Abb. 9).

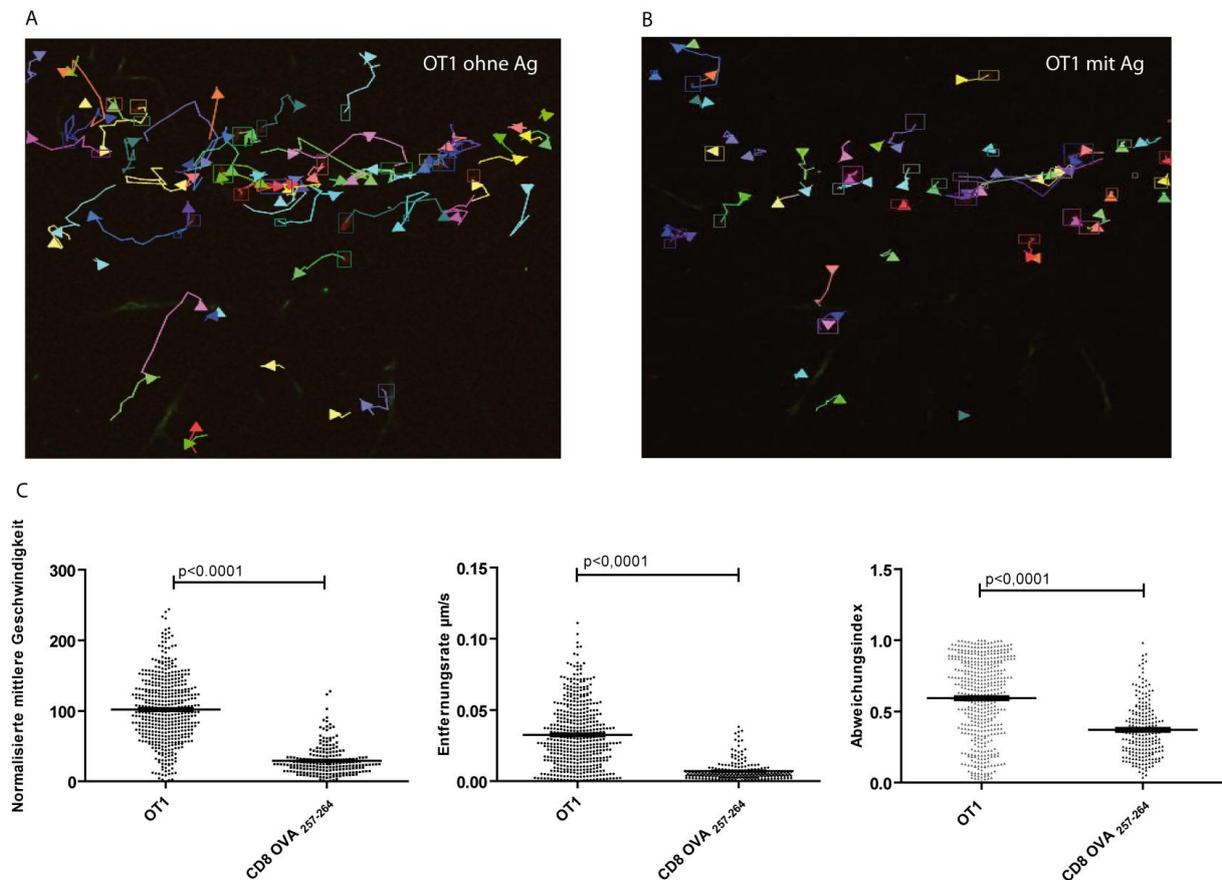


Abb. 9: OT1-Zellen vor und nach Antigenzugabe (OVA₂₅₇₋₂₆₄). **A-B.** Zellbewegungsvektoren vor und nach Antigenzugabe in der Zwei-Photonen Mikroskopie. **C.** Auswertung der normalisierten mittleren Zellgeschwindigkeit, der Entfernungsrates und des Abweichungsindex. Die Veränderungen nach Antigenzugabe sind statistisch hoch signifikant ($p < 0,0001$) in allen 3 Parametern im MWU-Test.

3.4.1.2 OT2-Th1 und OVA323-339

Die Zugabe des spezifischen Peptids OVA₃₂₃₋₃₃₉ (CD4 OVA) hatte keinen ausgeprägten Effekt auf die Bewegung der OT2-Th1 Zellen. Die Peptid-Zugabe erfolgte in verschiedenen Konzentrationen, bis zu 20faches der Zellkulturkonzentration. Die Auswertung der Bewegungsparameter zeigte, dass zwar der Anteil der stationären OT2-Th1-Zellen sich von 5,9 % ± 2,8 % ohne Antigen auf 17,2 % ± 4,08 % mit Antigen erhöht hatte, blieb die mittlere Geschwindigkeit nach OVA₃₂₃₋₃₃₉-Zugabe unverändert ($0,060 \pm 0,001$ vor und $0,059 \pm 0,001$ nach Antigenzugabe, siehe Abb.10). Die Entfernungsrates fiel von $0,031 \pm 0,0009$ auf $0,027 \pm 0,001$ nach der Antigenzugabe geringfügig ab. Die stärkste Veränderung zeigte der Abweichungsindex, der von $0,53 \pm 0,011$ auf $0,44 \pm 0,013$ nach Antigenzugabe gesunken ist (Auswertung der Bewegungsparameter von 969 Zellbewegungsvektoren aus 3 unabhängigen Experimenten, MWU-Test).

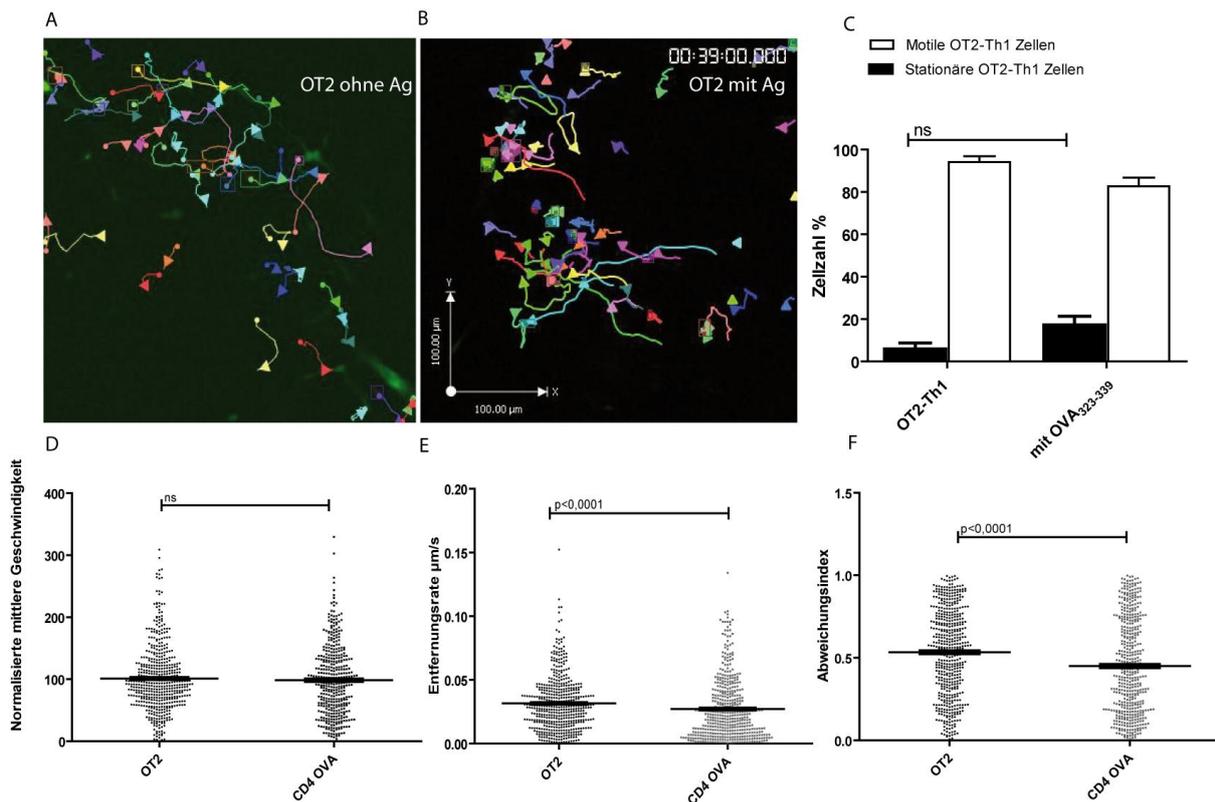


Abb. 10: OT2 Zellen und das spezifische Antigen. Zellbewegungsvektoren der OT2-Th1 Zellen vor (A) und nach (B) OVA₃₂₃₋₃₃₉ - Zugabe. C. Anteil der stationären Zellen (< 0,024µm/s) bei OT2-Th1 Zellen vor und nach Antigenzugabe, kein signifikanter Unterschied im Mann-Whitney-U-(MWU-)Test. D-F. Normalisierte mittlere

Geschwindigkeit, Entfernungsrate, Abweichungsindex der OT2-Th1 Zellen vor und nach Antigenzugabe (CD4 OVA), statistische Auswertung mit MWU-Test.

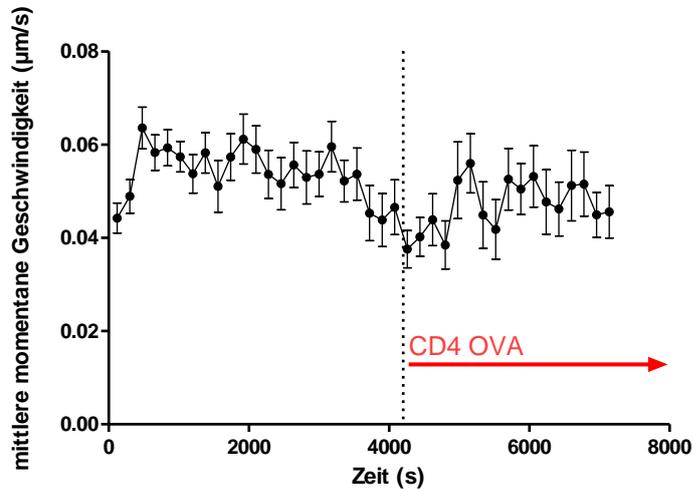


Abb. 11: Mittlere momentane Geschwindigkeit der OT2-Th1 vor und nach Antigenzugabe. Die rote Linie markiert die Zeit nach Zugabe des OVA₃₂₃₋₃₃₉-Peptids (CD4 OVA).

Die Auswertung der mittleren momentanen Geschwindigkeit der OT2-Th1 Zellen zeigte eine gering signifikante Reduktion der Geschwindigkeit von $0,052 \pm 0,0008 \mu\text{m/s}$ auf $0,048 \pm 0,001 \mu\text{m/s}$ nach CD4-OVA-Zugabe (MWU-Test, $p=0,03$). In der visuellen Auswertung der Filmaufnahmen der Zwei-Photonen Mikroskopie zeigte sich keine Veränderung des Migrationsverhaltens der OT2 Zellen nach Zugabe des spezifischen Antigens.

3.4.2 Unspezifisches Antigen

Zur Kontrolle der Spezifität der T-Zell-Reaktion auf ihr Antigen wurden Untersuchungen mit einem unspezifischen Antigen durchgeführt.

3.4.2.1 OT2 Zellen und MOG 40-54

Das Peptid MOG₄₀₋₅₄ stammt vom ZNS-Antigen Myelin Oligodendrozyten Protein (MOG). Das Myelin Oligodendrozyten Protein (MOG) wird fast ausschließlich im ZNS exprimiert. Trotz seines sehr geringen Anteils am Myelinprotein von ca. 0,05 % - 0,01 % hat es eine dominante immunogene Wirkung und dient in bestimmten Mausstämmen zur Induktion von T-Zell-vermittelter Neuroinflammation [Wekerle 1999].

Ergebnisse

Die visuelle Auswertung der Zwei-Photonen Mikroskopie Aufnahmen nach MOG₄₀₋₅₄-Zugabe zeigte, verglichen mit den Kontrollaufnahmen ohne Antigen, keine Änderung des Migrationsverhaltens der OT2-Th1 Zellen. Die OT2-Th1 Zellen bewegten sich nach ca. 1h Einwanderungszeit vorwiegend an den Gefäßen. Nach MOG₄₀₋₅₄-Zugabe wurde keine sichtbare Änderung der Geschwindigkeit oder Vermehrung der stationären Zellen beobachtet. Die Auswertung der Bewegungsparameter ergab keine hochsignifikanten Änderungen nach der Antigenzugabe. Die mittlere Geschwindigkeit der OT2-Th1 Zellen ist nach MOG₄₀₋₅₄-Zugabe von $0,056 \pm 0,001 \mu\text{m/s}$ auf $0,049 \pm 0,002 \mu\text{m/s}$ gesunken ($p=0,01$ im MWU Test). Die Entfernungsratesrate fiel geringfügig von $0,031 \pm 0,001 \mu\text{m/s}$ auf $0,027 \pm 0,001 \mu\text{m/s}$. Der Abweichungsindex blieb beinahe unverändert: $0,54 \pm 0,019$ vor und $0,52 \pm 0,027$ nach MOG₄₀₋₅₄ - Zugabe (nichtsignifikante Änderungen im MWU-Test, Daten aus 2 Experimenten, Auswertung von 297 Zellbewegungsvektoren). Die mittlere momentane Geschwindigkeit veränderte sich kaum ($0,047 \pm 0,001 \mu\text{m/s}$ vor und $0,046 \pm 0,0007 \mu\text{m/s}$ nach der Zugabe des MOG₄₀₋₅₄ Peptids, nicht signifikant im MWU-Test).

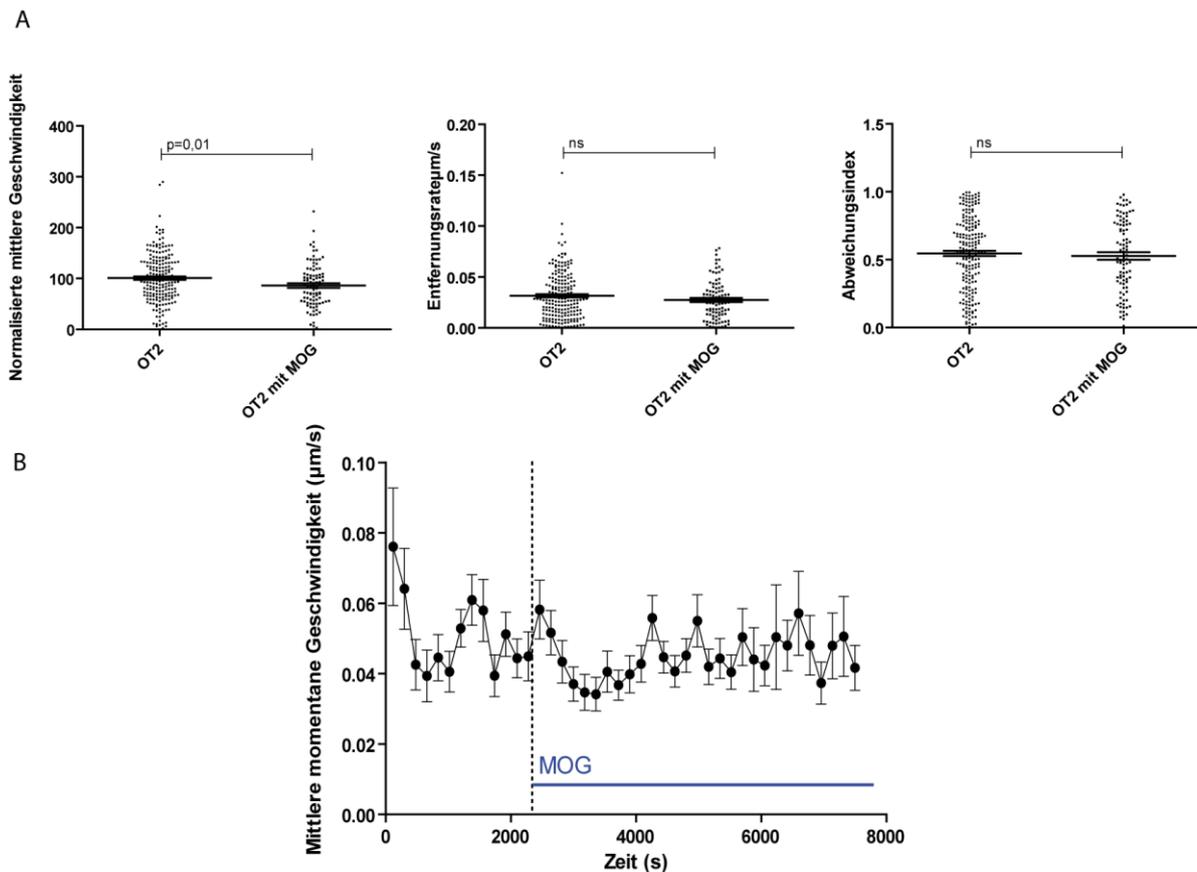


Abb. 12: OT2-Th1 und das unspezifische Antigen MOG₄₀₋₅₄. **A.** Bewegungsparameter der OT2-Th1 Zellen mit MOG₄₀₋₅₄ im Vergleich zur OT1 Kontrolle ohne Antigen. Horizontale

Linie zeigt den Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwerts. **B.** Mittlere momentane Geschwindigkeit der OT2-Th1 Zellen, die blaue Linie markiert die Zeit nach MOG₄₀₋₅₄ Zugabe. Daten aus 2 Experimenten, 297 Zellbewegungsvektoren. Statistische Auswertung mit MWU-Test.

In der visuellen Auswertung der Zwei-Photonen Aufnahmen wurden keine Änderungen des Migrationsverhaltens der OT2-Th1 Zellen nach MOG₄₀₋₅₄ -Zugabe beobachtet. Aufgrund dieser Auswertungen lässt sich aussagen, dass die Zugabe eines unspezifischen Antigens MOG₄₀₋₅₄ keine Änderung des Migrationsmusters der OT2-Th1 Zellen bewirkte.

3.4.2.2 OT1 und OVA 323-339

Die Zugabe des OVA₃₂₃₋₃₃₉ (CD4-OVA) bewirkte ebenfalls keine signifikanten Veränderungen in der Migration der OT1-Zellen.

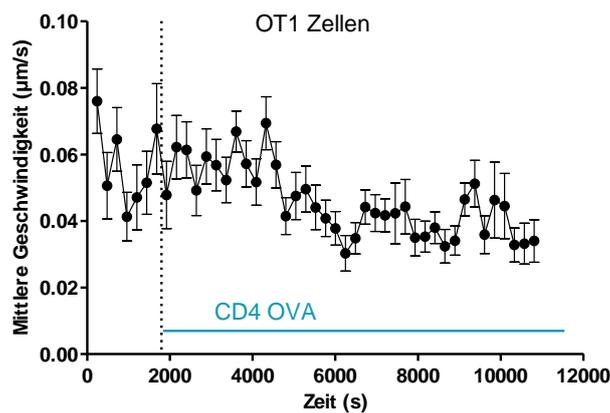


Abb. 13: Mittlere momentane Geschwindigkeit der OT1 Zellen. Die blaue Linie markiert CD4-OVA Zugabe.

