

Seite 1

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

DISSERTATION

Analyse des Bewegungsmusters von T-Zellsubtypen im
zentralen Nervensystem

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Helena Dorothea Radbruch

aus Bonn

Gutachter/in: 1. Prof Dr. med. F. Zipp
 2. JProf. Dr. med. A. Bräuer
 3. Prof. Dr. med. C. Stadelmann-Nessler

Datum der Promotion: 29.01.2010

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	7
1 EINLEITUNG UND ZIELSTELLUNG	10
1.1 Grundzüge des Immunsystems	10
1.1.1 Angeborene und Adaptive Immunität	10
1.1.2 Antigen präsentierende Zellen	10
1.1.3 Die Rolle der B-Zellen	11
1.1.4 Die Rolle der T-Zellen.....	11
1.1.5 Gedächtniszellen	15
1.2 Mechanismen der Immunüberwachung des zentralen Nervensystems	16
1.2.1 Das intakte ZNS	16
1.3 Multiple Sklerose und Konzepte zur Autoimmunität im zentralen Nervensystem	17
1.3.1 Pathogenese der Multiplen Sklerose	17
1.3.2 Klinische Zeichen der Multiple Sklerose	19
1.3.3 Aktuelle Therapiemöglichkeiten	19
1.4 Ziel der Arbeit.....	20
2 MATERIAL UND METHODEN	21
2.1 Laborartikel	21
2.1.1 Puffer, Lösungen, Zellkultur- und Hirnschnittkulturmedien.....	21
2.1.2 Interleukine	21
2.1.3 Peptide	22
2.1.4 Fluorochrome für die Zwei Photonen Mikroskopie.....	22
2.1.5 Antikörper und Sekundärfarbstoffe.....	22
2.1.6 Sonstige Reagenzien und Chemikalien	23
2.1.7 Kunststoffartikel und sonstige Materialien.....	24
2.1.8 Verwendete Software	24
2.1.9 Geräte.....	24
2.2 Tiermodelle.....	24
2.2.1 C57BL/6.....	25
2.2.2 SJL	25
2.2.3 Ovalbumin als Modellantigen	25
2.3 T-Zell-Hirnschnitt Kokultur	26

2.3.1	Prinzip.....	26
2.3.2	Hippokampus Schnitte	26
2.3.3	Zellbiologische Methoden.....	26
2.3.4	Magnetische Zellsortierung	29
2.3.5	Färbung	29
2.3.6	Durchflusszytometrie.....	30
2.4	Zwei Photonen Mikroskopie	31
2.4.1	Grundlagen.....	31
2.4.2	Aufbau	33
2.4.3	Messungen und Auswertungen der Kokulturrexperimente	33
3	ERGEBNISSE	35
3.1	Welche Zellen wandern in vitales murines Hirngewebe ein.....	35
3.1.1	Restimulation für 4 Tage mit MOG	35
3.1.2	Stimulierung von MOG reaktiven Zellen mit Phorbol 12-Myristat 13-Acetat/Ionomycin oder Staphylokokken Enterotoxin B.....	37
3.1.3	Anreicherung Interferon- γ produzierender Zellen	37
3.1.4	Isolierung von T- Zellen aus dem ZNS erkrankter Mäuse.....	39
3.1.5	MOG Zelllinien vom Th1 Phänotyp durch Verdünnungsansatz	39
3.1.6	Ovalbuminspezifische T-Zellen	41
3.2	Analyse des Bewegungsmusters von CD4+ und CD8+ T-Zellen	43
3.2.1	Migrationsverhalten von CD4+ und CD8+ T Lymphozyten in nicht-entzündetem Mausgehirn	43
3.2.2	Geschwindigkeit	44
3.2.3	Bewegungsvektoren und Bewegungsvektor-Gefäßwinkel.....	47
3.3	Blockierung von Adhäsionsmolekülen	49
3.3.1	Inkubation mit Anti-VLA-4.....	49
3.3.2	CXCR4 Blockade durch AMD3100.....	50
4	DISKUSSION	53
4.1	Die Rolle von CD4+ und CD8+ T-Zellen bei Multipler Sklerose und EAE	53
4.1.1	Was beeinflusst die Motilität der T-Zellen im ZNS?.....	54
4.1.2	Wodurch wird die Ansammlung um die Gefäße beeinflusst?.....	59
4.2	Therapeutische Konsequenzen	67
4.2.1	antiretroviral.....	67
4.2.2	hämato- onkologisch und kardiologisch	68
4.2.3	Entzündliche Erkrankungen des ZNS	68

LITERATURVERZEICHNIS	71
TIERSCHUTZ.....	83
LEBENS LAUF	85
PUBLIKATIONS LISTE.....	86
ZUSAMMENFASSUNG.....	87
ABSTRACT	87
EIDESSTÄTTLICHE ERKLÄRUNG	88