Die mittlere momentane Geschwindigkeit der OT1 Zellen verringerte sich gering signifikant von $0,55 \pm 0,004$ auf $0,047 \pm 0,001$ (MWU-Test $p=0,032$) (Abb. 13). Der Anteil der stationären Zellen war mit $10,9\% \pm 0,23\%$ versus $13,1\% \pm 3,8\%$ nach CD4-OVA Zugabe nicht signifikant erhöht. Die mittlere Zellgeschwindigkeit ist von $0,054 \pm 0,001\mu\text{m/s}$ auf $0,048 \pm 0,0018\mu\text{m/s}$ nach der CD4-OVA -Zugabe gesunken ($p=0,006$ im MWU-Test). Die Entfernungsrates fiel von $0,037 \pm 0,001$ auf $0,031 \pm 0,001$ nach Antigenzugabe ($p = 0,02$ im MWU-Test). Der Abweichungsindex betrug $0,66 \pm 0,017$ vor und $0,61 \pm 0,023$ nach CD4OVA-Zugabe (siehe Abb. 14).

Ergebnisse

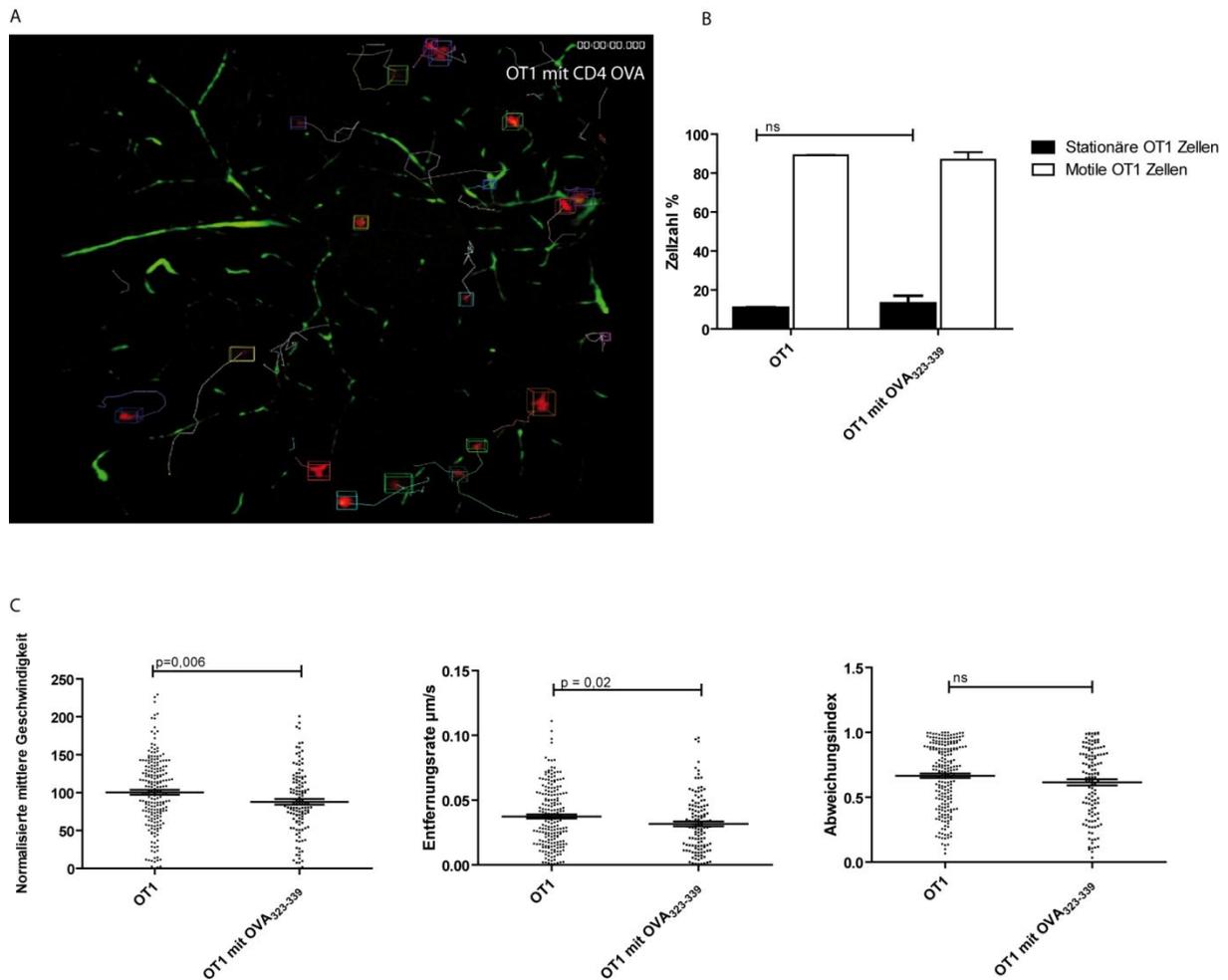


Abb. 14: OT1 Zellen und das unspezifische Antigen OVA₃₂₃₋₃₃₉. **A.** Zwei-Photonen Mikroskopie der OT1 Zellen (rot) nach OVA₃₂₃₋₃₃₉ Zugabe mit aufgezeichneten Zellbewegungspfaden. **B.** Der Anteil der stationären und motilen OT1 Zellen vor und nach Antigenzugabe. **C.** Normalisierte mittlere Geschwindigkeit, **D.** Entfernungsrates, **E** Abweichungsindex. Daten aus 3 unabhängigen Experimenten, 338 Zellbewegungsvektoren \pm Standardfehler des Mittelwerts (SEM), statistische Auswertung mit MWU-Test.

In der visuellen Auswertung der Aufnahmen des Zwei-Photonen Mikroskops konnte kein für Antigenerkennung typisches Zellverhalten beobachtet werden. Die Zellen wanderten vergleichbar den Kontrollaufnahmen quer durch das Hirngewebe. Die statistisch signifikante Reduktion der mittleren Zellgeschwindigkeit und der Entfernungsrates aber keine signifikante Änderung des Abweichungsindex der OT1 Zellen in Anwesenheit des unspezifischen Antigens erfüllten nicht die Kriterien für eine spezifische Reaktion der T-Zellen auf das Antigen. Das unveränderte Migrationsmuster der OT1 Zellen nach OVA₃₂₃₋₃₃₉-Zugabe in der visuellen Auswertung sprachen ebenfalls für eine unspezifische bzw. fehlende Reaktion der

CD8⁺ OT1 Zellen. Das Peptid CD4-OVA induzierte unter Zellkulturbedingungen ebenfalls keine signifikante Proliferation der OT1-Zellen (Abb. 20).

3.4.2.3 OT1 und MOG 40-54

Das Kontroll-Antigen MOG₄₀₋₅₄ wurde analog zu den anderen Antigenen in der OT1-T-Zell-Hirnschnitt-Kokultur getestet. Das MOG₄₀₋₅₄ Peptid wurde in verschiedenen Konzentrationen zur Perfusionsflüssigkeit zugegeben, angefangen mit einfacher Zellkultur - Konzentration (27µM), dann gesteigert auf das 4fache (108µM) und 8fache (216µM) der Kulturkonzentration. Überraschenderweise löste die Zugabe des MOG Peptids eine spezifische Reaktion der OT1 Zellen aus, die mit der Erhöhung der Antigenkonzentration stärker wurde.

3.4.2.3.1 MOG 40-5: 27µM

Die Zugabe des MOG₄₀₋₅₄ in einfacher Kulturkonzentration (27µM) zu den OT1 Zellen bewirkte nur geringe Änderungen in allen Bewegungsparametern. Es wurde aber eine verstärkte Migration der OT1 Zellen zu den Gefäßen beobachtet, die in Kontrollaufnahmen ohne Antigen nicht auftrat. Die mittlere Geschwindigkeit der OT1 Zellen änderte sich nicht signifikant nach MOG₄₀₋₅₄ Zugabe (von $0,054 \pm 0,001 \mu\text{m/s}$ auf $0,052 \pm 0,002 \mu\text{m/s}$ nach der Peptidzugabe). Die Entfernungsrates verringerte sich statistisch signifikant von $0,037 \pm 0,001 \mu\text{m/s}$ auf $0,029 \pm 0,002 \mu\text{m/s}$ ($p=0,0003$ im MWU-Test). Die hochsignifikante Reduktion des Abweichungsindex von $0,66 \pm 0,017$ auf $0,51 \pm 0,026$ ($p < 0,0001$ im MWU-Test) bestätigte die visuelle Beobachtung, dass OT1 Zellen in Gegenwart des MOG₄₀₋₅₄ Peptids sich mit der Zeit vermehrt an den Gefäßverzweigungen versammelten. Die beschriebenen Veränderungen in den Bewegungsparametern und in der visuellen Beobachtung deuteten auf eine Reaktion der OT1 Zellen, die nicht zufällig auftrat (siehe Abb.15). Es wurden daher weitere Experimente mit höheren Konzentrationen des MOG₄₀₋₅₄ Peptids durchgeführt.

Ergebnisse

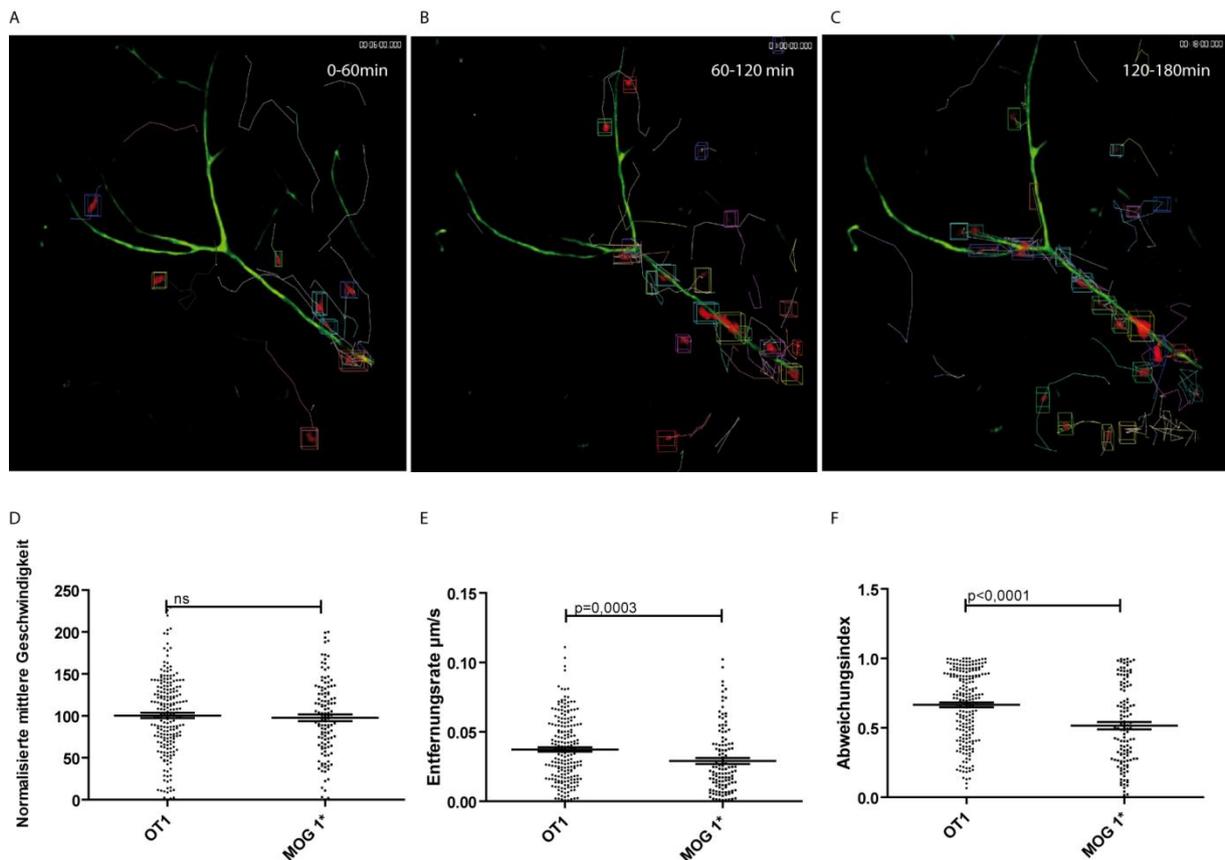


Abb. 15: OT1 Zellen und das unspezifische Antigen MOG_{40-54} . **A-C.** Zwei-Photonen Mikroskopie mit Aufzeichnung der Zellbewegungspfade. **A.** OT1 Zellen ohne MOG , **B.** 60min und **C.** 120min nach MOG_{40-54} Zugabe. Ca.30 min nach MOG_{40-54} Zugabe wurde eine vermehrte Migration der OT1 Zellen zu den Gefäßen beobachtet. **D-F** Normalisierte mittlere Geschwindigkeit, Entfernungsrates und Abweichungsindex. Die statistische Auswertung erfolgte mit MWU-Test. Der Balken zeigt den Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwerts. Die Daten wurden von 3 Experimenten aus 332 Zellbewegungsvektoren berechnet.

3.4.2.3.2 MOG_{40-54} : $108\mu\text{M}$

Die Zugabe des MOG_{40-54} Peptids in 4-facher Zellkulturkonzentration bewirkte eine eindeutige Änderung des Migrationsverhaltens der OT1 Zellen. Im Gegensatz zur $\text{OVA}_{257-264}$ -Zugabe wurden aber nicht alle beobachteten OT1 Zellen nach MOG_{40-54} Zugabe an Ort und Stelle immobil. Erst ca. 60 min nach MOG_{40-54} Zugabe verringerten die OT1 Zellen ihre Geschwindigkeit, rundeten sich ab und blieben an einer Stelle haften. In der visuellen Auswertung der Zwei-Photonen Mikroskopie wurden in den ersten 30 min nach MOG_{40-54} Zugabe keine auffälligen Veränderungen des T-Zellverhaltens festgestellt. Nach ca. 60 min

Ergebnisse

kam es zu einer deutlichen Änderung der T-Zellmigration: mehrere Zellen rundeten sich ab und bewegten langsam um einen Punkt, meistens eine Gefäßstruktur, herum. Nach 90 min waren fast alle Zellen im Blickfeld stationär und befanden sich hauptsächlich in der Gefäßnähe. Die mittlere momentane Geschwindigkeit der OT1 Zellen verringerte sich gegen Ende der Beobachtungszeit signifikant (von $0,1023 \pm 0,002 \mu\text{m/s}$ auf $0,041 \pm 0,001 \mu\text{m/s}$, $p < 0,0001$, MWU-Test, Abb. 16C). Die Auswertung der Bewegungsparameter zeigte weniger starke Veränderungen, da die schnell wandernden Zellen erst gegen Ende der Beobachtungszeit ihr Bewegungsmuster signifikant änderten.

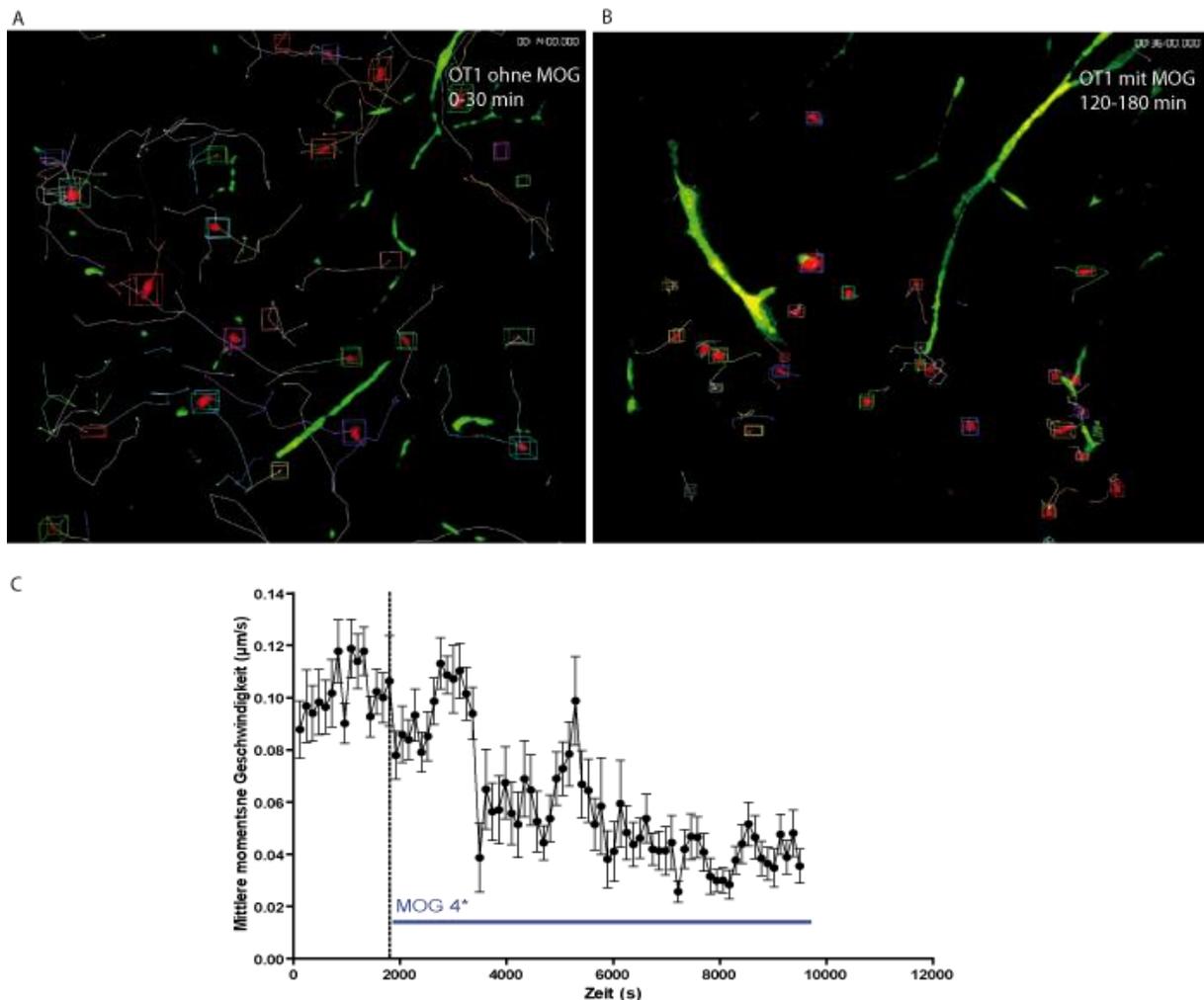


Abb. 16: OT1 Zellen und MOG₄₀₋₅₄ in 4facher Kulturkonzentration. **A-B.** Zwei-Photonen Mikroskopie der OT1 Zellen **A.** vor und **B.** 90 min nach Antigenzugabe, die Zellbewegungspfade sind aufgezeichnet. **C.** Mittlere momentane Zellgeschwindigkeit pro Zeitpunkt (alle 3min) \pm Standardfehler des Mittelwerts. Nach MOG₄₀₋₅₄Zugabe erfolgte eine langsame Reduktion der mittleren momentanen Zellgeschwindigkeit. Da nicht alle OT1

Ergebnisse

Zellen (vgl. OT1 mit OVA₂₅₇₋₂₆₄) stationär blieben, gab es größere Geschwindigkeitsschwankungen.

Die mittlere Geschwindigkeit nach MOG₄₀₋₅₄ - Zugabe blieb weitgehend unverändert ($0,054 \pm 0,001 \mu\text{m/s}$ vor und $0,056 \pm 0,003 \mu\text{m/s}$ nach Peptidzugabe). Obwohl die meisten OT1 Zellen sich mit einer Geschwindigkeit unterhalb des Mittelwerts bewegten, gab es einige Zellen, die eine sehr hohe Geschwindigkeit entwickelten, was den Mittelwert beeinflusste. Die Entfernungsrates fiel von $0,037 \pm 0,001$ auf $0,030 \pm 0,003$ nach Antigenzugabe ($p = 0,0029$ im MWU-Test).

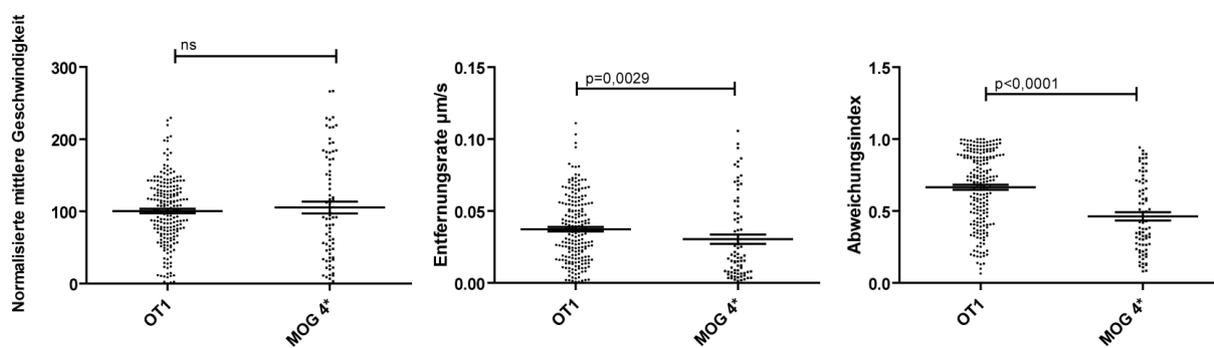


Abb. 17: Bewegungsparameter der OT1 Zellen nach MOG₄₀₋₅₄-Zugabe in 4 facher Zellkulturkonzentration. Daten von 288 Bewegungsvektoren \pm Standardfehler des Mittelwerts aus 2 Experimenten, statistische Auswertung mit MWU-Test.

Der Abweichungsindex verringerte sich hochsignifikant von $0,66 \pm 0,017$ auf $0,46 \pm 0,028$ nach MOG₄₀₋₅₄ Zugabe (MWU-Test, $p < 0,0001$). Die beschriebenen Veränderungen der Bewegungsparameter sowie des Bewegungsmusters in der visuellen Auswertung der OT1 Zellen nach MOG₄₀₋₅₄ -Zugabe unterstützten die Annahme, dass die OT1 Zellen, zwar mit einer zeitlichen Verzögerung von ca. 1h, aber spezifisch auf das Antigen MOG₄₀₋₅₄ reagierten.

3.4.2.3.3 MOG40-54: 216 μM

Die Zugabe des MOG₄₅₋₅₄ Peptids in 8facher Zellkulturkonzentration löste, vergleichbar dem spezifischen Antigen OVA₂₅₇₋₂₆₄, eindeutige und schnelle Änderungen des Bewegungsmusters der OT1-Zellen sowohl in der visuellen Beobachtung als auch in allen Bewegungsparametern aus. Innerhalb der ersten 20 min nach MOG₄₀₋₅₄Zugabe kam es zu einer dramatischen Reduktion der Zellgeschwindigkeit. Die OT1 Zellen rundeten sich ab und blieben an einer

Ergebnisse

Stelle haften. Die Auswertung der Bewegungsparameter zeigte, dass die Werte der mittleren Geschwindigkeit von $0,054 \pm 0,001$ auf $0,015 \pm 0,001$ (MWU-Test, $p < 0,0001$), der Entfernungsrates von $0,037 \pm 0,001 \mu\text{m/s}$ auf $0,007 \pm 0,0008 \mu\text{m/s}$ und des Abweichungsindex von $0,66 \pm 0,017$ auf $0,43 \pm 0,031$ (MWU-Test $p < 0,0001$) nach Antigenzugabe gesunken sind.

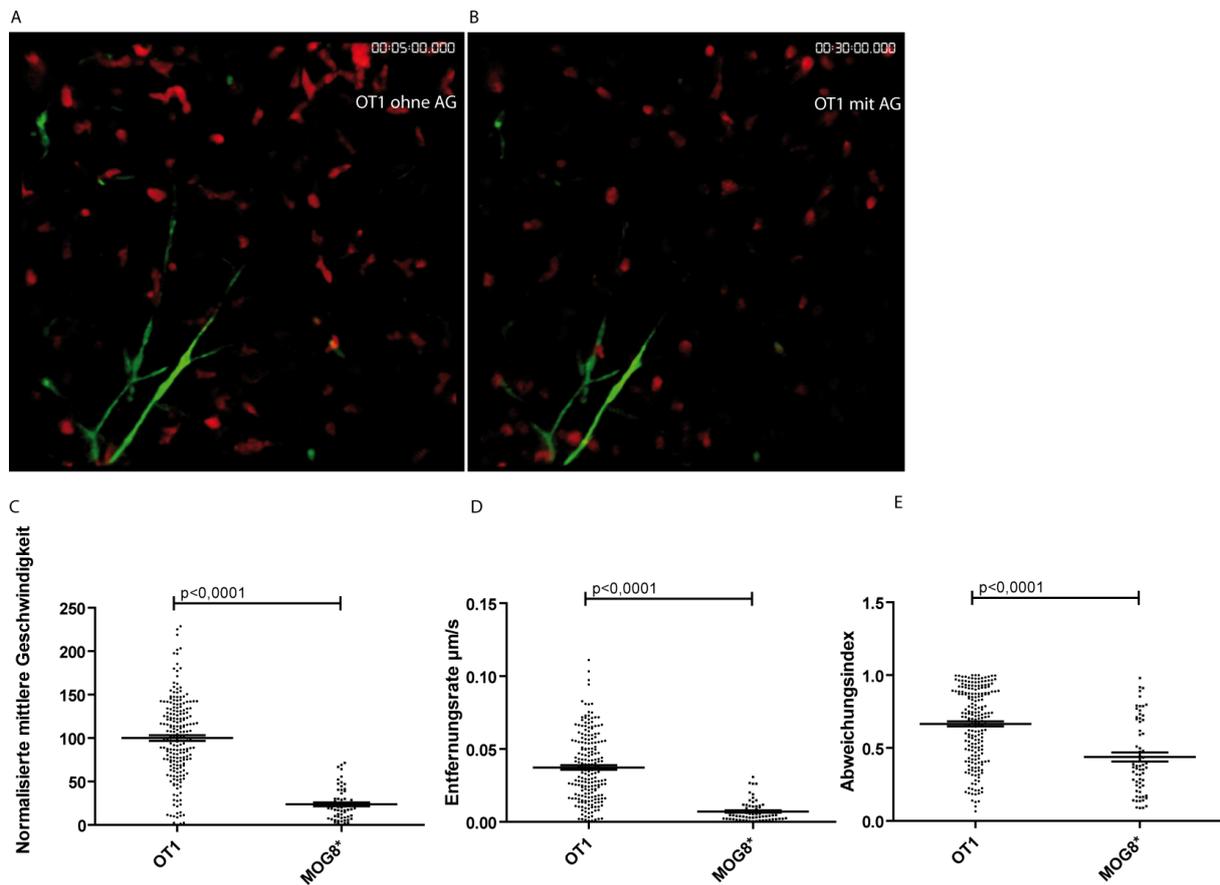


Abb. 18: OT1 Zellen nach MOG_{40-54} Zugabe in 8 facher Zellkulturkonzentration. **A-B** Zwei-Photonen Mikroskopie der OT1 Zellen (**A**) vor und (**B**) nach MOG_{40-54} Zugabe. **C-D** Auswertung der Bewegungsvektoren. Daten von 276 Bewegungsvektoren \pm Standardfehler des Mittelwerts aus 3 repräsentativen Experimenten, statistische Auswertung mit MWU-Test.

Die Abb. 19 zeigt die Veränderung der momentanen OT1 Zellgeschwindigkeit nach Antigenzugabe im zeitlichen Verlauf. Die statistisch hochsignifikante Reduktion der mittleren momentanen Geschwindigkeit von $0,053 \pm 0,0009 \mu\text{m/s}$ auf $0,012 \pm 0,001 \mu\text{m/s}$ erfolgte innerhalb der ersten 20 min nach MOG_{40-54} Zugabe (MWU-Test, $p < 0,0001$).

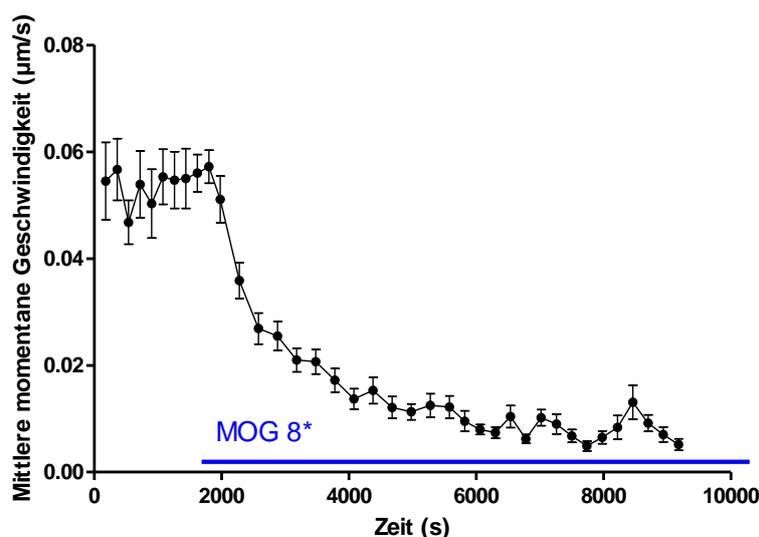


Abb. 19: Geschwindigkeitsprofil der OT1 Zellen nach MOG₄₀₋₅₄ Zugabe in 8 fache Kulturkonzentration. Die blaue Linie zeichnet die Zeit nach der Antigenzugabe.

3.4.3 Kreuzreaktivität der OT1 Zellen

Zur Überprüfung, ob die OT1 - Zellen mit dem MOG₄₀₋₅₄ Peptid kreuzreagieren, wurde ein im Methodenteil beschriebener Proliferationsassay durchgeführt. Dabei wurden die OT1 Zellen mit vier verschiedenen Peptidantigenen: OVA₂₅₇₋₂₆₄, OVA₃₂₃₋₃₃₉, MOG₄₀₋₅₄ und MOG₃₅₋₅₅ inkubiert. Wie erwartet zeigten OT1 Zellen in Gegenwart von OVA₂₅₇₋₂₆₄ die höchste Proliferationsrate, die bei allen Peptid - Konzentrationen (12,5, 25 und 50nM) im Vergleich zur Kontrolle ohne Peptid hochsignifikant waren (t-Test, $p < 0,001$). Die Zugabe des MOG₄₀₋₅₄ Peptids in verschiedenen Konzentrationen (13,5, 27, 54μM) bewirkte eine etwas geringere aber ebenfalls statistisch signifikante Proliferation der OT1 Zellen im Vergleich zur Kontrolle. Die Zugabe des OVA₃₂₃₋₃₃₉ Peptids sowie des MOG₃₅₋₅₅ löste keine signifikante Proliferation der OT1 Zellen aus. Somit zeigte sich, dass OT1 Zellen mit dem MOG₄₀₋₅₄ Peptid kreuzreagieren, was die spezifische Reaktion der OT1 Zellen auf MOG₄₀₋₅₄ Zugabe in der Zwei Photonen Mikroskopie erklärt.

Ergebnisse

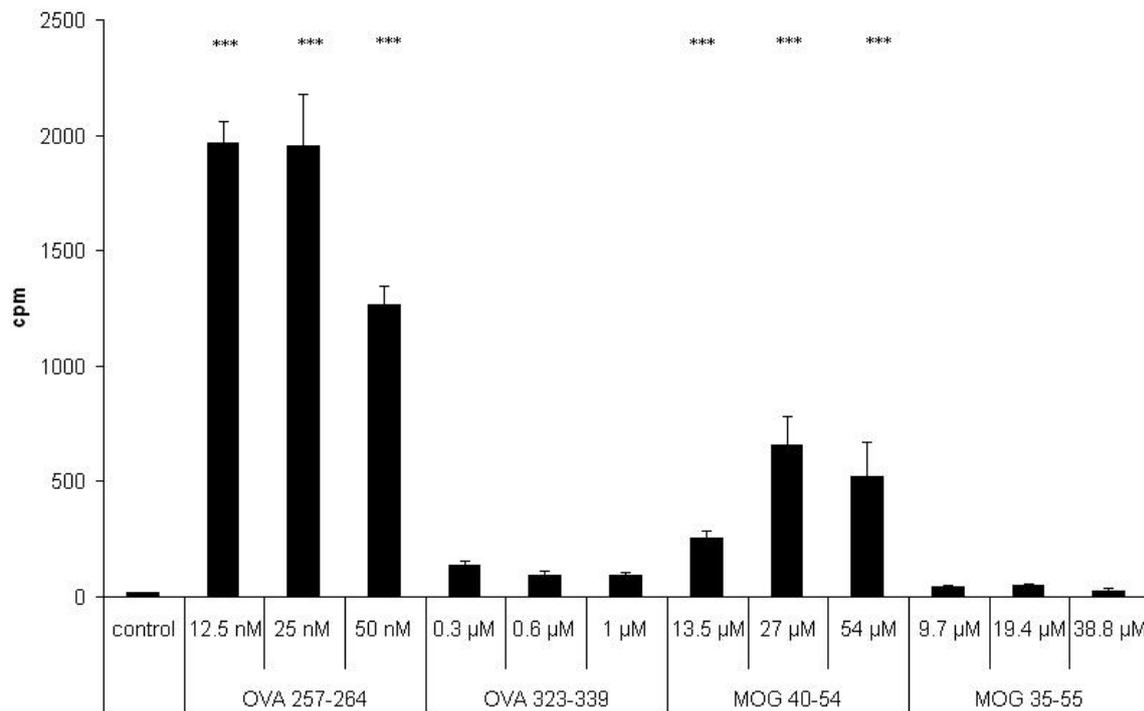


Abb. 20: Zellproliferationsassay. OT1 Zellen wurden mit 4 unterschiedlichen Peptiden (OVA₂₅₇₋₂₆₄, OVA₃₂₃₋₃₃₉, MOG₄₀₋₅₄ und MOG₃₅₋₅₅) in verschiedenen Konzentrationen inkubiert. Die Radioaktivität nach ³H-Thymidin Inkorporation wurde nach 18h gemessen und als die Mittlere Ereigniszahl pro Minute (cpm) ± Standardabweichung jeweils von 3 Experimenten dargestellt.

3.4.4 Proteinantigen

Im Gegensatz zu den Peptid-Antigenen müssten Proteinantigene aufgrund ihrer molekularen Größe erst prozessiert werden, um an den MHC-Molekülen präsentiert zu werden. Mit dem Ovalbumin-Gesamtprotein überprüften wir die Auswirkungen eines Proteinantigens auf das Migrationsverhalten der CD8⁺ T-Zellen. Interessanterweise bewirkte die Ovalbuminzugabe eine konzentrationsabhängige Änderung des Bewegungsmusters der OT1 Zellen im Hirngewebe. Die Auswertung der Bewegungsparameter zeigte eine hochsignifikante Reduktion der mittleren Zellgeschwindigkeit (von $0,054 \pm 0,001 \mu\text{m/s}$ auf $0,032 \pm 0,001 \mu\text{m/s}$ bei der 8-fachen und auf $0,034 \pm 0,001 \mu\text{m/s}$ bei 20-fachen Zellkulturkonzentration, MWU-Test, $p < 0,0001$) und der Entfernungsrates (von $0,037 \pm 0,001$ auf $0,023 \pm 0,001$ (8-fache Konzentration) und auf $0,020 \pm 0,001$ (20-fache Konzentration), MWU-Test $p < 0,0001$). Eine hochsignifikante Reduktion des Abweichungsindex von $0,66 \pm 0,017$ auf $0,52 \pm 0,026$

Ergebnisse

(MWU-Test $p < 0,0001$) wurde nur bei der 20-fachen Konzentration des Ovalbumins festgestellt (Auswertung von 449 Zellbewegungsvektoren aus 3 Experimenten). Die mittlere momentane Geschwindigkeit verringerte sich nach Ovalbumin-Zugabe nicht so stark wie es bei dem spezifischen Antigen beobachtet wurde, der Unterschied war jedoch im Vergleich zur Kontrolle signifikant (von $0,053 \pm 0,0018 \mu\text{m/s}$ auf $0,033 \pm 0,0009 \mu\text{m/s}$ (8-fache Konzentration) und auf $0,035 \pm 0,001$ (20-fache Konzentration), MWU-Test: $p < 0,0001$ für beide Konzentrationen). In der visuellen Auswertung der Zwei-Photonen Mikroskopie waren nach Ovalbumin-Zugabe in 8-facher Konzentration keine Veränderungen des Migrationsverhaltens der OT1 Zellen zu sehen. Die Zugabe des Ovalbumins in 20-facher Zellkulturkonzentration bewirkte nach ca. 1h eine vermehrte Migration der OT1 Zellen zu den Gefäßen. Die meisten OT1 Zellen bewegten sich wie OT2-Th1 Zellen, mit länglich ausgezogenem Zellkörper entlang der Gefäße, ohne an einer Stelle längere Zeit zu verbleiben. Aus diesen Ergebnissen konnte auf keine spezifische Reaktion im Rahmen der Antigenerkennung geschlossen werden. Die zum Teil hoch signifikanten Veränderungen in den Bewegungsparametern und in der visuellen Auswertung ließen jedoch eine Interaktion der OT1 Zellen mit den perivaskulären Zellen vermuten. Es bedarf weiterer Untersuchungen um dieses Phänomen aufzuklären.