Für Tonino

Abkürzungsverzeichnis

2PM	Zwei Photonen Mikroskopie
7AAD	7-Aminoactinomycin D
ACSF	<i>engl.: artificial cerebrospinal fluid</i> - künstlicher Liquor
AIDS	<i>engl.: acquired immunodeficiency syndrome</i> - erworbenes Immundefektsyndrom
APC	Antigen präsentierende Zelle
APC	Allophycocyanin
AS	Aminosäure
BSA	Bovines Serumalbumin
CD	<i>engl.: cluster of differentiation</i> - Unterscheidungsgruppen
CFA	komplettes Freudsches Adjuvans
CFSE	Carboxyfluoreszein-diazetatsuccinimidylester
CMTMR	5-(und-6)-(((4-chloromethyl)benzoyl)amino)tetramethylrhodamin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EAE	experimentelle autoimmune Enzephalitis
FACS	<i>engl.: fluorescence activated cell sorting</i> - Durchflusszytometrie
FCS	Fetales Kälber Serum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSC	<i>engl.: forward scatter</i> - Vorwärtsstreulicht
g	Gravitationskraft
GA	Glatiramerazetat
G-CSF	Granulozyten-Kolonie stimulierender Faktor
GFP	<i>engl.: green fluorescent protein</i> - grün fluoreszierendes Protein
HLA	Humanes Leukozyten Antigen
HIV	Humanes Immunodefizienz Virus
i.v.	Intravenös
IFN	Interferon

Ig	Immunoglobulin
IL	Interleukin
IMDM	Iscove's Mod Dulbecco's Medium
m	murin
MB	magnetische Mikropartikel
MHC	<i>engl.: major histocompatibility complex</i> - Hauptgewebeverträglichkeitskomplex
MOG	Myelin Oligodendrozyten Glykoprotein
N	Anzahl
NA	Numerische Apertur
NaCl	Natriumchlorid
NF-κB	Nuklearer Faktor κB
OT	Mausstamm mit für Ovalbumin transgenem T-Zellrezeptor
OVA	Ovalbumin
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PE	Phycoerithrin
PerCp	Peridin Chlorophyl Protein
PFA	Paraformaldehyd
PI	Propidiumiodid
PLP	Proteolipid Protein
PMA	Phorbol 12-Myristat 13-Acetat
PTX	Pertussistoxin
RPMI	Rosewell Park Memorial Institute Medium
s	Sekunde
SEB	Staphylokokken Enterotoxin B
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
SPF	speziell pathogen frei
SSC	<i>engl.: side scatter</i> - Seitwärtsstreulicht
TCR	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
W	Watt
ZNS	zentrales Nervensystem
α -m	Anti-murin

1 Einleitung und Zielstellung

1.1 Grundzüge des Immunsystems

1.1.1 Angeborene und Adaptive Immunität

Lebewesen kommen in ihrer Umwelt ständig mit schädigenden Viren, Bakterien, Pilzen oder Parasiten in Kontakt, dennoch sind sie nicht permanent krank. Ein Abwehrsystem, das Immunsystem, sollte pathogene von harmlosen Einflüssen unterscheiden können. Es wird in zwei große Bereiche untergliedert, die angeborene und die adaptive Immunität, die sich an den verschiedenen Berührungspunkten beeinflussen.

Evolutionsgeschichtlich gesehen entstand die so genannte angeborene Immunität zuerst, sie ist unmittelbar und relativ unspezifisch. Ein Hauptmechanismus ist die Beseitigung von Pathogenen im Körper durch Fresszellen (Makrophagen und Granulozyten). Fresszellen können durch Phagozytose eine Vielzahl unterschiedlicher Krankheitserreger aufnehmen und eliminieren.

Bei Wirbeltieren sind Zellen entstanden- Lymphozyten- die Gefahren wie Infektionen, Pathogene oder Verletzungen für den Körper erkennen und entsprechende antigenspezifische Zellen aktivieren können. Das Besondere der Antigenerkennung ist, dass jeder Lymphozyt einen spezifischen Rezeptor exprimiert, der ein spezifisches Antigen erkennt. Diese Rezeptor-Spezifität kommt durch eine zufällige Rekombination bestimmter Genabschnitte in den Zellen zustande und bewirkt, dass jede Zelle einen einzigartigen Antigen-Rezeptor besitzt. Die adaptive Immunität ist unglaublich vielfältig und präzise. Eine herausragende Eigenschaft der adaptiven Immunantwort ist das immunologische Gedächtnis, welches beim nächsten Kontakt mit dem gleichen Antigen eine schnellere und effektivere Immunantwort ermöglicht.