Ergebnisse

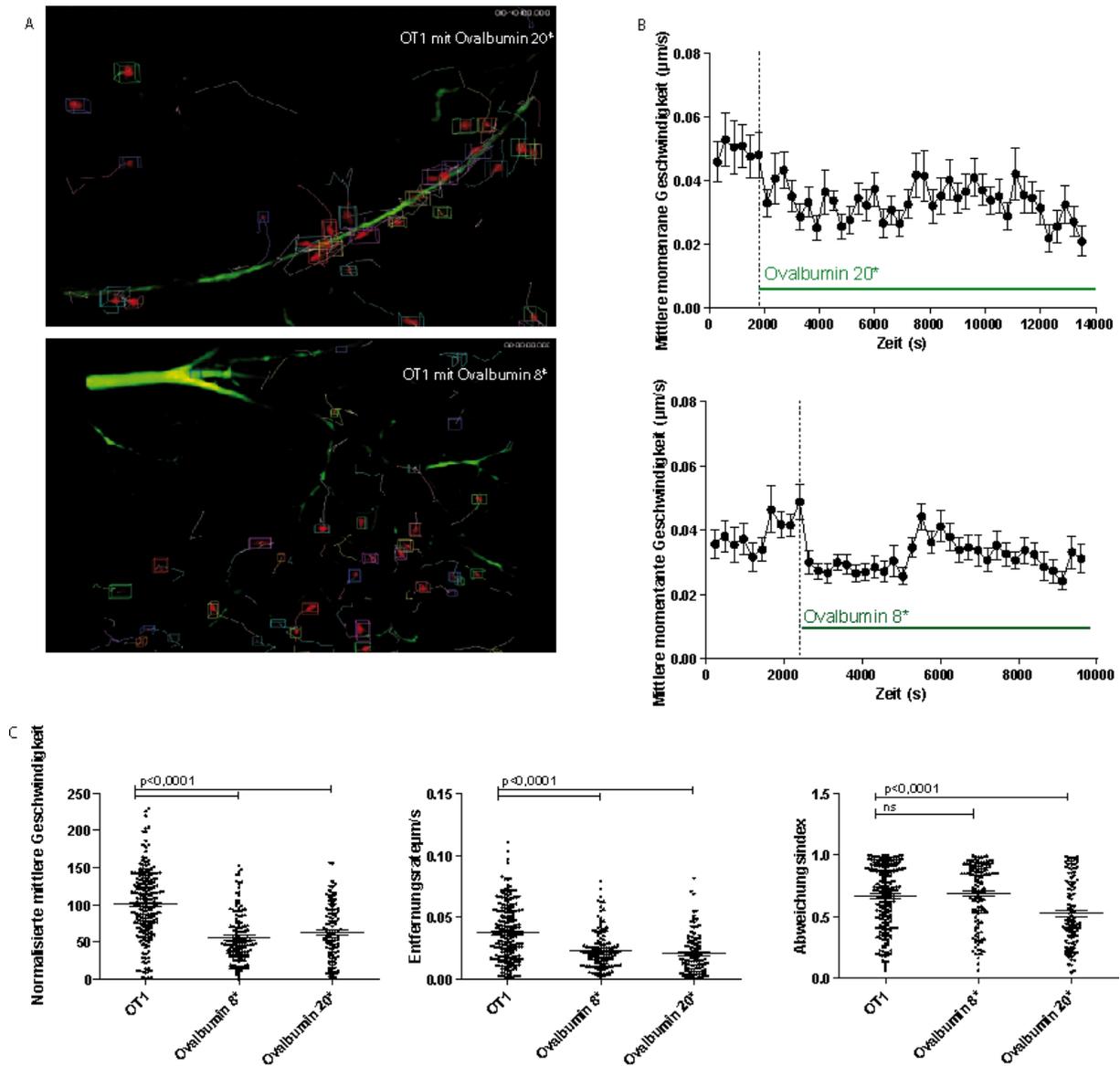


Abb. 21. Migrationsverhalten der OT1 Zellen nach Ovalbumin-Zugabe. **A.** Zwei-Photonen Mikroskopie, Aufnahme 2h nach Ovalbumin Zugabe, die OT1 Zellen (rot) versammeln sich um die Gefäße (grün). **B.** Die mittlere momentane Zellgeschwindigkeit im Zeitverlauf, Ovalbumin – Zugabe ist durch grüne Linie markiert. Die Reduktion der mittleren momentanen Geschwindigkeit ist bei beiden Konzentrationen signifikant (MWU-Test, $p < 0,0001$). **C.** Bewegungsparameter ohne Ovalbumin (Kontrolle) und nach Ovalbumin-Zugabe in 8-facher und 20-facher Konzentration, Daten \pm SEM, statische Auswertung mit MWU-Test.

3.5 Mechanismen der Antigenpräsentation im ZNS

3.5.1 Brefeldin A und OT1 Zellen

Die Zugabe eines spezifischen Antigens zur Perfusionsflüssigkeit löste eine unmittelbare (< 10 min) spezifische Reaktion der OT1 Zellen auf das zugeführte Antigen aus. Da man von einer MHC-I vermittelten Antigenpräsentation ausgehen muss, sollte das zugegebene Antigen entweder von außen auf die MHC-I Moleküle angelagert werden oder von der Zelle aufgenommen, intrazellulär prozessiert und anschließend auf den MHC-I Molekülen präsentiert werden. Zur Prüfung dieser Hypothesen wurden mehrere Versuche mit Brefeldin A durchgeführt. Das Antibiotikum Brefeldin A ist ein Metabolit aus dem Pilz *Eupenicillium brefeldianum*. Es entwickelt seine Wirkung, indem es den Golgi-Apparat hemmt und so die sekretorischen Proteine im endoplasmatischen Retikulum zurückhält. Der intrazelluläre Proteintransport, Proteinsekretion und Antigenprozessierung werden unter Brefeldin A erheblich beeinträchtigt [Yewdell and Bennink 1989]. In unseren Experimenten wurden die Hirnschnitte vor der Zugabe der T-Zellen mit jeweils 5 µg/ml Brefeldin A ca. 30 min perfundiert. Die Auswertung der Bewegungsparameter zeigte, dass Brefeldin A keinen Einfluss auf die T-Zellmigration hatte. Die mittlere Geschwindigkeit verringerte sich nur gering von $0,054 \pm 0,001 \mu\text{m/s}$ auf $0,048 \pm 0,005 \mu\text{m/s}$ unter Brefeldin A. Die Entfernungsrates und der Abweichungsindex blieben weitgehend unverändert (die Entfernungsrates lag bei $0,037 \pm 0,002 \mu\text{m/s}$ in der Kontrolle und $0,036 \pm 0,001 \mu\text{m/s}$ unter Brefeldin A). Der Abweichungsindex betrug $0,66 \pm 0,01$ in der Kontrolle und $0,68 \pm 0,05$ unter Brefeldin A. Die Zugabe des spezifischen Antigens OVA₂₅₇₋₂₆₄ zu den mit Brefeldin A perfundierten Hirnschnitten löste eine unmittelbare (< 10 min) Reaktion der OT1 Zellen aus, die sich von den Kontrolluntersuchungen ohne Brefeldin A nicht unterschied (siehe Abb.21). Die visuelle Auswertung der Aufnahmen mit dem Zwei-Photonen Mikroskop zeigte ebenfalls keine Änderungen des Migrationsverhaltens der OT1 Zellen in Gegenwart von Brefeldin A im Vergleich zu den Kontrollaufnahmen. Diese Ergebnisse bestätigten die Annahme, dass das zugegebene Antigen OVA₂₅₇₋₂₆₄ für die Antigenpräsentation an OT1 Zellen nicht von den Hirnzellen prozessiert wurde. Die Antigenpräsentation könnte somit über eine direkte Beladung der MHC I Moleküle mit dem jeweiligen Antigen erfolgen. Der extrazelluläre Austausch der an die MHC-I Moleküle gebundene Peptide ist gut bekannt und hängt von der Konzentration des löslichen Peptids, der Anzahl der MHC-I Moleküle und der Dissoziationsrate des an MHC-I gebundenen Peptids ab [Lie *et al.* 1990] [Smith *et al.* 1992b].

Ergebnisse

Eine direkte Bindung der Antigen-Peptide an die MHC-I Moleküle würde die Antigenpräsentation erheblich beschleunigen, sodass wir in unseren Experimenten mit Antigenzugabe von einem extrazellulären Peptidaustausch auf MHC-I Molekülen im Hirngewebe ausgehen.

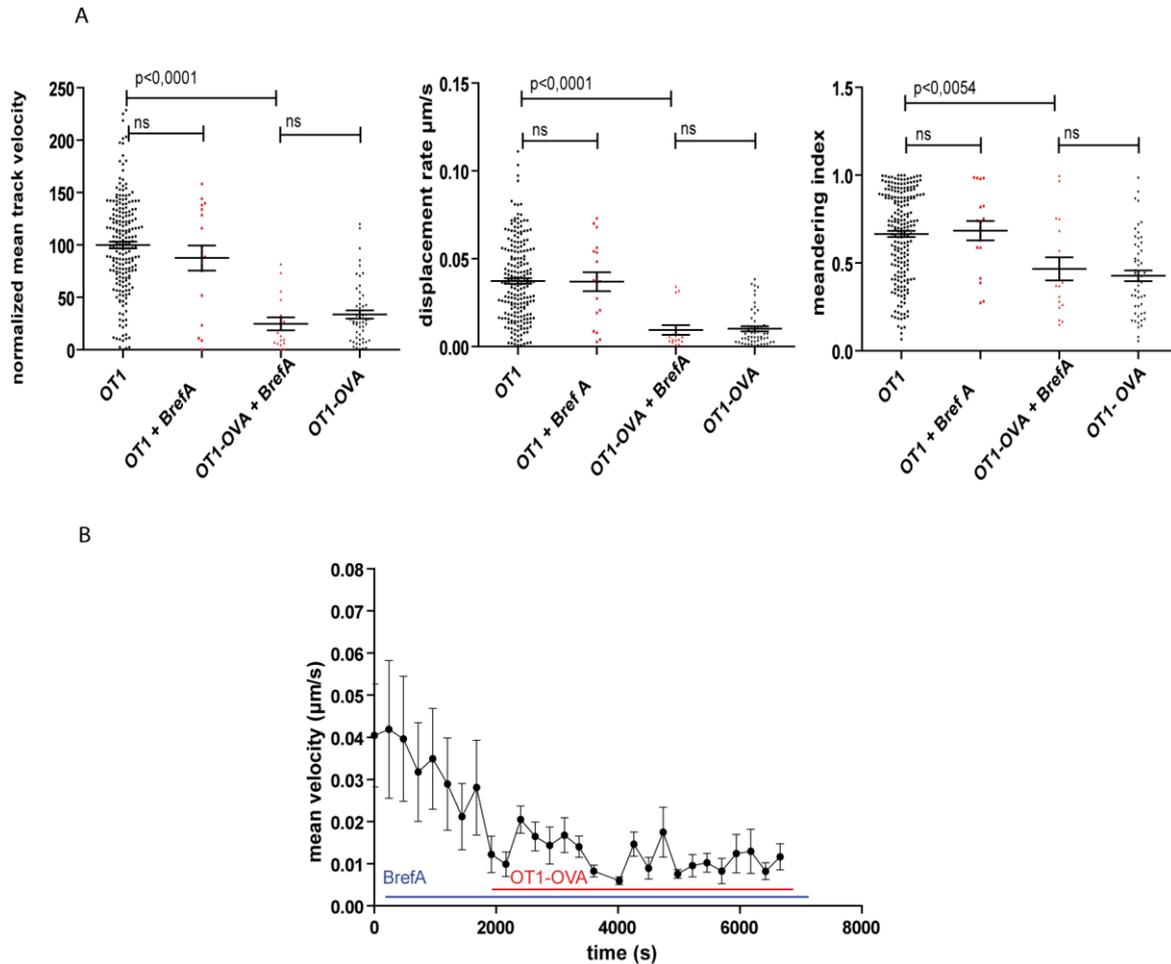


Abb. 22: Die Bewegungsparameter der OT1 Zellen unter Brefeldin A Perfusion. **A.** Normalisierte mittlere Geschwindigkeit, Entfernungsrates und Abweichungsindex: Vergleich zwischen Migration der OT1 Zellen vor und nach CD8OVA Zugabe auf Hirnschnitten mit und ohne Brefeldin A. Die Daten \pm SEM aus 2 Experimenten, statistische Auswertung mit MWU-Test. **B.** Mittlere momentane Geschwindigkeit der OT1 Zellen unter Brefeldin A Perfusion (blaue Linie) und nach CD8-OVA Zugabe (rote Linie) zeigt eine signifikante Geschwindigkeitsreduktion (MWU-Test, $p < 0,0001$).

3.6 OT1 CD8+T-Zellen und neuronaler Tod

Die Visualisierung der T-Zellen in akuten organotypischen hippocampalen Hirnschnitten zeigte u.a. wie die T-Zellen zu einem neuronalen Schaden beitragen können. Es wurde beobachtet, dass die T-Zellen unabhängig ihrer Antigenpezifität in einen direkten Kontakt mit Neuronen traten und schließlich letale Ca^{2+} Oszillationen auslösen konnten [Nitsch *et al.* 2004]. Die in unserem Labor durchgeführten Versuche zeigten ebenfalls, dass die CD4^+ und CD8^+ T-Zellen dynamisch durch das neuronale Zellband wanderten und in den kontaktierten Nervenzellen Ca^{2+} Oszillationen auslösten. Die Auswertung der Fluoreszenzintensität der mit Ca^{2+} sensitivem Farbstoff gefärbten neuronalen Zellen zeigte, dass die Zugabe des spezifischen Antigens $\text{OVA}_{257-264}$ entweder transiente Ca^{2+} Oszillationen oder andauernde Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+} Spiegels bewirkte. Die anschließende Bestimmung der Viabilität der Nervenzellen in den chronischen Hirnschnitten mit Propidiumiodid ergab, dass es vor allem in Gegenwart der CD8^+ T-Zellen und insbesondere nach der Zugabe eines spezifischen Antigens zu einem verstärkten neuronalen Untergang kam.

Ergebnisse

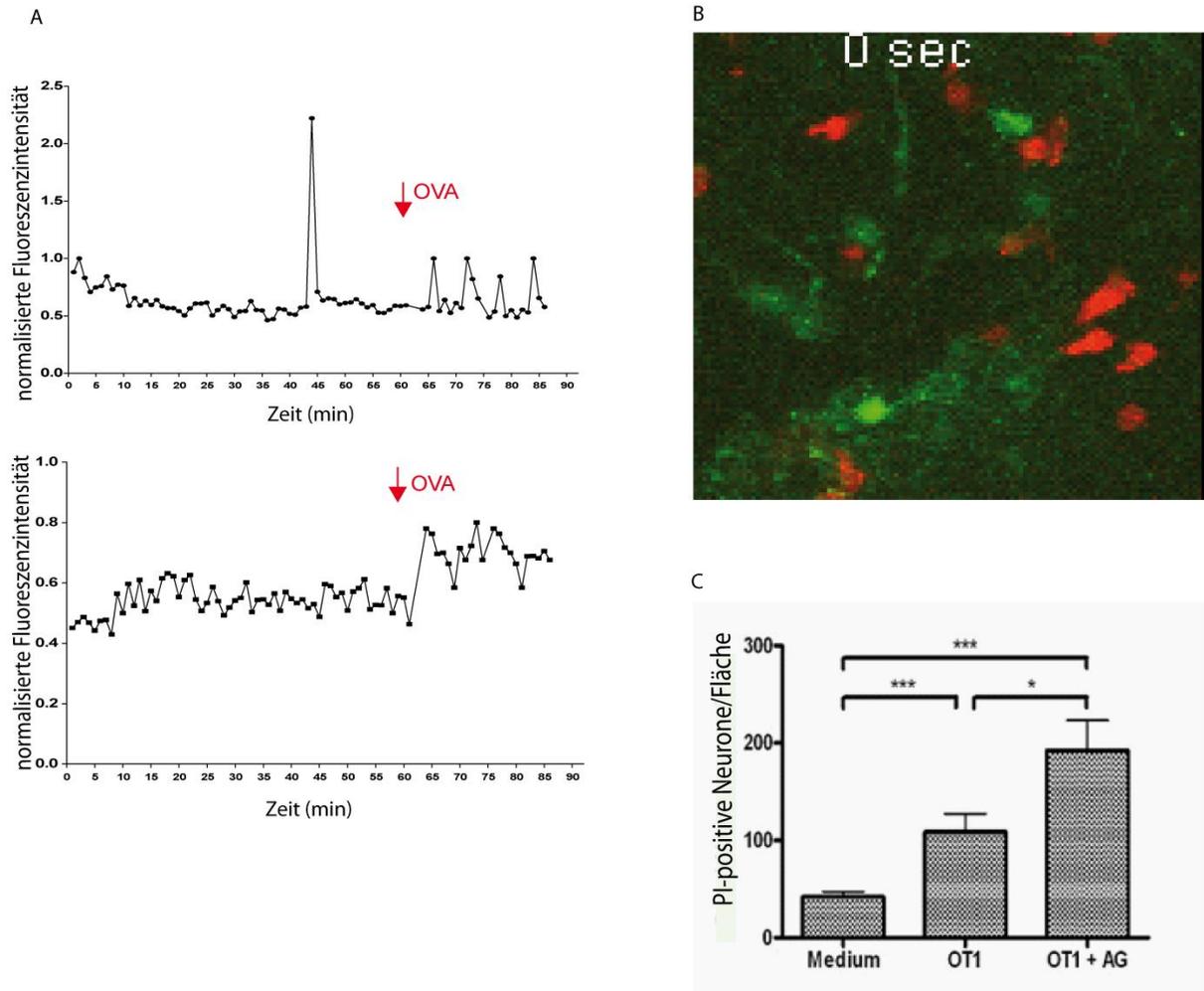


Abb. 23: OT1 Zellen und neuronaler Tod. **A.** Analyse der Fluoreszenzintensität in den akuten Hirnschnitten, Zugabe des OVA₂₅₇₋₂₆₄ löste entweder transiente Ca²⁺ Oszillationen oder anhaltende Erhöhung des intrazellulären Ca²⁺ Spiegels in den Neuronen **B.** Akuter Hirnschnitt, Neurone sind mit Ca²⁺ sensitivem Farbstoff Fluo-4 gefärbt (grün). Die T-Zellen (rot) befinden sich im neuronalen Zelllager **C)** Quantifizierung des neuronalen Todes mit Propidiumiodid in den chronischen hippocampalen Hirnschnitten nach 24h Inkubation a) in Medium (PI-positive Neurone/Fläche 42 ± 5, n57) b) mit OT1-Zellen (PI-positive Neurone/Fläche 109 ± 19, n36), c) mit OT1-Zellen und OVA₂₅₇₋₂₆₄ (25nM OVA₂₅₇₋₂₆₄, PI-positive Neurone/Fläche 193 ± 30, n10). Daten ± Standardfehler des Mittelwerts, * p < 0,05, *** p < 0,01.

4 Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit ist es, grundlegende Mechanismen des Verhaltens von Immunzellen im Rahmen der Antigenerkennung und Antigenpräsentation im zentralen Nervensystem zu analysieren. Diese Untersuchungen sollen die Prozesse der physiologischen Immunüberwachung und Antigenerkennung in ihrer ungestörten Funktion beschreiben, die im Rahmen autoimmun-entzündlicher ZNS-Erkrankungen wie der Multiplen Sklerose (MS) fehlgeleitet sind.

Zu diesem Zweck wurden zwei Lymphozytenpopulationen, die sich sowohl im gesunden als auch im entzündlich veränderten ZNS finden lassen [Wekerle *et al.* 1987] [Genain *et al.* 1994], in organotypischen Hirnschnittkulturen untersucht.

Dazu wurde das im Methodenteil ausführlich beschriebene Modell der T-Zell-Hirnschnitt Kokultur verwendet, in dem murine T-Zellen auf lebende, hippokampale Hirnschnitte gegeben werden. Es wurde bereits gezeigt, dass aktivierte CD4⁺ und CD8⁺T Zellen, die auf die Schnitte gegeben wurden, schnell und ungehindert in das Gewebe eindringen und durch das kompakte Hirngewebe wandern [Siffrin *et al.* 2009]. Auf dieser Grundlage war das Hauptziel der hier vorgelegten Arbeit, zu untersuchen, wie sich das Wanderungsverhalten von CD4⁺ und CD8⁺T-Zellen in Gegenwart eines spezifischen und unspezifischen Antigens verändert und welche Mechanismen darauf Einfluss nehmen können.

Die zeitlich und örtlich hoch aufgelöste Darstellung zellulärer Vorgänge tief im lebenden Gewebe wurde erst mit Einführung der Zwei-Photonen-Mikroskopie möglich [Denk *et al.* 1997]. Das Immunsystem war aufgrund seiner hohen Dynamik besonders interessant für diese Untersuchungen und Hauptgegenstand der Forschung mit Zwei-Photonen Mikroskopie der letzten Jahre. Seitdem hat sich das Wissen über die Komplexität zellulärer Prozesse rasant erweitert [Cahalan *et al.* 2002] [Miller *et al.* 2003] [Cahalan *et al.* 2008]. Es konnte gezeigt werden, dass die Lymphozytenmigration im Lymphknoten bestimmten Regeln folgt und charakteristische Bewegungsmuster der Lymphozyten auf funktionelle Veränderungen wie zum Beispiel Antigenerkennung zurück schließen lassen [Mempel *et al.* 2004] [Miller *et al.* 2004] [Mrass *et al.* 2006]. Die Bewegungsmuster können mit standardisiert erfassbaren Bewegungsparametern wie mittlerer Geschwindigkeit, momentaner Geschwindigkeit, Abweichungsindex und Entfernungsrates beschrieben werden [Sumen *et al.* 2004], die auch in dieser Arbeit erfasst und ausgewertet wurden.