1.1.2 Antigen präsentierende Zellen

Alle kernhaltigen Zellen zeigen MHC-Moleküle (MHC, *major histocompatibility complex*), welche die Abbauprodukte des kompletten zellulären Proteinkatabolismus in Form von Peptiden präsentieren. Professionell Antigen präsentierende Zellen, dazu zählen klassischerweise dendritische Zellen, Makrophagen und B-Zellen, werden durch Gefahrensignale aktiviert. Die Peptide werden gleichzeitig mit kostimulierenden Molekülen wie CD80 und CD86 präsentiert. Naive T-Zellen erkennen die in diesem Kontext präsentierten Moleküle, werden aktiviert und entwickeln sich zu Effektorzellen.

Lange wurde die Funktion der Antigen präsentierenden Zellen, wie der Name schon sagt, überwiegend in der effektiven Präsentation von Antigenen gesehen. In letzter Zeit schreibt man ihnen jedoch auch ein suppressorisches Potential bezüglich der T-Zell-Aktivität und Immunantwort zu.

1.1.2.1 Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC)

MHC Klasse I-Moleküle können in der Regel Peptide von 8 bis 10 Aminosäuren Länge binden. Es gibt in einer Population viele verschiedene MHC-I-Moleküle und somit viele verschiedene Peptidbindungsstellen, in denen jeweils unterschiedliche Peptide bevorzugt gebunden werden. Moleküle des eben-

falls klassischen, also polymorphen und peptidbindenden MHC-II kommen nur auf der Oberfläche von Antigen präsentierenden Zellen vor. Sie können Peptide binden, die über 20 Aminosäuren lang sind [Janeway et al., 2007].

Der so genannte MHC-I-Weg ist für die Präsentation von zytosolischen Antigenen und die Stimulation von CD8+ T-Zellen verantwortlich, der so genannte MHC-Klasse II-Weg vermittelt die Präsentation von exogenen Antigenen und die Stimulation von CD4+ T-Zellen [Janeway et al., 2007]. Die beiden klassischen Präsentationswege sind aber nicht exklusiv, denn in Antigen präsentierenden Zellen wurde auch die Präsentation von exogenen Antigenen über den MHC-I abhängigen Weg beobachtet. Dieser Prozess wird als Kreuzpräsentation bezeichnet [Heath and Carbone, 2001].

1.1.3 Die Rolle der B-Zellen

B-Zellen reifen im Knochenmark. Sie sind als einzige Zellen in der Lage, Antikörper zu bilden. Sie tragen einen Rezeptor, der ihnen erlaubt Antigene aufzunehmen, die zur Spezifität des Rezeptors passen. Nach der Aktivierung durch das spezifische Antigen über den B-Zell-Rezeptor kann die B-Zelle sich entweder zur antikörperproduzierenden Plasmazelle oder zur Gedächtniszelle entwickeln. Antikörper sind lösliche Moleküle, die in ihrer Spezifität mit der des B-Zell-Rezeptors übereinstimmen. Antikörper können vereinfacht als lösliche Form des B-Zell-Rezeptors gesehen werden, sie werden sezerniert und können mit Körperflüssigkeiten fortbewegt werden. Daher bezeichnet man die B-Zell vermittelte Immunreaktion auch als humorale Immunantwort. Antikörper haben eine Y-förmige Gestalt, sie besitzen zwei identische Antigen-Bindungsstellen und können durch Bindung an pathogene Organismen oder Substanzen deren Phagozytose oder Lyse erleichtern oder sogar erst ermöglichen.

1.1.4 Die Rolle der T-Zellen

T-Zellen entstehen auch im Knochenmark, ihre eigentliche Entwicklung und Reifung findet allerdings im Thymus statt. Klassische T-Zellen sind nach ihrer Ausbildung und Selektion im Thymus zur Erkennung von körperfremden Peptiden fähig. Sie tragen einen spezifischen T-Zell-Rezeptor, der aus zwei über eine Disulfidbrücke verbundenen Polypeptidketten besteht (α - und β -Kette bei $\alpha\beta$ -T-Zellen). T-Zellen können aber im Gegensatz zu B-Zellen kein freies Antigen erkennen, sondern nur Antigene, die über MHC-I oder MHC-II auf der Oberfläche von Körperzellen präsentiert werden. Aufgrund der Expression von Kofaktoren können T-Zellen in die Gruppe der CD4+ T-Helferzellen und CD8+ zytotoxischen T-Zellen unterteilt werden. Dabei besteht die Hauptaufgabe der T-Helferzellen in der Modulation der Immunantwort durch Ausschüttung von Zytokinen und bei den CD8+ T-Zellen darin, dass sie Zellen töten, die Peptide präsentieren, welche zu ihrer Aktivierung geführt haben [Janeway et al., 2007].

1.1.4.1 Naive T-Zellen

Naive T-Zellen zirkulieren im Körper durch das Blut nachdem sie im Thymus mehrere Selektionsschritte durchlaufen haben. Sie wandern in den so genannten postkapillären Venolen mit hohem Endothel in die Lymphknoten aus. Hier treten sie mit Antigen präsentierenden Zellen in Kontakt und treten über die efferenten Lymphbahnen wieder in den Blutkreislauf aus. Bei ihrem permanenten Pendeln zwischen Lymphorganen und Blutkreislauf können sie auf der Oberfläche von Antigen präsentierenden

Zellen viele MHC-Peptid-Komplexe durchmustern. Über den T-Zellrezeptor können sie ein bestimmtes, mit einem spezifischen Peptid beladenes MHC-Molekül erkennen. Die Dauer einer kompletten Zirkulation dauert 12 bis 18 Stunden [Sprent and Basten, 1973].

Naive T-Zellen sind durch die Expression von verschiedenen Oberflächenmarkern charakterisiert. Für das Auffinden der Lymphknoten sind z.B. L-Selektin (CD62L) und der CC-Chemokinrezeptor 7 (CCR-7) verantwortlich. Sie zeigen keinerlei Aktivierungsmarker, wie z.B. CD69, ein Lektin, *very early activation antigen*, CD25, die α -Kette des Interleukin-2-Rezeptors und CD95L (Fas-Ligand), sowie das Fehlen von Wanderungsmarkern, wie z.B. CD44, ein Zelladhäsionsmolekül [Bradley et al., 1994; Janeway et al., 2007]. Naive T-Zellen exprimieren die CD45RO Variante während Gedächtniszellen die CD45RA Form exprimieren.

1.1.4.2 Aktivierung von T-Zellen

Die gleichzeitige Bindung des T-Zell-Rezeptors einer T-Zelle an den passenden MHC-Peptid-Komplex und von CD28 an B7-Moleküle löst die Aktivierung einer naiven T-Zelle aus. Diese koordinierte Wechselwirkung ist bereits nach wenigen Stunden ausreichend, um die Proliferation und Programmierung zu einer Effektorzelle auszulösen [Janeway et al., 2007]. Die Dichte des T-Zellrezeptors auf der Zelloberfläche wird reduziert, indem er vermehrt intrazellulär zurückgehalten wird [Liu et al., 2000]. Die T-Zelle tritt in die G₁-Phase des Zellzyklus ein und gleichzeitig wird die Synthese von Interleukin-2, sowie der α -Kette des Interleukin-2-Rezeptors induziert. Interleukin-2 wirkt autokrin und löst zwei bis drei Zellteilungen pro Tag über eine Dauer von mehreren Tagen aus. Ruhende T-Zellen besitzen einen nur aus β - und γ -Ketten bestehenden, nieder affinen Interleukin-2-Rezeptor. Durch zusätzliche Verbindung mit der neu synthetisierten α -Kette bildet sich ein hoch affiner Interleukin-2-Rezeptor, wodurch die Zellen auf sehr geringe Interleukin-2 Konzentrationen ansprechen können. Die Zellteilungen sind wichtig für die Generierung von vielen Tochterzellen mit einem identischen T-Zellrezeptor und die weitere Differenzierung zu Effektorzellen. Vier bis fünf Tage nach Aktivierung differenzieren sich die Nachkommen der aktivierten T-Zelle zu Effektorzellen. Sie zeigen dabei veränderte Expression von Oberflächenmolekülen. Sie exprimieren nun CTLA-4 (*CTL activation associated protein 4*), verwandt mit CD28. CTLA-4 bindet ebenfalls an B7-Moleküle und liefert ein negatives Signal an zuvor aktivierte T-Zellen und begrenzt somit ihre Proliferation [Walunas et al., 1994]. Des Weiteren werden viele Zelladhäsionsmoleküle nun anders reguliert und die Glykosylierung vieler Oberflächenproteine ändert sich. Damit wird erreicht, dass die Zellen aufhören durch die Lymphknoten zu wandern und zu den Entzündungsherden gelangen [Janeway et al., 2007]. Bei einem Zusammentreffen mit ihrem spezifischen Antigen ist bei Effektorzellen keine Kostimulation mehr erforderlich, denn verglichen mit naiven T-Zellen reicht ein wesentlich geringerer Schwellenwert bezüglich der Antigendichte und -menge aus die Zellen zu aktivieren.