Die Migration der Lymphozyten im Hirngewebe wird durch sehr komplexe und noch nicht vollständig geklärte Mechanismen gesteuert. Die Faktoren wie Antigenverfügbarkeit, MHC-Expression, Aktivierungsstatus der T-Zellen sowie lokale Chemokine spielen dabei eine entscheidende Rolle. Eine Leitstruktur, wie das für das lymphatische Gewebe beschriebene Netzwerk der fibroblastischen Retikulumzellen [Bajenoff *et al.* 2008], wurde bisher im unbeeinträchtigten Hirnparenchym nicht nachgewiesen und die Bildung von kollagenen Fasern (in Astrozyten) wird aktiv unterdrückt [Heck *et al.* 2007]. Im Rahmen einer ZNS-Entzündung wurde ein Netzwerk aus retikulären Fasern in den Entzündungsarealen entdeckt, das keine kollagenen Fasern enthielt. Diese Struktur unterstützte die Bewegung der CD8+T-Zellen durch das Hirnparenchym und leitete die T-Zellen zum Entzündungsort [Wilson *et al.* 2009].

Der Einfluss der Chemokine auf die Migration der CD4+ und CD8+T-Zellen im Hirngewebe wurde von unserer Arbeitsgruppe mit Hilfe der Zwei-Photonen-Mikroskopie untersucht. Es zeigte sich, dass sowohl in gesundem Hirngewebe als auch in der weit fortgeschrittenen EAE die CD4+T-Zellen ein gefäßassoziiertes Bewegungsmuster haben und sich um die intrazerebralen Gefäße ansammeln. Im Gegensatz dazu bewegen sich die CD8+T-Zellen unabhängig von den Gefäßstrukturen. Die Migration der CD4+T-Zellen zu den Gefäßen wurde als eine gegen das Chemokin CXCL-12 gerichtete Bewegung identifiziert [Siffrin *et al.* 2009]. In der vorliegenden Arbeit wurde die Migration der Ovalbumin-spezifischen CD4+ und CD8+T-Zellen im nicht entzündeten Hirngewebe der Maus nach Einspülen des spezifischen und unspezifischen Antigens untersucht.

4.1 Antigenerkennung und Migration

Die Interaktionen der Ovalbumin-spezifischen CD8+T-Zellen im hippokampalen ZNS-Gewebe (Cornu ammonis; in diesem Entwicklungsstadium vor allem aus kompakten Neuronenverbänden bestehend [Huh *et al.* 2000] [Kovac *et al.* 2002]) führten nach der Zugabe des spezifischen Antigens zu einer konstanten und deutlichen Änderung des T-Zell-Bewegungsmusters. Unmittelbar nach der Antigenzugabe rundeten sich die CD8+T-Zellen ab und verringerten stark ihre Bewegungsgeschwindigkeit. Hingegen zeigten die Ovalbumin-spezifischen CD4+T-Zellen keine Änderung des Migrationsverhaltens nach Antigenzugabe. Die T-Zell-Immobilisation und Abrundung im Rahmen der TZR-vermittelten Antigenerkennung auf den Antigen präsentierenden Zellen (APZ) wurde bereits in mehreren

Studien sowohl für CD4+ wie auch CD8+T-Zellen beobachtet [Miller *et al.* 2002a] [Kawakami *et al.* 2005b] [Wilson *et al.* 2009] und als ein Ca^{2+} -abhängiger Prozess beschrieben [Donnadiou *et al.* 1994;Negulescu *et al.* 1996].

Die Arbeitsgruppe von Andrian untersuchte eingehend die Dynamik und Chronologie der Interaktion der T-Zellen mit den Antigen-beladenen APZs im Lymphknoten *in vivo*. Dabei zeigten sie, dass die T-Zell-APZ Kontakte in drei Phasen unterteilt werden können. Die erste Phase ist durch kurze, vorübergehende Kontakte der T-Zellen mit APZs charakterisiert. In der zweiten Phase stabilisiert sich die T-Zell-APZ-Interaktion und in der dritten Phase lösen sich die T-Zellen allmählich von den APZs ab. Anschließend kommt es zur Proliferation und Auswanderung der T-Zellen aus dem Lymphknoten [Mempel *et al.* 2004]. Die beschriebenen Phasen konnten jedoch nicht in allen Studien reproduziert werden. T-Zell-Immobilisation wurde auch unmittelbar nach der Erkennung des spezifischen Antigens sowohl unter Toleranzinduktion- als auch *priming* Bedingungen beobachtet [Shakhar *et al.* 2005] [Celli *et al.* 2007]. Andere Untersuchungen zeigten, dass die Schnelligkeit der Ausbildung einer stabilen T-Zell-APZ-Interaktion von mehreren Faktoren wie Aktivierungsstatus der APZs [Manickasingham *et al.* 2000], Verfügbarkeit und Dichte der Antigen-MHC-Molekül-Komplexe auf den APZs [Henrickson *et al.* 2008], Affinität des TZR für das Antigen und Antigenkonzentration [Bouso und Robey 2003] abhängt.

Antigenspezifität, d.h. die Potenz der Antigene eine T-Zelle zu aktivieren, beeinflusst ebenfalls die Stabilität der T-Zell-APZ-Interaktion. Anhand der veränderten Peptid-Liganden zeigten Skokos und Kollegen *in vivo*, dass nur eine Interaktion mit hochpotenten Peptidantigenen die Immobilisation der T-Zellen bewirken kann. Niedrig potente Peptid-MHC-Komplexe hatten keinen Einfluss auf die T-Zell-Migration [Skokos *et al.* 2007].

4.1.1 T-Zell-Stop-Signal

Im Rahmen der Antigenerkennung kommt es zu einer charakteristischen Änderung des T-Zellverhaltens. Die Kontaktaufnahme des T-Zell-Rezeptors mit dem Peptid-MHC-Molekül-Komplex führt innerhalb weniger Sekunden zu einer Signalkaskade, die über Inositoltriphosphat (IP_3) eine Freisetzung des Ca^{2+} aus dem Endoplasmatischen Retikulum bewirkt. Die Unterhaltung des erhöhten Ca^{2+} Spiegels in der T-Zelle wird durch die spezialisierten Ca^{2+} Kanäle (CRAC engl. *calcium-release activated channels*) vermittelt [Lewis 2007]. Um die NFAT-Aktivierung mit folgender Genexpression zu bewirken, muss die

intrazelluläre Kalziumkonzentration über ein bis zwei Stunden 500nM überschreiten [Feske *et al.* 2001]. Die Dynamik dieses Prozesses sowie der zeitliche Verlauf wurden ausführlich in den *in vitro* Studien für einzelne T-Zellen beschrieben. Im Rahmen der T-Zell-APZ Interaktion kommt es zur T-Zellpolarisierung mit Ausbildung von Proteinansammlungen sog. „*protein cluster*“ und Reorganisation des Zytoskeletts [Kupfer und Singer 1989]. Die Immobilisation und Abrundung der T-Zellen im Rahmen der Antigenerkennung ist direkt mit dem Anstieg des intrazellulären Ca^{2+} Spiegels in der T-Zelle verbunden [Donnadieu *et al.* 1994]. Die Stabilität der T-Zell-APZ-Interaktion hängt von der Höhe der intrazellulären Kalziumkonzentration ab [Negulescu *et al.* 1996]. Die *in vivo* Studien zeigten ebenfalls, dass die Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+} Spiegels in der T-Zelle einen notwendigen und ausreichenden Stimulus für die Immobilisation der T-Zelle darstellt [Bhakta und Lewis 2005]. Die Stärke des Ca^{2+} Einstroms in die T-Zelle hängt von der Spezifität und Affinität des Antigens zu dem T-Zell-Rezeptor ab. Die weniger spezifischen Liganden lösen keinen ausreichenden Ca^{2+} Einstrom in die T-Zelle aus, sodass die Geschwindigkeit und das Migrationsverhalten der T-Zellen unverändert bleiben [Skokos *et al.* 2007].

Zusammengenommen zeigten *in vivo* und *in vitro* Studien, dass die Intensität der Kalziumsignale die Aktivierung und Bewegung der T-Zellen während der Antigenerkennung steuert. Die Erkennung eines spezifischen Antigens führt dabei innerhalb weniger Sekunden zum Anstieg des intrazellulären Kalzium-Spiegels, zur Reorganisation des Zellskeletts und letztendlich zur Immobilisation der T-Zellen.

4.2 Mechanismen der Antigenpräsentation im ZNS

In unseren Experimenten waren die aktivierten zytotoxischen CD8+T-Zellen im nicht entzündeten ZNS schon wenige Minuten nach Zugabe des spezifischen Antigens immobil und abgerundet. Diese schnelle Reaktion der T-Zellen auf das zugegebene Antigen unterschied sich von der bereits beschriebenen Interaktion der naiven T-Zellen mit den APZs, bei der mehrere transiente Kontakte der Ausbildung der stabilen immunologischen Synapse vorausgingen [Mempel *et al.* 2004] [Miller *et al.* 2002c]. Die rasche Reaktion der OT1 Zellen auf das zugegebene Peptid in unserer Studie kam unerwartet. Eine reguläre Antigenpräsentation setzt voraus, dass das Antigen von den Antigen präsentierenden Zellen aufgenommen, prozessiert und anschließend auf den MHC-II bzw. im Falle der Kreuzpräsentation auf den MHC-I Molekülen präsentiert wird. In den *in vitro*

Untersuchungen variierte die Zeit zwischen Antigenprozessierung und -präsentation von 3h bis 20 min in verschiedenen Studien [Manickasingham *et al.* 2000] [Harding und Geuze 1992]. Die *in vivo* Untersuchung der Dynamik der Antigenpräsentation in der Milz zeigte jedoch eine schnellere Kinetik. Bereits 10min. nach Antigeninfusion erfolgte eine MHC-II vermittelte Antigenpräsentation an die CD4+T-Zellen, was mit einer T-Zell-Immobilisation einherging [Odoardi *et al.* 2007b]. Die Antigenprozessierung und -präsentation an die aktivierten CD4+T-Zellen im Rahmen der ZNS-Entzündung (EAE) zeigte eine ähnliche Kinetik [Odoardi *et al.* 2007a]. Boissonas und Kollegen untersuchten die Bewegung der zytotoxischen CD8+T-Zellen im Thymom *in vivo* und konnten eine antigenabhängige Immobilisation der CD8+T-Zellen beobachten. Nach der Lyse der Tumorzellen erlangten die CD8+T-Zellen ihre freie Mobilität wieder [Boissonnas *et al.* 2007]. In unseren Experimenten im ZNS beobachteten wir 5-10 min nach der Antigenzugabe eine deutliche Verlangsamung und anschließende Immobilisation der CD8+T-Zellen. Im Gegensatz dazu zeigten CD4+T-Zellen keine vergleichbare Änderung des Migrationsverhaltens. Die unterschiedlichen Reaktionen der CD4+ und CD8+ T-Zellen auf das spezifische Antigen ließen zum einen an die unterschiedliche MHC-I/II Molekül Expression im nicht entzündeten ZNS denken. Zum anderen mussten bei der raschen Immobilisation der CD8+T-Zellen unterschiedliche Mechanismen der Antigenpräsentation in Betracht gezogen werden.

4.2.1 Antigenpräsentation an die CD8+T-Zellen im ZNS

4.2.1.1 MHC-I Expression im nicht entzündeten ZNS

Die CD8+T-Zellen erkennen ihr Antigen im Komplex mit MHC-I Molekülen [Townsend und Bodmer 1989]. Die MHC-I Expression im ZNS galt lange als umstritten, sodass deren Nicht-Nachweisbarkeit ein Bestandteil des Paradigmas des ZNS-Immunprivilegs interpretiert wurde [Joly *et al.* 1991] [Mucke und Oldstone 1992] [Rall *et al.* 1995]. Tatsächlich ist die MHC I Expression im ZNS streng reguliert und moduliert durch die ZNS Zellen [Vass und Lassmann 1990]. Die Expression der MHC-I Moleküle in Körner- und Pyramidenzellen des Hippokampus wurde in jungen Mäusen entdeckt [Huh *et al.* 2000]. Da unsere Experimente an acht bis zehn Tage alten Mäusen durchgeführt wurden, unterstützt dies die Annahme, dass MHC-I Moleküle in den jungen Mäusen konstitutiv exprimiert werden, was eine MHC-I-abhängige Antigenpräsentation an OT1-Zellen erlaubt. Sollte es sich hier aber um *nicht klassische* MHC-I Moleküle handeln, die ausschließlich im Rahmen der ZNS-Entwicklung

exprimiert werden, würde dies ebenfalls auf ihre funktionelle Bedeutung im Rahmen der Immunantwort hinweisen [Corriveau *et al.* 1998]. Von besonderem Interesse wären daher die Untersuchungen an den akuten Hirnschnitten erwachsener Mäuse, was Rückschlüsse auf die MHC-I Expression im erwachsenen Hirngewebe erlaubte.

4.2.1.2 Kreuzpräsentation

Die Aufnahme der exogenen Proteine und die Präsentation auf den MHC-I Molekülen wird als Kreuzpräsentation bezeichnet und wurde bisher als eine spezielle Eigenschaft professioneller APZs beschrieben [Bevan M.J 1976] (Übersicht bei [Yewdell *et al.* 1999]). Die neueren Untersuchungen zeigten, dass auch die aktivierten Mikrogliazellen die Antigene kreuzpräsentieren können [Beauvillain *et al.* 2008]. Über die Mechanismen der Kreuzpräsentation im ZNS ist wenig bekannt. Calzascia und Kollegen zeigten anhand des Gliom-Modells, dass die Kreuzpräsentation der Gliom-Antigene durch lokale APZs im ZNS zur Akkumulation der tumorspezifischen zytotoxischen CD8⁺T-Zellen im Gliomgewebe führt [Calzascia *et al.* 2003]. Im gesunden ZNS sind die professionellen APZs vor allem im perivaskulären Raum zu finden, der regelmäßig u.a. von Makrophagen aus der peripheren Blutbahn patrouilliert wird [Hickey2001] [Bechmann *et al.* 2001]. Gegen eine Kreuzpräsentation in unseren Experimenten spricht die schnelle Immobilisation der T-Zellen nach Antigenzugabe im Hirnparenchym, wo die professionellen APZ unter nicht inflammatorischen Bedingungen selten anzutreffen sind. Die verstärkte Migration der T-Zellen zu den Gefäßstrukturen, wo die Kreuzpräsentation stattfinden könnte, wurde nicht beobachtet. Die mangelnde Wirkung des Brefeldin A auf die T-Zell-Immobilisation nach Antigenzugabe (s.u.) zeigte, dass das zugegebene Antigen für die Antigenpräsentation nicht im Zytosol prozessiert werden musste, was aber eine Proteasom/TAP unabhängige Kreuzpräsentation nicht ausschließen würde [Pfeifer *et al.* 1993]. Aufgrund der Kinetik der OT1 Zellreaktion auf das spezifische Peptid wurde jedoch ein anderer Mechanismus der Antigenpräsentation favorisiert.

4.2.1.3 Interzellulärer Peptidaustausch

Eine interessante Möglichkeit der Antigenpräsentation bietet der extrazelluläre Austausch der an die MHC-I Moleküle gebundenen Peptide [Lie *et al.* 1990]. Der Peptid-Austausch auf der Oberfläche der MHC-I Moleküle hängt von der Konzentration des löslichen Peptids, der Anzahl der MHC-I Moleküle und der Dissoziationsrate des an MHC-I gebundenen Peptids ab

[Smith *et al.* 1992a]. Eine direkte Bindung der Antigen-Peptide an die MHC-I Moleküle würde den Prozess der Antigenpräsentation erheblich beschleunigen. Ein rascher direkter Austausch der an MHC-I Moleküle gebundenen ZNS-Peptide gegen das spezifische Antigen OVA₂₅₇₋₂₆₄ könnte die Schnelligkeit der OT1-Reaktion auf das zugegebene Peptid erklären. Um diese Annahme zu überprüfen, wurde die Antigenaufnahme und Prozessierung durch die ZNS-Zellen mit Brefeldin A blockiert.

Das Antibiotikum Brefeldin A, wie im Ergebnisteil beschrieben, hemmt spezifisch die Präsentation der endogenen Peptide auf den MHC-I Molekülen. Die Präsentation der exogenen Peptide, die extrazellulär an die MHC-I Moleküle binden, bleibt dabei ungehindert [Yewdell und Bennink 1989].

In unseren Experimenten wurde durch Brefeldin A-Zugabe zur Perfusionsflüssigkeit die Antigenprozessierung der antigenpräsentierenden ZNS-Zellen blockiert. Es stellte sich heraus, dass Brefeldin A keinen Einfluss auf das Migrationsverhalten der OT1 Zellen nach Antigenzugabe hatte. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass bei einer genügend hohen Antigenkonzentration ein direkter Austausch der Peptide auf den MHC-I Molekülen der ZNS-Zellen möglich ist. So könnte die extrazelluläre Beladung der MHC-I Moleküle der ZNS-Zellen mit dem OVA₂₅₇₋₂₆₄-Peptid die schnelle Reaktion der OT1 Zellen auf die Antigenzugabe erklären. Um die Spezifität der T-Zell-Reaktion auf das zugegebene OVA₂₅₇₋₂₆₄ Peptid zu prüfen, wurden die Experimente mit unspezifischen Peptiden wie MOG₄₀₋₅₄ und OVA₃₂₃₋₃₃₉ durchgeführt.

4.2.1.4 Kreuzreaktivität

Die Koinkubation der OT1 Zellen mit unspezifischem Peptid OVA₃₂₃₋₃₃₉ hatte keine Auswirkungen auf das Migrationsverhalten der OT1 Zellen. Dagegen führte die Zugabe des Myelin-Antigens MOG₄₀₋₅₄ zur Immobilisation der OT1 Zellen wie nach Zugabe des spezifischen Antigens. Dieses Phänomen konnten wir auf eine Kreuzreaktivität der OVA-spezifischen T-Zellen mit MOG-Peptid zurückführen, was mittels Proliferationsassay (³H-Thymidin Inkorporation Assay) nachzuweisen war. Das Myelin-Oligodendrozyten Protein (MOG) wird fast ausschließlich im ZNS exprimiert. Trotz seines sehr geringen Anteils am Myelinprotein von ca. 0,05 %-0,01 % hat es eine dominante immunogene Wirkung [Wekerle1999] [de Rosbo and Ben Nun 1998].