1.1.4.3 CD8⁺ T-Zellen

CD8⁺ Effektorzellen werden auch zytotoxische T-Zellen genannt. Sie erkennen ihr Antigen im Kontext der Präsentation durch MHC-I Moleküle. Kommt es zu einer Infektion der Zelle mit intrazellulären Erregern oder entartet eine Zelle, werden Peptide des Erregers oder der entarteten Zelle auf der Ober-

fläche im MHC-I Kontext präsentiert. Wenn CD8+ T-Zellen ihr Antigen dort erkennen werden sie aktiviert und sezernieren zytotoxische Moleküle, die die infizierte Zelle in den programmierten Zelltod treibt. Dies kann über verschiedene Wege geschehen. Perforine bilden Löcher in der Membran der Zielzelle. Granzyme gelangen durch diese Poren in die Zielzelle und lösen über Caspase-Aktivierung Apoptose aus. Über die Bindung des Fas-Liganden (CD95L), der auf aktivierten CD8+ T-Zellen und auch auf Th1-Zellen exprimiert ist, an Fas (CD95) auf den Zielzellen kommt es ebenfalls zur Caspase-Aktivierung und Auslösung von Apoptose in den Zielzellen. Auch über die Freisetzung von Zytokinen, z.B. Interferon- γ , TNF- α und TNF- β , können CD8+ T-Zellen Effektorfunktion ausüben. Interferon- γ hemmt direkt die virale Replikation und führt zu einer gesteigerten Expression von Molekülen, welche an der Peptidbeladung von MHC-I Molekülen von virusinfizierten Zellen beteiligt sind. Eine kleine Untergruppe der zytotoxischen CD8+ T-Zellen, so genannte Tc2-Zellen produziert weniger Interferon- γ und mehr, wie für Th2 Zellen typisch (siehe 1.1.4.4.2), Interleukin-4 [Maggi et al., 1994] wodurch auch in einer durch Th2-Zellen vermittelten Immunantwort mit Antikörpern Zytotoxizität möglich ist.

Über CD8+ T-Zellen mit suppressorischer Wirkung (Ts-Zellen) weiß man bisher noch wenig. Im Unterschied zu den regulatorischen CD4+ T-Zellen sind sie antigenspezifisch [Smith and Kumar, 2008]. Ein Hauptmechanismus ihrer suppressorischen Wirkung ist Zellkontakt abhängig. Einige können Interferon- γ und Interleukin-10 produzieren [Noble et al., 2006].

CD8+ T-Zellen teilen sich nach der Aktivierung mindestens fünf bis neun Mal. Eine aktivierte CD8+ T-Zelle kann viele infizierte Zellen töten, die Stärke der Immunantwort wird also potenziert. Die Aktivierung von CD8+ T-Zellen ist stark reguliert. CD8+ T-Zellen brauchen direkte oder indirekte Hilfe von T-Helfer-Zellen.

1.1.4.4 CD4+ T- Zellen

T-Helfer-Zellen unterscheiden sich phänotypisch von CD8+ T-Zellen, indem sie anstelle des CD8 das CD4 Moleküle als Korezeptor des T-Zellrezeptors exprimieren. CD4+ T-Zellen erkennen mit ihrem T-Zellrezeptor nur Antigene, die im MHC-II Kontext präsentiert werden. Die Expression von MHC-II ist nicht ubiquitär, sondern auf professionelle Antigen präsentierende Zellen beschränkt (siehe Abschnitt 1.1.3). Eine Hauptaufgabe der T-Helfer- Zellen ist es, andere Zellen des Immunsystems so zu dirigieren, dass eine effektive und wohl abgestimmte Immunantwort ausgelöst wird. Die T-Helferzellen haben die unterschiedlichsten Wirkungsweisen. Anhand der von ihnen produzierten Zytokine lassen sie sich in mehrere Gruppen einteilen. Wichtiger molekularer Mechanismus ist hierbei ein jeweils für die Untergruppe spezifischer Transkriptionsfaktor. Lange Zeit unterschied man die so genannten Th1 und Th2 Zellen [Mosmann et al., 1986], heute werden aber auch die Th17 Zellen als eigenständige Untergruppe gezählt [Harrington et al., 2005], ebenso die CD4+ regulatorischen T-Zellen (siehe Abb.1). In Abhängigkeit von der immunologischen Umgebung zu diesem Zeitpunkt entscheidet sich, in welche Richtung die Differenzierung geht. Zum einen ist es das Zytokinprofil, die Menge und genaue Sequenz des antigenen Peptides, welches die Reaktion auslöst, zum anderen die Stärke der Wechselwirkung zwischen T-Zellrezeptor und MHC-Peptid-Komplex [Janeway et al., 2007].

Die unterschiedlichen Wirkungsweisen von Th1- und Th2-Zytokinen sind für die Bekämpfung unterschiedlicher Erregertypen notwendig. Intrazelluläre Erreger, wie z.B. *Leishmania major*, werden effektiv durch eine Th1-Antwort bekämpft [Scott et al., 1988]. Für die Immunantwort gegen Parasiten, wie zum Beispiel Würmer, ist eine Th2-Antwort notwendig [Urban, Jr. et al., 1991]. In der Regel findet man bei Infektionen eine gemischte Antwort, je nach Erregertyp mit einer Th1- oder einer Th2-Dominanz.

1.1.4.4.1 Th1

Durch die Ausschüttung von Zytokinen wie Interferon- γ , TNF α und Interleukin-2 steuern Th1-Zellen die Immunantwort in eine zellulär betonte Richtung. Es werden Makrophagen aktiviert und die Antigenpräsentation nimmt zu. Zytotoxische-T-Zellen werden zur Proliferation und B-Zellen zum Klassenwechsel angeregt, was dazu führt, dass Makrophagen die durch die Immunglobulin G (IgG) Antikörper markierten Objekte besser fressen können. Die Rolle des Zytokins Interferon- γ in der Immunregulation ist sehr komplex. Von Th1-Zellen sekretierte Zytokine werden aufgrund ihrer entzündungsinduzierenden Wirkung auch als proinflammatorische Zytokine bezeichnet und dienen der Bekämpfung von intrazellulären Bakterien und Virusinfektionen.

Durch von Makrophagen und dendritischen Zellen produziertes Interleukin-12, sowie von natürlichen Killerzellen und CD8+ T-Zellen sekretiertes Interferon- γ wird die Differenzierung der naiven T-Zelle in die Th1 Richtung dirigiert [Seder et al., 1993]. Kennzeichen der Th1-Zellen ist der Transkriptionsfaktor T-bet [Szabo et al., 2000]. Sowohl Th1- als auch Th2-Zellen inhibieren die Differenzierung des jeweils anderen Subtyps [Fernandez-Botran et al., 1988]. Interleukin-12 und Interferon- γ inhibieren also die Differenzierung von Th2-Zellen, während Interleukin-4 die Differenzierung von Th1-Zellen inhibiert.

1.1.4.4.2 Th2

Th2-Zellen steuern die Immunantwort in eine humoral betonte Richtung und sie sind charakterisiert durch die Produktion von Zytokinen wie TNF- β , Interleukin-4, Interleukin-5, Interleukin-10 und Interleukin-13. Der Transkriptionsfaktor GATA-3 bewirkt die Differenzierung in Th2 Zellen [Hofer et al., 2002]. Sie können B-Zellen sehr stark anregen. Interleukin-4 sorgt bei der Aktivierung von B-Zellen vor allem für die Bildung von neutralisierenden Antikörperklassen, d.h. einen Klassenwechsel zu IgA, IgG oder IgE. Interleukin-10 stimuliert B-Zellen, steuert ihre Differenzierung und ist für sie ein wichtiger Überlebensfaktor [Rousset et al., 1992]. Wenn bei der Aktivierung von CD4+ T-Zellen Interleukin-4 vorhanden ist, entsteht eine Th2-Antwort, welche durch Interleukin-6 verstärkt werden kann.

1.1.4.4.3 Th17

Th17-Zellen sind durch die Produktion des Zytokins Interleukin-17 charakterisiert. Ähnlich wie Th1-Zellen werden sie generell als proinflammatorische Zellen betrachtet. Beschrieben ist ihre Präsenz vor allem in chronischen Entzündungen [Infante-Duarte et al., 2000; Chabaud et al., 1999]. Interleukin-17-produzierende Zellen werden durch das Zytokin Interleukin-23 induziert [Aggarwal et al., 2003]. Interleukin-23 ist ein heterodimeres Zytokin aus einer p19-Untereinheit und einer p40-Untereinheit, die es mit Interleukin-12 gemeinsam hat. Interleukin-23 wird von aktivierten dendritischen Zellen und Makrophagen sezerniert. Im Gegensatz zu Interleukin-12 induziert Interleukin-23 keine Interferon- γ produ-

zierenden Zellen, sondern expandiert Interleukin-17-sekretierende CD4+ T-Zellen [Langrish et al., 2005]. Seit der Entdeckung des Transkriptionsfaktors ROR γ T werden Th17 Zellen als eigenständige Untergruppe gezählt [Ivanov et al., 2006]. Harrington und Kollegen zeigten, dass Interferon- γ und Interleukin-4, klassische Th1- bzw. Th2-Zytokine, die Entwicklung von Th17-Zellen inhibieren, während beide Zytokine auf bereits differenzierte Th17-Zellen keinen Effekt haben [Harrington et al., 2005]. Veldhoen und Kollegen zeigten, dass auch TGF β und auch Interleukin-6 wichtig für die Entwicklung dieses Zelltyps sind [Veldhoen et al., 2006].