Der zeitliche Verlauf der Immobilisation der OT1 Zellen nach MOG₄₀₋₅₄ Zugabe hing von der Konzentration des zugegebenen MOG₄₀₋₅₄-Peptids ab. Bei den niedrigeren Konzentrationen (1faches und 4faches der Zellkulturkonzentrationen) des MOG₄₀₋₅₄ Peptids wurde eine verstärkte Migration der OT1-Zellen zu den Gefäßen beobachtet, was schließlich nach ca. 1h mit einer Immobilisation der OT1-Zellen in der Gefäßnähe endete. Die OT1 Zellen bildeten dabei dynamische Zellansammlungen um die Gefäßverzweigungen herum. Höhere Konzentrationen des MOG₄₀₋₅₄ Peptids (8faches der Zellkulturkonzentration) bewirkten dagegen eine rasche (< 10 min) Immobilisation der OT1 Zellen im Hirnparenchym. Dies steht im Einklang mit anderen Studien, die zeigten, dass die TZR-Affinität und Antigenkonzentration das Migrationsverhalten der T-Zellen entscheidend beeinflussen. Bei niedrig potenten Antigenen kommt es zu mehreren vorübergehenden T-Zelle-APZ Kontakten, bevor eine stabile T-Zell-APZ Interaktion entsteht [Bouso und Robey2003] [Skokos *et al.* 2007]. Der genaue Mechanismus der Antigenpräsentation in den o.g. Untersuchungen muss noch geklärt werden. Die Migration der OT1 Zellen zu den Gefäßen und anschließende Immobilisation bei den niedrigeren MOG Konzentrationen lassen an eine Kreuzpräsentation der MOG Peptide durch Gefäßnahe APZs/Makrophagen oder aktivierte Mikroglia denken. Die unmittelbare Immobilisation der OT1 Zellen im Hirnparenchym bei höheren MOG Konzentrationen lässt den interzellulären Peptidaustausch zu.

Die Kreuzreaktivität des MOG₄₀₋₅₄ Peptids mit dem OVA₂₅₇₋₂₆₄ Peptid stellt die Frage nach der möglichen molekularen Mimikry zwischen dem Myelin-Antigen und dem Bestandteil des Hühnerei-Proteins, vergleichbar der von Butyrophyllin und MOG [Guggenmos *et al.* 2004]. Die Kreuzreaktivität des T-Zellrezeptors kann zum einen „zufällig“, d.h. ohne relevante Sequenzhomologie zwischen den Peptid-Liganden auftreten und zum anderen auf einer Sequenzhomologie der Peptide basieren. Ishizuka und Kollegen berechneten, dass die Wahrscheinlichkeit der zufälligen und auf Sequenzhomologie basierenden Kreuzreaktivität ähnlich niedrig ist ($\approx 1/30.000$) [Ishizuka *et al.* 2009]. Eine physiologisch relevante Kreuzreaktivität zwischen MOG und Ovalbumin erscheint angesichts des hier benutzten hoch artifiziellen Systems und der hohen Peptidkonzentrationen als eher unwahrscheinlich. Interessanter ist aber die Tatsache, dass überhaupt eine Kreuzreaktivität zwischen dem Myelinpeptid und dem Modellpeptid auftrat, trotz der hohen Antigenpezifität des transgenen T-Zellrezeptors. Dies lässt die Annahme zu, dass die molekulare Mimikry häufiger stattfindet

als bisher vermutet, was für die Entwicklung der autoimmunen Erkrankungen von Bedeutung sein könnte.

4.2.1.5 Ovalbumin

Der im Rahmen der entzündlichen Reaktion im ZNS auftretende Myelin-Zerfall könnte den Prozess des extrazellulären Peptid-Austausches auf den MHC-I Molekülen der Neurone begünstigen und so zum fortschreitenden neuronalen Schaden beitragen. Zur Prüfung, ob die extrazelluläre Spaltung der großen Peptide/Proteine und anschließende Beladung der MHC-I Moleküle für die Antigenpräsentation im ZNS eine Rolle spielen könnte, wurden die Hirnschnitte mit Ovalbumin Protein inkubiert. Die Koinkubation der OT1 Zellen mit Ovalbumin Protein führte zu keiner Änderung des Migrationsverhaltens der CD8+T-Zellen, die einer Antigenerkennung entsprechen würde. Damit erschien eine Prozessierung des 385 Aminosäuren großen Proteins zu den Antigen-Peptiden in der Kürze der Zeit als unwahrscheinlich. Sobottka und Kollegen zeigten, dass die Koinkubation des Ovalbumin Proteins mit OT1-Zellen keine Auswirkungen auf den neuronalen Schaden hatte [Sobottka *et al.* 2009].

Interessanterweise konnte bei einer hohen Ovalbumin-Konzentration nach ca.1 h eine verstärkte Migration der OT1 Zellen zu den Gefäßen beobachtet werden. Die OT1-Zellen schlängelten sich dabei am Gefäß entlang und änderten häufig ihre Bewegungsrichtung, was zu einem signifikant niedrigeren Abweichungsindex führte. Die verstärkte Immobilisation und Abrundung der OT1 Zellen wurden nicht beobachtet. Es ist noch unklar, welche Mechanismen die beobachtete Kompartimentalisierung der CD8+T-Zellen nach Proteinzugabe verursachen. Da die APZ im ZNS vor allem im perivaskulären Raum zu finden sind wäre eine Ovalbumin-Aufnahme durch APZs und eine Kreuzpräsentation der Ovalbuminpeptide an die OT1 Zellen möglich. Die Antigenpräsentation der löslichen Proteine ist jedoch im Vergleich zu OVA-Peptide wenig effektiv [Song *et al.* 1999], was die fehlende Immobilisation der OT1 Zellen nach Ovalbumin -Zugabe in unseren Experimenten erklären könnte. Die Faktoren (Chemokine), die eine verstärkte Migration der OT1 zu den Gefäßen nach Ovalbumin -Zugabe steuern, müssten noch bestimmt werden. Interessant wäre dabei die Rolle des CXCL10 Chemokines zu untersuchen, der im Rahmen der ZNS-Pathologie, wie LCMV (*lymphocytic choriomeningitis virus*) Infektion, eine Akkumulation der CD8+T-Zellen in den Entzündungsarealen des ZNS bewirkt [Christensen *et al.* 2006].

4.2.2 Antigenpräsentation an die CD4+T-Zellen im ZNS

Die CD4+T-Zellen erkennen ihr Antigen über MHC-II Moleküle, die auf professionellen APZ exprimiert werden. Die MHC-II Expression im ZNS unter nicht entzündlichen Bedingungen ist sehr gering und reduziert auf dendritische Zellen, Mikroglia und Makrophagen [Lampson1995]. Die Induktion und Hochregulierung der MHC-II Expression findet unter vielen pathologischen Bedingungen wie Entzündungen aber auch neurodegenerativen Prozessen statt. Neumann und Kollegen zeigten, dass MHC-II-Expression im intakten ZNS durch elektrisch aktive Neurone unterdrückt wird, sodass im gesunden ZNS die MHC-II Expression sehr gering ist [Neumann *et al.* 1998].

Die in dieser Arbeit benutzten akuten hippokampalen Schnitte sind mit den traumatischen mechanischen Hirnläsionen vergleichbar, die eine sehr geringe MHC-II Expression aufweisen [Bechmann *et al.* 2001]. Die Zugabe eines spezifischen Antigens OVA₃₂₃₋₃₃₉ bewirkte keine hochsignifikante Änderung des Migrationsverhaltens der OT2-Zellen im Hirnparenchym. Ebenfalls war durch die Zugabe eines unspezifischen Antigens MOG₄₀₋₅₄ die Bewegung der CD4+T-Zellen unbeeinträchtigt. Die beobachteten Reaktionen der CD4+T-Zellen im nicht entzündeten ZNS-Gewebe sind mit der geringen MHC-II Expression, was für die Antigenpräsentation entscheidend ist, gut vereinbar. Im Gegensatz dazu führte die Antigenzugabe im Rahmen einer ZNS-Entzündung zur raschen Immobilisation der CD4+T-Zellen [Kawakami *et al.* 2005a] [Odoardi *et al.* 2007a].

4.3 Die Auswirkungen der T-Zell-Antigen-Interaktion im ZNS und ihre Bedeutung für die Multiple Sklerose

In der vorliegenden Arbeit wurde anhand der Quantifizierung der PI Einlagerung in chronischen Schnitten der neuronale Zelltod nach der Antigenzugabe erfasst. Die Koinkubation der aktivierten, zytotoxischen CD8+T-Zellen (OT1) mit hippokampalen Hirnschnitten führte nach der Zugabe des spezifischen Antigens (OVA₂₅₇₋₂₆₄) zu einer deutlichen Zunahme des Todes der ZNS-Zellen. Weiterhin zeigte sich, dass die Antigenzugabe nicht nur eine rasche Immobilisation der OT1 Zellen bewirkte, sondern zu einer deutlichen Erhöhung des intrazellulären Ca²⁺Speiegels in den kontaktierten ZNS-Zellen führte. Nitsch und Kollegen zeigten bereits, dass T-Zellen auch antigenunabhängig letale Ca²⁺ Oszillationen in den kontaktierten Neuronen auslösen können [Nitsch *et al.* 2004]. Die Untersuchungen auf molekularer Ebene zeigten einen verstärkten neuronalen Untergang nach einer MHC-I

abhängigen, antigenspezifischen T-Zell-Neuronen Interaktion. Die Perforin/Granzym-vermittelte Zytotoxizität spielte hierbei eine entscheidende aber nicht alleinige Rolle [Meuth *et al.* 2009].

Aus den Beobachtungen im Rahmen dieser Arbeit könnte folgendes Szenario der Gewebeerstörung im ZNS abgeleitet werden.

Die Migration der zytotoxischen CD8+T-Zellen im ZNS wird u.a. durch die Antigenverfügbarkeit bestimmt. Die antigenspezifischen CD8+T-Zellen wandern durch das Parenchym „auf der Suche“ nach ihrem Antigen. Die Antigenerkennung führt zu einer sofortigen Änderung des Migrationsverhaltens mit Immobilisation der CD8+T-Zellen. Es ist bekannt, dass für zytotoxische CD8+T-Zellen nur wenige Antigen-MHC-I-Komplexe ausreichend sind, um die Zielzelle abzutöten [Henrickson *et al.* 2008]. In unseren Untersuchungen zeigte sich, dass im nicht entzündeten ZNS ein extrazellulärer Peptid-Austausch auf den MHC-I Molekülen möglich und suffizient ist, um eine CD8+T-Zell-Reaktion einzuleiten. Da im entzündlichen Milieu die MHC-I Expression auf fast allen ZNS-Zellen hochreguliert ist [Neumann *et al.* 1995] [Hoftberger *et al.* 2004], könnte dies im Rahmen der fortschreitenden Immunreaktion mit Myelinzerfall und Freisetzung der Myelinpeptide einen direkten extrazellulären Peptid austausch auf den MHC-I Molekülen der ZNS-Zellen begünstigen und sie zum direkten Angriffsziel der zytotoxischen T-Zellen machen.

Die CD8+T-Zell-vermittelte Zytotoxizität wird innerhalb weniger Minuten eingeleitet, bevor eine stabile T-Zell-Zielzell-Interaktion mit Ausbildung der IS erfolgt [Purbhoo *et al.* 2004] [Sykulev *et al.* 1996]. Die Tötung kann einerseits seriell über mehrere nacheinander folgende Kontakte der CTLs mit Zielzellen erfolgen [Poenie *et al.* 1987] [Breart *et al.* 2008], andererseits wurden auch prolongierte CTL-Zielzellkontakte beobachtet, die zum Teil auch nach dem Zielzelltod weiterbestanden [Wiedemann *et al.* 2006] [Deguine *et al.* 2010]. Über die multidirektionale Freisetzung der lytischen Granula sowie ihr „Durchsickern“ nach der CTL-Dissoziation von der Zielzelle wird ein kollateraler Schaden der umliegenden Zellen begünstigt [Wiedemann *et al.* 2006; Buzza und Bird 2006]. Sobottka und Kollegen zeigten, dass es im entzündlichen Milieu zu einem antigenspezifischen Angriff auf die Oligodendrozyten durch zytotoxische CD8+T-Zellen kommt, was nicht nur den Zerfall der

Myelinscheiden verursacht, sondern kollateral eine erhebliche axonale Schädigung herbeiführt [Sobottka *et al.* 2009].

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass CD4+ und CD8+ T-Zellen ein unterschiedliches Migrationsverhalten im nichtentzündeten Hirngewebe in Gegenwart ihres spezifischen Antigens aufweisen. Das beobachtete unveränderte Migrationsverhalten der CD4+T-Zellen nach Antigenzugabe weist auf eine geringe MHC II Expression im gesunden ZNS hin. Da die aktivierten CD4+T-Zellen das ZNS regelmäßig überwachen [Hickey *et al.* 2001], wird somit eine unkontrollierte Initiation einer Entzündungskaskade verhindert. Die sofortige Reaktion der CD8+T-Zellen auf das zugegebene Antigen ist mit ihrer Effektorfunktion zu erklären, das pathogene Agens möglichst schnell zu eliminieren. Dies steht im Einklang mit den Untersuchungen, die zeigten, dass die Einwanderung der CD8+T-Zellen ins ZNS vor allem antigenspezifisch erfolgt. Das spezifische Antigen wird dabei auf den Endothelzellen der Hirngefäße MHC-I-abhängig präsentiert [Galea *et al.* 2007].

Die effektive Antigenpräsentation über extrazellulären Peptidaustausch sowie Kreuzreaktivität der zytotoxischen Ovalbumin spezifischen T-Zellen mit einem Myelinpeptid erweitern den Einblick in den möglichen Ablauf der T-Zell-vermittelten ZNS-Entzündung. Es ist bekannt, dass Infektionen die MS-Schübe auslösen können [Compston und Coles 2008]. Die molekulare Mimikry der mikrobiellen Proteine mit den Autoantigenen kann eine fehlgeleitete Autoimmunreaktion in Gang setzen, wo die autoreaktiven T-Zellen das ZNS-Gewebe angreifen [Oldstone 1987]. Andererseits können autoreaktive T-Zellen auch antigenunspezifisch im inflammatorischen Milieu aktiviert werden [Brocke *et al.* 1994] [McCoy *et al.* 2006]. Es wurde gezeigt, dass Klone der CD8+T-Zellen über Jahre im ZNS-Gewebe der MS-Kranken persistieren können, wobei ihre Antigenpezifität und funktionelle Bedeutung noch definiert werden müssen [Babbe *et al.* 2000] [Skulina *et al.* 2004]. Im Rahmen dieser Arbeit zeigte sich, dass die ZNS-Antigen unspezifischen CD8+T-Zellen in Gegenwart ihres Antigens eine zytotoxische Immunreaktion im ZNS-Gewebe einleiten können. Eine Reaktivierung der persistierenden ZNS-Antigen unspezifischer CD8+T-Zell-Klone im ZNS durch eine Infektion könnte zu ihrer ZNS-Infiltration führen und eine Entzündungsreaktion im ZNS in Gang setzen. Der Nachweis eines verstärkten neuronalen Untergangs nach einer Interaktion der aktivierten zytotoxischen CD8+T-Zellen mit ihrem Antigen unterstreicht die besondere Rolle der CD8+T-Zellen in der ZNS-Pathologie, was auch für Multiple Sklerose von Relevanz sein könnte.

Zusammenfassung

Die Aufklärung der Mechanismen der Antigenerkennung und Antigenpräsentation der antigenspezifischen CD8⁺ und CD4⁺T-Zellen im nicht-entzündeten Hirngewebe ist von Bedeutung für das Verständnis der Pathophysiologie von Autoimmunerkrankungen wie der Multiplen Sklerose. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass CD4⁺ und CD8⁺T-Zellen im Rahmen der Antigenerkennung ein unterschiedliches Migrationsverhalten im nichtentzündeten Hirngewebe aufweisen. Während die CD4⁺T-Zellen nach der Antigenzugabe ihre Migration unverändert fortsetzen, werden die CD8⁺T-Zellen unmittelbar nach der Antigenzugabe immobil und zeigen ein für Antigenerkennung typisches Verhalten. Aufgrund der Dynamik der Reaktion und mangelnder Wirkung von Brefeldin A auf das T-Zell-Verhalten nach Antigenzugabe gehen wir von einem interzellulären Peptidaustausch auf den MHC-I Molekülen aus, was die schnelle Antigenpräsentation ermöglichen würde. Die gegensätzlichen Reaktionen der CD4⁺ und CD8⁺T-Zellen auf die Antigenzugabe weisen indirekt auf die unterschiedliche MHC-I und MHC-II-Expression in nicht entzündetem Hirngewebe hin. Die Quantifizierung des neuronalen Todes zeigte einen vermehrten neuronalen Untergang im Rahmen der Interaktion von CD8⁺T-Zellen mit ihrem spezifischen Antigen, was die Rolle der CD8⁺T-Zellen in der Pathogenese der MS unterstreicht.

Literaturverzeichnis

Aggarwal S, Ghilardi N, Xie MH, de Sauvage FJ, Gurney AL. Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17. *J.Biol.Chem.* 2003; 278: 1910-1914.

Aloisi F. Immune function of microglia. *Glia* 2001; 36: 165-179.

Aloisi F, Ria F, Adorini L. Regulation of T-cell responses by CNS antigen-presenting cells: different roles for microglia and astrocytes *Immunol.Today* 2000; 21: 141-147.

Aloisi F, Ria F, Columba-Cabezas S, Hess H, Penna G, Adorini L. Relative efficiency of microglia, astrocytes, dendritic cells and B cells in naive CD4+ T cell priming and Th1/Th2 cell restimulation, *Eur.J.Immunol.* 1999; 29: 2705-2714.

Assenmacher M, Schmitz J, Radbruch A. Flow cytometric determination of cytokines in activated murine T helper lymphocytes: expression of interleukin-10 in interferon-gamma and in interleukin-4-expressing cells, *Eur.J.Immunol.* 1994; 24: 1097-1101.

Babbe H, Roers A, Waisman A *et al.* Clonal expansions of CD8(+) T cells dominate the T cell infiltrate in active multiple sclerosis lesions as shown by micromanipulation and single cell polymerase chain reaction. *J.Exp.Med.* 2000; 192: 393-404.

Bajenoff M, Glaichenhaus N, Germain RN. Fibroblastic reticular cells guide T lymphocyte entry into and migration within the splenic T cell zone, *J.Immunol.* 2008; 181: 3947-3954.

Barnden MJ, Allison J, Heath WR, Carbone FR. Defective TCR expression in transgenic mice constructed using cDNA-based alpha- and beta-chain genes under the control of heterologous regulatory elements, *Immunol.Cell Biol.* 1998; 76: 34-40.

Barten LJ, Allington DR, Procacci KA, Rivey MP. New approaches in the management of multiple sclerosis, *Drug Des Devel.Ther.* 2010; 4: 343-366.

Baumann S, Krueger A, Kirchhoff S, Krammer PH. Regulation of T cell apoptosis during the immune response, *Curr.Mol.Med.* 2002; 2: 257-272.

Beauvillain C, Donnou S, Jarry U *et al.* Neonatal and adult microglia cross-present exogenous antigens, *Glia* 2008; 56: 69-77.

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

Becher B, Blain M, Antel JP. CD40 engagement stimulates IL-12 p70 production by human microglial cells: basis for Th1 polarization in the CNS, *J.Neuroimmunol.* 2000; 102: 44-50.

Becher B, Durell BG, Noelle RJ. Experimental autoimmune encephalitis and inflammation in the absence of interleukin-12, *J.Clin.Invest* 2002; 110: 493-497.

Bechmann I, Kwidzinski E, Kovac AD *et al.* Turnover of rat brain perivascular cells *Exp.Neurol.* 2001; 168: 242-249.

Bevan M.J. Cross-priming for a secondary cytotoxic response to minor H antigens with H-2 congenic cells which do not cross-react in the cytotoxic assay, 1283-1288. 1976. *J. Exp. Med.*

Bhakta NR, Lewis RS. Real-time measurement of signaling and motility during T cell development in the thymus, *Semin.Immunol.* 2005; 17: 411-420.

Boissonnas A, Fetler L, Zeelenberg IS, Hugues S, Amigorena S. In vivo imaging of cytotoxic T cell infiltration and elimination of a solid tumor, *J.Exp.Med.* 2007; 204: 345-356.