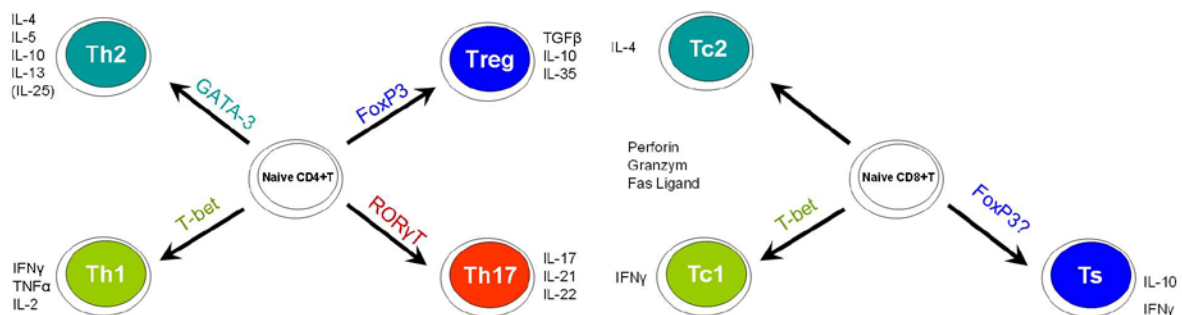


Abb. 1: Darstellung der unterschiedlichen T-Zellsubtypen und der Faktoren, die den Phänotyp bestimmen so wie einige der Effektormoleküle der einzelnen Zelltypen. Th= T-Helferzelle, Treg=regulatorische T-Zelle, Tc=zytotoxische T-Zelle, Ts=suppressorische T-Zelle

1.1.5 Gedächtniszellen

Neben den erwähnten Effektorfunktionen der B- und T-Zellen besitzt das adaptive Immunsystem ein Gedächtnis, welches mit langlebigen Gedächtniszellen bei einem sekundären Kontakt mit dem Antigen für eine schnellere und wirksamere Immunantwort sorgt. Im Gegensatz zu naiven Zellen sind sie sofort nach Antigenkontakt fähig, Effektormoleküle zu sekretieren. Welche Mechanismen zur Ausbildung des immunologischen Gedächtnisses führen ist weitgehend unklar.

Bei B-Zellen geht man davon aus, dass sie aktiviert zu kurzlebigen Plasmazellen oder zu Keimzentrumzellen werden. Letztere können dann zu kurz- oder langlebigen B-Gedächtniszellen oder aber langlebigen Plasmazellen werden [Dorner and Radbruch, 2005; Manz et al., 1997].

Nach Elimination des Pathogens sterben die meisten der spezifischen T-Zellen in einem Prozess, der aktivierungsinduzierter Zelltod genannt wird. Der Zellabbau findet dabei größtenteils in der Leber und auch in der Milz statt [Baumann et al., 2002]. Die überlebenden spezifischen Zellen bilden das so genannte T-Zellgedächtnis [Sallusto and Lanzavecchia, 2001]. Gedächtniszellen können sich aus Effektorzellen entwickeln [Lohning et al., 2008]. Die T-Gedächtniszellen zirkulieren vor allem durch die peripheren Organe; ein kleiner Teil ist weiterhin in den lymphatischen Organen zu finden.

Gedächtniszellen unterscheiden sich in einer ganzen Reihe von Oberflächenmarkern von naiven T-Zellen, haben aber viele Oberflächenmarker mit Effektorzellen gemeinsam.

1.2 Mechanismen der Immunüberwachung des zentralen Nervensystems

Die Überwachung des ZNS durch das Immunsystem ist ein unverzichtbarer Vorgang, um gefährliche schädigende Einflüsse zügig zu limitieren und die Regeneration zu fördern, ohne jedoch die für die einwandfreie Funktion der Nervenzellen essentielle empfindliche Homöostase des ZNS zu stören. Durch jede Immunreaktion können erhebliche Kollateralschäden entstehen, da das ZNS ein Ort mit hochgradig differenziertem Gewebe aus schlecht regenerationsfähigen, postmitotischen Zellen ist und durch die Schädelkalotte nur wenig Raum für eine Schwellung des Gewebes ist.

1.2.1 Das intakte ZNS

Vor allem drei physiologische und anatomische Aspekte spielen bei der Sonderstellung des ZNS bei der Immunüberwachung eine wichtige Rolle. Anders als die meisten Organe ist das ZNS durch eine von Paul Ehrlich 1885 erstmalig beobachtete, selektive, quasi impermeable Barriere für Makromoleküle und Zellen - der Blut-Hirn-Schranke - von dem ständig wechselnden Milieu der Peripherie getrennt [Ehrlich, 1885]. Im Normalzustand sind die hoch spezialisierten Endothelzellen hier sehr eng miteinander über *tight junctions* verbunden [Hickey, 2001]. Als weitere Besonderheit fehlen klassische lymphatische Gefäße, über die Antigene und Antigen präsentierende Zellen zu den Lymphknoten transportiert werden. Der dritte wichtige Aspekt war, dass man früher davon ausging, dass es im ZNS Parenchym sogar bei dendritischen Zellen nahezu keine MHC-Moleküle, weder MHC-I noch MHC-II gäbe [Piehl and Lidman, 2001]. Demzufolge ging man davon aus, dass das ZNS hinter der Blut-Hirn-Schranke „versteckt“ sei, und dass es keinen Zugang zu den peripheren immunologischen Organen habe. Die entstehenden T- und B-Zellen würden sich ohne einen möglichen Kontakt mit ZNS Strukturen entwickeln und die dabei denkbaren autoreaktiven Zellen würden aufgrund der Blut-Hirn-Schranke und des Mangels an MHC-Molekülen das Gehirn nicht erreichen.