Bördlein, Ingeborg. Multiple Sklerose: Neue Substanzen sind wirksamer, aber auch riskanter. 108(3). 2011. *Dtsch Arztebl* 2011.

Boulanger LM, Shatz CJ. Immune signalling in neural development, synaptic plasticity and disease, *Nat.Rev.Neurosci.* 2004; 5: 521-531.

Bouso P, Robey E. Dynamics of CD8+ T cell priming by dendritic cells in intact lymph nodes. *Nat.Immunol.* 2003; 4: 579-585.

Boxel-Dezaire AH, Hoff SC, van Oosten BW *et al.* Decreased interleukin-10 and increased interleukin-12p40 mRNA are associated with disease activity and characterize different disease stages in multiple sclerosis, *Ann.Neurol.* 1999; 45: 695-703.

Breart B, Lemaitre F, Celli S, Bouso P. Two-photon imaging of intratumoral CD8+ T cell cytotoxic activity during adoptive T cell therapy in mice, *J.Clin.Invest* 2008; 118: 1390-1397.

Brocke S, Veromaa T, Weissman IL, Gijbels K, Steinman L. Infection and multiple sclerosis: a possible role for superantigens? *Trends Microbiol.* 1994; 2: 250-254.

Burfoot RK, Jensen CJ, Field J *et al.* SNP mapping and candidate gene sequencing in the class I region of the HLA complex: searching for multiple sclerosis susceptibility genes in Tasmanians, *Tissue Antigens* 2008; 71: 42-50.

Buzza MS, Bird PI. Extracellular granzymes: current perspectives, *Biol.Chem.* 2006; 387: 827-837.

- Cahalan MD, Parker I. Choreography of cell motility and interaction dynamics imaged by two-photon microscopy in lymphoid organs, *Annu.Rev.Immunol.* 2008; 26: 585-626.
- Cahalan MD, Parker I, Wei SH, Miller MJ. Two-photon tissue imaging: seeing the immune system in a fresh light. *Nat.Rev.Immunol.* 2002; 2: 872-880.
- Calzascia T, Berardino-Besson W, Wilmotte R *et al.* Cutting edge: cross-presentation as a mechanism for efficient recruitment of tumor-specific CTL to the brain, *J.Immunol.* 2003; 171: 2187-2191.
- Celli S, Lemaitre F, Bousso P. Real-time manipulation of T cell-dendritic cell interactions in vivo reveals the importance of prolonged contacts for CD4+ T cell activation, *Immunity.* 2007; 27: 625-634.
- Charcot JM. "Histologie de la sclerose en plaques". 41, 554-555. 1868. *Gazette des hopitaux.*
- Christensen JE, de Lemos C, Moos T, Christensen JP, Thomsen AR. CXCL10 is the key ligand for CXCR3 on CD8+ effector T cells involved in immune surveillance of the lymphocytic choriomeningitis virus-infected central nervous system, *Immunol.* 2006; 176: 4235-4243.
- Chu CQ, Wittmer S, Dalton DK. Failure to suppress the expansion of the activated CD4 T cell population in interferon gamma-deficient mice leads to exacerbation of experimental autoimmune encephalomyelitis, *J.Exp.Med.* 2000; 192: 123-128.
- Cohen JA. Emerging therapies for relapsing multiple sclerosis, *Arch.Neurol.* 2009; 66: 821-828.
- Cohen JA, Barkhof F, Comi G *et al.* Oral fingolimod or intramuscular interferon for relapsing multiple sclerosis, *N.Engl.J.Med.* 2010; 362: 402-415.
- Coles AJ, Wing M, Smith S *et al.* Pulsed monoclonal antibody treatment and autoimmune thyroid disease in multiple sclerosis, *Lancet* 1999; 354: 1691-1695.
- Compston A, Coles A. Multiple sclerosis. *Lancet* 2008; 372: 1502-1517.
- Constantinescu CS, Tani M, Ransohoff RM *et al.* Astrocytes as antigen-presenting cells: expression of IL-12/IL-23, *J.Neurochem.* 2005; 95: 331-340
- Corriveau RA, Huh GS, Shatz CJ. Regulation of class I MHC gene expression in the developing and mature CNS by neural activity, *Neuron* 1998; 21: 505-520.
- Cserr HF, Knopf PM. Cervical lymphatics, the blood-brain barrier and the immunoreactivity of the brain: a new view, *Immunol.Today* 1992; 13: 507-512.

- Cua DJ, Sherlock J, Chen Y *et al.* Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain, *Nature* 2003; 421: 744-748.
- de Rosbo NK, Ben Nun A. T-cell responses to myelin antigens in multiple sclerosis; relevance of the predominant autoimmune reactivity to myelin oligodendrocyte glycoprotein *J.Autoimmun.* 1998; 11: 287-299.
- Deguine J, Breart B, Lemaitre F, Di Santo JP, Bousso P. Intravital imaging reveals distinct dynamics for natural killer and CD8(+) T cells during tumor regression, *Immunity.* 2010; 33: 632-644.
- Dhib-Jalbut S, Chen M, Said A, Zhan M, Johnson KP, Martin R. Glatiramer acetate-reactive peripheral blood mononuclear cells respond to multiple myelin antigens with a Th2-biased phenotype, *J.Neuroimmunol.* 2003; 140: 163-171.
- Donnadieu E, Bismuth G, Trautmann A. Antigen recognition by helper T cells elicits a sequence of distinct changes of their shape and intracellular calcium. *Curr.Biol.* 1994; 4: 584-595.
- Dorner T, Radbruch A. Selecting B cells and plasma cells to memory, *J.Exp.Med.* 2005; 201: 497-499.
- Drulovic J, Mostarica-Stojkovic M, Levic Z, Stojisavljevic N, Pravica V, Mesaros S. Interleukin-12 and tumor necrosis factor-alpha levels in cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients, *J.Neurol.Sci.* 1997; 147: 145-150.
- Dyment DA, Ebers GC, Sadovnick AD. Genetics of multiple sclerosis. *Lancet Neurol.* 2004; 3: 104-110.
- Ehrlich, P. *Das Sauerstoff-Bedürfnis des Organismus. Eine farbenanalytische Studie .* 1885. 69-70 Verlag von August Hirschwald Berlin, Germany.
- Fernandez-Botran R, Sanders VM, Mosmann TR, Vitetta ES. Lymphokine-mediated regulation of the proliferative response of clones of T helper 1 and T helper 2 cells. *J.Exp.Med.* 1988; 168: 543-558.
- Feske S, Giltmane J, Dolmetsch R, Staudt LM, Rao A. Gene regulation mediated by calcium signals in T lymphocytes, *Nat.Immunol.* 2001; 2: 316-324.
- Fox EJ. Mechanism of action of mitoxantrone, *Neurology* 2004; 63: S15-S18.
- Fox K, Caterson B. Neuroscience. Freeing the brain from the perineuronal net, *Science* 2002; 298: 1187-1189.

- Frei K, Eugster HP, Bopst M, Constantinescu CS, Lavi E, Fontana A. Tumor necrosis factor alpha and lymphotoxin alpha are not required for induction of acute experimental autoimmune encephalomyelitis, *J.Exp.Med.* 1997; 185: 2177-2182.
- Friese MA, Fugger L. Autoreactive CD8+ T cells in multiple sclerosis: a new target for therapy? *Brain* 2005; 128: 1747-1763.
- Galea I, Bernardes-Silva M, Forse PA, van Rooijen N, Liblau RS, Perry VH. An antigen-specific pathway for CD8 T cells across the blood-brain barrier, *J.Exp.Med.* 2007; 204: 2023-2030.
- Garrett, C. G. B. Kaiser W. Two-Photon Excitation in CaF₂: Eu²⁺. 7, Nr. 6, S. 229–232(*Physical Review Letters*). 1961.
- Genain CP, Lee-Parritz D, Nguyen MH *et al.* In healthy primates, circulating autoreactive T cells mediate autoimmune disease, *J.Clin.Invest* 1994; 94: 1339-1345.
- Gobin SJ, Montagne L, Van Zutphen M, Van D, V, Van Den Elsen PJ, De Groot CJ. Upregulation of transcription factors controlling MHC expression in multiple sclerosis lesions, *Glia* 2001; 36: 68-77.
- Gold R, Linington C, Lassmann H. Understanding pathogenesis and therapy of multiple sclerosis via animal models: 70 years of merits and culprits in experimental autoimmune encephalomyelitis research. *Brain* 2006; 129: 1953-1971.
- Goldmann J, Kwidzinski E, Brandt C, Mahlo J, Richter D, Bechmann I. T cells traffic from brain to cervical lymph nodes via the cribroid plate and the nasal mucosa, *J.Leukoc.Biol.* 2006; 80: 797-801.
- Goverman J. Autoimmune T cell responses in the central nervous system, *Nat.Rev.Immunol.* 2009; 9: 393-407.
- Greter M, Heppner FL, Lemos MP *et al.* Dendritic cells permit immune invasion of the CNS in an animal model of multiple sclerosis, *Nat.Med.* 2005; 11: 328-334.
- Guermonez P, Saveanu L, Kleijmeer M, Davoust J, Van Endert P, Amigorena S. ER-phagosome fusion defines an MHC class I cross-presentation compartment in dendritic cells, *Nature* 2003; 425: 397-402.
- Guggenmos J, Schubart AS, Ogg S *et al.* Antibody cross-reactivity between myelin oligodendrocyte glycoprotein and the milk protein butyrophilin in multiple sclerosis, *J.Immunol.* 2004; 172: 661-668.

- Hailer NP, Heppner FL, Haas D, Nitsch R. Astrocytic factors deactivate antigen presenting cells that invade the central nervous system, *Brain Pathol.* 1998; 8: 459-474.
- Harding CV, Geuze HJ. Class II MHC molecules are present in macrophage lysosomes and phagolysosomes that function in the phagocytic processing of *Listeria monocytogenes* for presentation to T cells, *J.Cell Biol.* 1992; 119: 531-542.
- Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR *et al.* Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages, *Nat.Immunol.* 2005; 6: 1123-1132.
- Hartung HP, Bar-Or A, Zoukos Y. What do we know about the mechanism of action of disease-modifying treatments in MS? *J.Neurol.* 2004; 251 Suppl 5: v12-v29.
- Heck N, Garwood J, Dobbertin A *et al.* Evidence for distinct leptomeningeal cell-dependent paracrine and EGF-linked autocrine regulatory pathways for suppression of fibrillar collagens in astrocytes, *Mol.Cell Neurosci.* 2007; 36: 71-85.
- Helmchen F, Denk W. New developments in multiphoton microscopy. *Curr.Opin.Neurobiol.* 2002; 12: 593-601.
- Hemmer B, Archelos JJ, Hartung HP. New concepts in the immunopathogenesis of multiple sclerosis, *Nat.Rev.Neurosci.* 2002; 3: 291-301.
- Henrickson SE, Mempel TR, Mazo IB *et al.* T cell sensing of antigen dose governs interactive behavior with dendritic cells and sets a threshold for T cell activation, *Nat.Immunol.* 2008; 9: 282-291.
- Heppner FL, Greter M, Marino D *et al.* Experimental autoimmune encephalomyelitis repressed by microglial paralysis, *Nat.Med.* 2005; 11: 146-152.
- Hickey WF. Basic principles of immunological surveillance of the normal central nervous system, *Glia* 2001; 36: 118-124.
- Hickey WF, Hsu BL, Kimura H. T-lymphocyte entry into the central nervous system, *J.Neurosci.Res.* 1991; 28: 254-260.
- Hofer T, Nathansen H, Lohning M, Radbruch A, Heinrich R. GATA-3 transcriptional imprinting in Th2 lymphocytes: a mathematical model, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2002; 99: 9364-9368.
- Hoftberger R, Aboul-Enein F, Brueck W *et al.* Expression of major histocompatibility complex class I molecules on the different cell types in multiple sclerosis lesions, *Brain Pathol.* 2004; 14: 43-50.

Hogquist KA, Jameson SC, Heath WR, Howard JL, Bevan MJ, Carbone FR. T cell receptor antagonist peptides induce positive selection, *Cell* 1994; 76: 17-27.

Hohlfeld R. Biotechnological agents for the immunotherapy of multiple sclerosis. Principles, problems and perspectives. *Brain* 1997; 120 (Pt 5): 865-916.

Horig H, Young AC, Papadopoulos NJ, DiLorenzo TP, Nathenson SG. Binding of longer peptides to the H-2Kb heterodimer is restricted to peptides extended at their C terminus: refinement of the inherent MHC class I peptide binding criteria, *J.Immunol.* 1999; 163: 4434-4441.

Hugues S, Fetler L, Bonifaz L, Helft J, Amblard F, Amigorena S. Distinct T cell dynamics in lymph nodes during the induction of tolerance and immunity, *Nat.Immunol.* 2004; 5: 1235-1242.

Huh GS, Boulanger LM, Du H, Riquelme PA, Brotz TM, Shatz CJ. Functional requirement for class I MHC in CNS development and plasticity, *Science* 2000; 290: 2155-2159.

Huseby ES, Liggitt D, Brabb T, Schnabel B, Ohlen C, Goverman J. A pathogenic role for myelin-specific CD8(+) T cells in a model for multiple sclerosis, *J.Exp.Med.* 2001; 194: 669-676.

Infante-Duarte C, Horton HF, Byrne MC, Kamradt T. Microbial lipopeptides induce the production of IL-17 in Th cells, *J.Immunol.* 2000; 165: 6107-6115.

Inglese M, Liu S, Babb JS, Mannon LJ, Grossman RI, Gonen O. Three-dimensional proton spectroscopy of deep gray matter nuclei in relapsing-remitting MS, *Neurology* 2004; 63: 170-172.

Ishizuka J, Grebe K, Shenderov E *et al.* Quantitating T cell cross-reactivity for unrelated peptide antigens, *J.Immunol.* 2009; 183: 4337-4345.

Ivanov II, McKenzie BS, Zhou L *et al.* The orphan nuclear receptor ROR γ directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells, *Cell* 2006; 126: 1121-1133.

Janeway Immunologie, K. Murphy P. Travers M. Walport. Janeway Immunologie. 7 Auflage. 2009.

Jiang H, Zhang SI, Pernis B. Role of CD8+ T cells in murine experimental allergic encephalomyelitis, *Science* 1992; 256: 1213-1215.

Joly E, Mucke L, Oldstone MB. Viral persistence in neurons explained by lack of major histocompatibility class I expression, *Science* 1991; 253: 1283-1285.

Joly E, Oldstone MB. Neuronal cells are deficient in loading peptides onto MHC class I molecules, *Neuron* 1992; 8: 1185-1190.

Junker A, Ivanidze J, Malotka J *et al.* Multiple sclerosis: T-cell receptor expression in distinct brain regions, *Brain* 2007; 130: 2789-2799.

Kawakami N, Nagerl UV, Odoardi F, Bonhoeffer T, Wekerle H, Flugel A. Live imaging of effector cell trafficking and autoantigen recognition within the unfolding autoimmune encephalomyelitis lesion. *J.Exp.Med.* 2005a; 201: 1805-1814.

Kidd D, Barkhof F, McConnell R, Algra PR, Allen IV, Revesz T. Cortical lesions in multiple sclerosis, *Brain* 1999; 122 (Pt 1): 17-26.

Kivisakk P, Imitola J, Rasmussen S *et al.* Localizing central nervous system immune surveillance: meningeal antigen-presenting cells activate T cells during experimental autoimmune encephalomyelitis, *Ann.Neurol.* 2009; 65: 457-469.

Kluge A, Hailer NP, Horvath TL, Bechmann I, Nitsch R. Tracing of the entorhinal-hippocampal pathway in vitro, *Hippocampus* 1998; 8: 57-68.

Konig K. Multiphoton microscopy in life sciences, *J.Microsc.* 2000; 200: 83-104.

Kovac AD, Grammig J, Mahlo J *et al.* Comparison of neuronal density and subfield sizes in the hippocampus of CD95L-deficient (gld), CD95-deficient (lpr) and nondeficient mice, *Eur.J.Neurosci.* 2002; 16: 159-163.

Kovacovics-Bankowski M, Rock KL. A phagosome-to-cytosol pathway for exogenous antigens presented on MHC class I molecules, *Science* 1995; 267: 243-246.

Kupfer A, Singer SJ. The specific interaction of helper T cells and antigen-presenting B cells. IV. Membrane and cytoskeletal reorganizations in the bound T cell as a function of antigen dose, *J.Exp.Med.* 1989; 170: 1697-1713.

Lampson LA. Interpreting MHC class I expression and class I/class II reciprocity in the CNS: reconciling divergent findings, *Microsc.Res.Tech.* 1995; 32: 267-285.

Lang HL, Jacobsen H, Ikemizu S *et al.* A functional and structural basis for TCR cross-reactivity in multiple sclerosis, *Nat.Immunol.* 2002; 3: 940-943.

Langrish CL, Chen Y, Blumenschein WM *et al.* IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation, *J.Exp.Med.* 2005; 201: 233-240

Lee SC, Raine CS. Multiple sclerosis: oligodendrocytes in active lesions do not express class II major histocompatibility complex molecules, *J.Neuroimmunol.* 1989; 25: 261-266.

Lewis RS. The molecular choreography of a store-operated calcium channel, *Nature* 2007; 446: 284-287.

Lie WR, Myers NB, Gorka J, Rubocki RJ, Connolly JM, Hansen TH. Peptide ligand-induced conformation and surface expression of the Ld class I MHC molecule, *Nature* 1990; 344: 439-441.

Lock C, Hermans G, Pedotti R *et al.* Gene-microarray analysis of multiple sclerosis lesions yields new targets validated in autoimmune encephalomyelitis, *Nat.Med.* 2002; 8: 500-508.

Lohning M, Hegazy AN, Pinschewer DD *et al.* Long-lived virus-reactive memory T cells generated from purified cytokine-secreting T helper type 1 and type 2 effectors, *J.Exp.Med.* 2008; 205: 53-61.

Lublin FD, Reingold SC. Defining the clinical course of multiple sclerosis: results of an international survey. National Multiple Sclerosis Society (USA) Advisory Committee on Clinical Trials of New Agents in Multiple Sclerosis. *Neurology* 1996; 46: 907-911.

Lucchinetti C, Bruck W, Parisi J, Scheithauer B, Rodriguez M, Lassmann H. Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination. *Ann.Neurol.* 2000; 47: 707-717.

Maggi E, Giudizi MG, Biagiotti R *et al.* Th2-like CD8+ T cells showing B cell helper function and reduced cytolytic activity in human immunodeficiency virus type 1 infection, *J.Exp.Med.* 1994; 180: 489-495.

Manickasingham S, Reis e Sousa. Microbial and T cell-derived stimuli regulate antigen presentation by dendritic cells in vivo, *J.Immunol.* 2000; 165: 5027-5034.

Maria Göppert-Mayer. Über Elementarakte mit zwei Quantensprüngen. 401, 3 265–384. 1931. *Annalen der Physik.*

McCoy L, Tsunoda I, Fujinami RS. Multiple sclerosis and virus induced immune responses: autoimmunity can be primed by molecular mimicry and augmented by bystander activation, *Autoimmunity* 2006; 39: 9-19.

McFarland HF, Martin R. Multiple sclerosis: a complicated picture of autoimmunity, *Nat.Immunol.* 2007; 8: 913-919.

McGeachy MJ, Chen Y, Tato CM *et al.* The interleukin 23 receptor is essential for the terminal differentiation of interleukin 17-producing effector T helper cells in vivo, *Nat.Immunol.* 2009; 10: 314-324.

Medawar P. Immunity to homologous grafted skin III. 29, 58-59. 1948. Br. J. Exp. Pathol.

Mempel TR, Henrickson SE, von Andrian UH. T-cell priming by dendritic cells in lymph nodes occurs in three distinct phases, Nature 2004; 427: 154-159.

Meuth SG, Herrmann AM, Simon OJ *et al.* Cytotoxic CD8+ T cell-neuron interactions: perforin-dependent electrical silencing precedes but is not causally linked to neuronal cell death, J.Neurosci. 2009; 29: 15397-15409.

Miller MJ, Safrina O, Parker I, Cahalan MD. Imaging the single cell dynamics of CD4+ T cell activation by dendritic cells in lymph nodes. J.Exp.Med. 2004; 200: 847-856.

Miller MJ, Wei SH, Cahalan MD, Parker I. Autonomous T cell trafficking examined in vivo with intravital two-photon microscopy. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 2003; 100: 2604-2609.

Miller MJ, Wei SH, Parker I, Cahalan MD. Two-photon imaging of lymphocyte motility and antigen response in intact lymph node. Science 2002b; 296: 1869-1873.

Miltenyi S, Muller W, Weichel W, Radbruch A. High gradient magnetic cell separation with MACS, Cytometry 1990; 11: 231-238.

Miron VE, Jung CG, Kim HJ, Kennedy TE, Soliven B, Antel JP. FTY720 modulates human oligodendrocyte progenitor process extension and survival, Ann.Neurol. 2008; 63: 61-71.

Misgeld U, Frotscher M. Dependence of the viability of neurons in hippocampal slices on oxygen supply, Brain Res.Bull. 1982; 8: 95-100.

Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins, J.Immunol. 1986; 136: 2348-2357.

Mrass P, Takano H, Ng LG *et al.* Random migration precedes stable target cell interactions of tumor-infiltrating T cells, J.Exp.Med. 2006; 203: 2749-2761.

Mucke L, Oldstone MB. The expression of major histocompatibility complex (MHC) class I antigens in the brain differs markedly in acute and persistent infections with lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV), J.Neuroimmunol. 1992; 36: 193-198.

Muraro PA, Bielekova B. Emerging therapies for multiple sclerosis, Neurotherapeutics. 2007; 4: 676-692.

Negulescu PA, Krasieva TB, Khan A, Kerschbaum HH, Cahalan MD. Polarity of T cell shape, motility, and sensitivity to antigen. Immunity. 1996; 4: 421-430.

- Neumann H, Cavalie A, Jenne DE, Wekerle H. Induction of MHC class I genes in neurons, *Science* 1995; 269: 549-552.
- Neumann H, Medana IM, Bauer J, Lassmann H. Cytotoxic T lymphocytes in autoimmune and degenerative CNS diseases, *Trends Neurosci.* 2002; 25: 313-319.
- Neumann H, Misgeld T, Matsumuro K, Wekerle H. Neurotrophins inhibit major histocompatibility class II inducibility of microglia: involvement of the p75 neurotrophin receptor, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1998; 95: 5779-5784.
- Newman TA, Woolley ST, Hughes PM, Sibson NR, Anthony DC, Perry VH. T-cell- and macrophage-mediated axon damage in the absence of a CNS-specific immune response: involvement of metalloproteinases, *Brain* 2001; 124: 2203-2214.
- Nicoletti F, Patti F, Cocuzza C *et al.* Elevated serum levels of interleukin-12 in chronic progressive multiple sclerosis, *J.Neuroimmunol.* 1996; 70: 87-90.
- Nikcevich KM, Gordon KB, Tan L *et al.* IFN-gamma-activated primary murine astrocytes express B7 costimulatory molecules and prime naïve antigen-specific T cells, *J.Immunol.* 1997; 158: 614-621.
- Nisbet AD, Saundry RH, Moir AJ, Fothergill LA, Fothergill JE. The complete amino-acid sequence of hen ovalbumin, *Eur.J.Biochem.* 1981; 115: 335-345.
- Nitsch R, Pohl EE, Smorodchenko A, Infante-Duarte C, Aktas O, Zipp F. Direct impact of T cells on neurons revealed by two-photon microscopy in living brain tissue. *J.Neurosci.* 2004; 24: 2458-2464.
- Odoardi F, Kawakami N, Klinkert WE, Wekerle H, Flugel A. Blood-borne soluble protein antigen intensifies T cell activation in autoimmune CNS lesions and exacerbates clinical disease, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2007a; 104: 18625-18630.
- Odoardi F, Kawakami N, Li Z *et al.* Instant effect of soluble antigen on effector T cells in peripheral immune organs during immunotherapy of autoimmune encephalomyelitis, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2007b; 104: 920-925.
- Oksenberg JR, Baranzini SE, Sawcer S, Hauser SL. The genetics of multiple sclerosis: SNPs to pathways to pathogenesis, *Nat.Rev.Genet.* 2008; 9: 516-526.
- Oksenberg JR, Panzara MA, Begovich AB *et al.* Selection for T-cell receptor V beta-D beta-J beta gene rearrangements with specificity for a myelin basic protein peptide in brain lesions of multiple sclerosis, *Nature* 1993; 362: 68-70.
- Oldstone MB. Molecular mimicry and autoimmune disease, *Cell* 1987; 50: 819-820.

Opdenakker G, Nelissen I, Van Damme J. Functional roles and therapeutic targeting of gelatinase B and chemokines in multiple sclerosis, *Lancet Neurol.* 2003; 2: 747-756.

Panitch HS, Hirsch RL, Haley AS, Johnson KP. Exacerbations of multiple sclerosis in patients treated with gamma interferon, *Lancet* 1987; 1: 893-895.

Peterson JW, Bo L, Mork S, Chang A, Trapp BD. Transected neurites, apoptotic neurons, and reduced inflammation in cortical multiple sclerosis lesions, *Ann.Neurol.* 2001; 50: 389-400.

Pfeifer JD, Wick MJ, Roberts RL, Findlay K, Normark SJ, Harding CV. Phagocytic processing of bacterial antigens for class I MHC presentation to T cells, *Nature* 1993; 361: 359-362.

Poenie M, Tsien RY, Schmitt-Verhulst AM. Sequential activation and lethal hit measured by $[Ca^{2+}]_i$ in individual cytolytic T cells and targets, *EMBO J.* 1987; 6: 2223-2232.

Polman CH, O'Connor PW, Havrdova E *et al.* A randomized, placebo-controlled trial of natalizumab for relapsing multiple sclerosis, *N.Engl.J.Med.* 2006; 354: 899-910.

Purbhoo MA, Irvine DJ, Huppa JB, Davis MM. T cell killing does not require the formation of a stable mature immunological synapse, *Nat.Immunol.* 2004; 5: 524-530.

Rall GF, Mucke L, Oldstone MB. Consequences of cytotoxic T lymphocyte interaction with major histocompatibility complex class I-expressing neurons in vivo, *J.Exp.Med.* 1995; 182: 1201-1212.

Ramagopalan SV, Dymnt DA, Ebers GC. Genetic epidemiology: the use of old and new tools for multiple sclerosis, *Trends Neurosci.* 2008; 31: 645-652.

Ransohoff RM, Kivisakk P, Kidd G. Three or more routes for leukocyte migration into the central nervous system, *Nat.Rev.Immunol.* 2003; 3: 569-581.

Redwine JM, Buchmeier MJ, Evans CF. In vivo expression of major histocompatibility complex molecules on oligodendrocytes and neurons during viral infection, *Am.J.Pathol.* 2001; 159: 1219-1224.

Rivers, T. M. D. H. Sprunt and G. P. Berry. Observations on attempts to produce acute disseminated encephalomyelitis in monkeys. 58, 39-56. 1933. *J. Exp. Med.*

Rotzschke O, Falk K, Stevanovic S, Jung G, Walden P, Rammensee HG. Exact prediction of a natural T cell epitope, *Eur.J.Immunol.* 1991; 21: 2891-2894.

- Rousset F, Garcia E, Defrance T *et al.* Interleukin 10 is a potent growth and differentiation factor for activated human B lymphocytes, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1992; 89: 1890-1893.
- Rudick RA, Stuart WH, Calabresi PA *et al.* Natalizumab plus interferon beta-1a for relapsing multiple sclerosis, *N.Engl.J.Med.* 2006; 354: 911-923.
- Ruiz M, Roodman ST, Bouhasin JD, Knutsen AP. T cell differentiation/maturation of CD34+ stem cells from HIV-seropositive hemophiliacs in cultured thymic epithelial fragments, *Stem Cells* 1996; 14: 132-145.
- Sailer M, Fischl B, Salat D *et al.* Focal thinning of the cerebral cortex in multiple sclerosis, *Brain* 2003; 126: 1734-1744.
- Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. 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.* 1995; 155: 1151-1164.
- Sallusto F, Lanzavecchia A. Understanding dendritic cell and T-lymphocyte traffic through the analysis of chemokine receptor expression, *Immunol.Rev.* 2000; 177: 134-140.
- Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, Hume DA. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions, *J.Leukoc.Biol.* 2004; 75: 163-189.
- Scott P, Natovitz P, Coffman RL, Pearce E, Sher A. Immunoregulation of cutaneous leishmaniasis. T cell lines that transfer protective immunity or exacerbation belong to different T helper subsets and respond to distinct parasite antigens, *J.Exp.Med.* 1988; 168: 1675-1684.
- Seder RA, Gazzinelli R, Sher A, Paul WE. Interleukin 12 acts directly on CD4+ T cells to enhance priming for interferon gamma production and diminishes interleukin 4 inhibition of such priming, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1993; 90: 10188-10192.
- Sette A, Buus S, Colon S, Smith JA, Miles C, Grey HM. Structural characteristics of an antigen required for its interaction with Ia and recognition by T cells, *Nature* 1987; 328: 395-399.
- Shakhar G, Lindquist RL, Skokos D *et al.* Stable T cell-dendritic cell interactions precede the development of both tolerance and immunity in vivo, *Nat.Immunol.* 2005; 6: 707-714.
- Siffrin V, Brandt AU, Radbruch H *et al.* Differential immune cell dynamics in the CNS cause CD4+ T cell compartmentalization, *Brain* 2009; 132: 1247-1258.
- Skokos D, Shakhar G, Varma R *et al.* Peptide-MHC potency governs dynamic interactions between T cells and dendritic cells in lymph nodes, *Nat.Immunol.* 2007; 8: 835-844.

- Skulina C, Schmidt S, Dornmair K *et al.* Multiple sclerosis: brain-infiltrating CD8⁺ T cells persist as clonal expansions in the cerebrospinal fluid and blood, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2004; 101: 2428-2433.
- Smith JD, Lie WR, Gorka J, Myers NB, Hansen TH. Extensive peptide ligand exchange by surface class I major histocompatibility complex molecules independent of exogenous beta 2-microglobulin. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1992; 89: 7767-7771.
- Smith TR, Kumar V. Revival of CD8⁺ Treg-mediated suppression, *Trends Immunol.* 2008; 29: 337-342.
- Smyth MJ, Kelly JM, Sutton VR *et al.* Unlocking the secrets of cytotoxic granule proteins, *J.Leukoc.Biol.* 2001; 70: 18-29.
- Sobottka B, Harrer MD, Ziegler U *et al.* Collateral bystander damage by myelin-directed CD8⁺ T cells causes axonal loss, *Am.J.Pathol.* 2009; 175: 1160-1166.
- Song R, Porgador A, Harding CV. Peptide-receptive class I major histocompatibility complex molecules on TAP-deficient and wild-type cells and their roles in the processing of exogenous antigens, *Immunology* 1999; 97: 316-324.
- Sospedra M, Martin R. Immunology of multiple sclerosis, *Annu.Rev.Immunol.* 2005; 23: 683-747.
- Steinman L, Martin R, Bernard C, Conlon P, Oksenberg JR. Multiple sclerosis: deeper understanding of its pathogenesis reveals new targets for therapy, *Annu.Rev.Neurosci.* 2002; 25: 491-505.
- Sumen C, Mempel TR, Mazo IB, von Andrian UH. Intravital microscopy: visualizing immunity in context, *Immunity.* 2004; 21: 315-329.
- Sun D, Whitaker JN, Huang Z *et al.* Myelin antigen-specific CD8⁺ T cells are encephalitogenic and produce severe disease in C57BL/6 mice, *J.Immunol.* 2001; 166: 7579-7587.
- Sykulev Y, Joo M, Vturina I, Tsomides TJ, Eisen HN. Evidence that a single peptide-MHC complex on a target cell can elicit a cytolytic T cell response, *Immunity.* 1996; 4: 565-571.
- Szabo SJ, Kim ST, Costa GL, Zhang X, Fathman CG, Glimcher LH. A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment, *Cell* 2000; 100: 655-669.
- Teitelbaum D, Aharoni R, Arnon R, Sela M. Specific inhibition of the T-cell response to myelin basic protein by the synthetic copolymer Cop 1, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1988; 85: 9724-9728.

- Townsend A, Bodmer H. Antigen recognition by class I-restricted T lymphocytes, *Annu.Rev.Immunol.* 1989; 7: 601-624.
- Tzartos JS, Friese MA, Craner MJ *et al.* Interleukin-17 production in central nervous system-infiltrating T cells and glial cells is associated with active disease in multiple sclerosis, *Am.J.Pathol.* 2008; 172: 146-155.
- Urban JF, Jr., Katona IM, Paul WE, Finkelman FD. Interleukin 4 is important in protective immunity to a gastrointestinal nematode infection in mice, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1991; 88: 5513-5517.
- van Oosten BW, Lai M, Hodgkinson S *et al.* Treatment of multiple sclerosis with the monoclonal anti-CD4 antibody cM-T412: results of a randomized, double-blind, placebo-controlled, MR-monitored phase II trial, *Neurology* 1997; 49: 351-357.
- Vass K, Lassmann H. Intrathecal application of interferon gamma. Progressive appearance of MHC antigens within the rat nervous system, *Am.J.Pathol.* 1990; 137: 789-800.
- Veldhoen M, Hocking RJ, Atkins CJ, Locksley RM, Stockinger B. TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells, *Immunity.* 2006; 24: 179-189.
- Villadangos JA, Ploegh HL. Proteolysis in MHC class II antigen presentation: who's in charge? *Immunity.* 2000; 12: 233-239.
- Walunas TL, Lenschow DJ, Bakker CY *et al.* CTLA-4 can function as a negative regulator of T cell activation, *Immunity.* 1994; 1: 405-413.
- Weber F, Meisl E, Aloisi F *et al.* Human astrocytes are only partially competent antigen presenting cells. Possible implications for lesion development in multiple sclerosis, *Brain* 1994; 117 (Pt 1): 59-69.
- Wekerle H. Remembering MOG: autoantibody mediated demyelination in multiple sclerosis? *Nat.Med.* 1999; 5: 153-154.
- Wekerle H, Kojima K, Lannes-Vieira J, Lassmann H, Linington C. Animal models, *Ann.Neurol.* 1994; 36 Suppl: S47-S53.
- Wekerle H, Sun D, Oropeza-Wekerle RL, Meyermann R. Immune reactivity in the nervous system: modulation of T-lymphocyte activation by glial cells. *J.Exp.Biol.* 1987; 132: 43-57.

Wiedemann A, Depoil D, Faroudi M, Valitutti S. Cytotoxic T lymphocytes kill multiple targets simultaneously via spatiotemporal uncoupling of lytic and stimulatory synapses, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2006; 103: 10985-10990.

Wilson EH, Harris TH, Mrass P *et al.* Behavior of parasite-specific effector CD8+ T cells in the brain and visualization of a kinesis-associated system of reticular fibers. *Immunity*. 2009; 30: 300-311.

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

Yewdell JW, Bennink JR. Brefeldin A specifically inhibits presentation of protein antigens to cytotoxic T lymphocytes, *Science* 1989; 244: 1072-1075.

Yewdell JW, Norbury CC, Bennink JR. Mechanisms of exogenous antigen presentation by MHC class I molecules in vitro and in vivo: implications for generating CD8+ T cell responses to infectious agents, tumors, transplants, and vaccines, *Adv.Immunol.* 1999; 73: 1-77.

Zang YC, Li S, Rivera VM *et al.* Increased CD8+ cytotoxic T cell responses to myelin basic protein in multiple sclerosis. *J.Immunol.* 2004; 172: 5120-5127.

Zhang J, Markovic-Plese S, Lacet B, Raus J, Weiner HL, Hafler DA. Increased frequency of interleukin 2-responsive T cells specific for myelin basic protein and proteolipid protein in peripheral blood and cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis, *J.Exp.Med.* 1994; 179: 973-984.

Zipfel WR, Williams RM, Webb WW. Nonlinear magic: multiphoton microscopy in the biosciences, *Nat.Biotechnol.* 2003; 21: 1369-1377.

Ziv Y, Ron N, Butovsky O *et al.* Immune cells contribute to the maintenance of neurogenesis and spatial learning abilities in adulthood. *Nat.Neurosci.* 2006; 9: 268-275.

Lebenslauf

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

Danksagung

Für die Förderung, Anregung und für die Möglichkeit zur Durchführung der Experimente mit dem Zwei-Photonen Mikroskop bedanke ich mich herzlich bei meiner Doktormutter Prof. Frauke Zipp.

Mein besonderer Dank gilt Volker Siffrin für seine unermüdliche Förderung, Motivation und Hilfe vor allem an der Etablierung der Zellkulturen sowie Anregungen für die immunologische Seite des Projektes. Seine Unterstützung mit Kritik und Aufmunterung vor allem in der letzten Phase meiner Arbeit waren für mich eine sehr große Hilfe.

Alexander Brandt danke ich für die wunderbare Einführung in die wissenschaftliche Arbeit und die Arbeit an dem Zwei-Photonen Mikroskop, für seine Ideen und Diskussionen, die das Projekt entscheidend vorangebracht haben.

Des Weiteren möchte ich mich vor allem bei Helena Radbruch bedanken, die mich großartig in das Projekt eingeführt hatte, mir geduldig das experimentelle Arbeiten gezeigt hatte und über die Jahre motiviert und unterstützt hatte.

Mein herzlicher Dank gilt auch Josephine Herz und Natalie Asselborn die mir bei der experimentellen Arbeit mit ihrem Rat und tatkräftigem Beistand begleitet haben und für die Verbesserung und Fortführung der Experimente nach Beendigung meiner Arbeit gesorgt haben.

Helene Salmon danke ich für die Fortführung und Weiterentwicklung dieses Projektes.

Meiner Familie, vor allem meinen Eltern, meinem Mann und meinem Sohn möchte ich für ihre bedingungslose Unterstützung herzlich danken.

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* awn 354.

Meuth,SG., Herrmann,A.M., Simon,O.J., Siffrin,V., Melzer,N., Bittner,S., Meuth,P., Langer,H.F., Hallermann,S., **Boldakowa,N.**, Herz,J., Munsch,T., Landgraf,P., Aktas,O., Heckmann,M., Lessmann,V., Budde,T., Kieseier,B.C., Zipp,F., and Wiendl,H. (2009) Cytotoxic CD8 T Cell–neuron interactions: perforin-dependent electrical silencing precedes but is not causally linked to neuronal cell death. *The Journal of Neuroscience*, 29(49):15397–15409.

Eidesstattliche Erklärung

Ich, Nadiezda Grohmann, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: Wie erkennen Lymphozyten das Gehirn? Analyse des Bewegungsmusters der CD4+ und CD8+T-Zellen im Rahmen der Antigenerkennung im nichtentzündeten Hirngewebe 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 09.06.2011

Nadiezda Grohmann