Diese Ansicht wird jedoch nicht mehr vertreten, da mittlerweile gezeigt werden konnte, dass trotz dieser Besonderheiten die Verbindungen von Nerven- und Immunsystem sehr zahlreich sind. Auch im Normalzustand können Immunzellen das ZNS patrouillieren ohne es zu schädigen [Hickey et al., 1991; Wekerle et al., 1986; Smorodchenko et al., 2007]. Zur Zeit werden drei Wege für den Eintritt der Lymphozyten in das ZNS beschrieben: die Lymphozyten treten entweder über den Plexus choroideus in den Liquor oder über den subarachnoidalen Raum und über perivaskuläre Räume des ZNS ein [Engelhardt and Ransohoff, 2005].

Mit den peripheren lymphatischen Organen ist trotz fehlender klassischer Lymphdrainagewege das zentrale Nervensystem zum Beispiel über die Hirnnerven verbunden [Cserr et al., 1992; Goldmann et al., 2006], so dass der Austausch von Antigenen und Zellen zwar möglich ist, aber auf ein Minimum

reduziert wird. Man vermutet, dass die klassischen Lymphgefäße zur Entwicklung lösliche Faktoren brauchen, die vor allem im Rahmen von entzündlichen Prozessen oder Immunreaktionen produziert werden [Saharinen et al., 2004] und modifiziert im zentralen Nervensystem ablaufen.

Antigen präsentierende Zellen des ZNS sind vor allem Mikrogliazellen und Astrozyten, aber auch Makrophagen, B-Zellen und insbesondere perivaskulär dendritische Zellen [Hickey, 2001]. Diese Zellen können alle MHC-II Moleküle exprimieren und T-Zellen aktivieren. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Neurone MHC-Moleküle *in vivo* präsentieren [Boulanger and Shatz, 2004].

In einer Vielzahl von Situationen verändert sich das Milieu des ZNS in eine für das Immunsystem günstigere Lage. Bei Infektionen, Neoplasien, Neurodegeneration und Ischämien kommt es zu Immunantworten und entzündlichen Reaktionen. In diesem Rahmen können an der Blut-Hirn-Schranke Adhensionsmoleküle und Chemokinexpression induziert und MHC- Moleküle im ZNS gebildet werden. Interessanterweise scheinen im Normalzustand Neurone aktiv die Expression von MHC-Molekülen zu hemmen, die dann bei gestörter neuronaler Funktion auf den Gliazellen exprimiert werden [Neumann et al., 1996; Neumann and Wekerle, 1998]. Als Konsequenz dieser veränderten Umgebung kann es einerseits zu einer vermehrten Transmigration durch die Blut-Hirn-Schranke und andererseits zu einer massiven Infiltration mit Entzündungszellen vor allem perivaskulär und auch im ZNS Parenchym kommen.

1.3 Multiple Sklerose und Konzepte zur Autoimmunität im zentralen Nervensystem

Von Autoimmunreaktionen spricht man, wenn das adaptive Immunsystem sich gegen körpereigene, gesunde Zellen richtet. Den genauen Mechanismus, wie das Immunsystem „Selbst“ von „Fremd“ differenziert und wie es zu den fehlgerichteten Immunreaktionen kommt, ist bisher nicht vollständig verstanden, so dass sich die meisten der zur Zeit verfügbaren Therapien der Autoimmunerkrankungen zum Großteil auf eine unspezifische Suppression des Immunsystems beschränken [Feldmann and Steinman, 2005]. Multiple Sklerose ist die häufigste neurologische Erkrankung im jungen Erwachsenenalter, die als Autoimmunerkrankung angesehen wird.

1.3.1 Pathogenese der Multiplen Sklerose

Histologisch findet man als charakteristisches neuropathologisches Kennzeichen in Biopsien und Autopsien disseminiert auftretende Entzündungsherde mit überwiegend T-Zellen, B-Zellen und Makrophagen um mittelgroße Gefäße. Bestimmte Regionen des ZNS sind bevorzugt betroffen: Der Sehnerv, die periventriculäre weiße Substanz, das Kleinhirn, der Hirnstamm und die weiße Substanz des Rückenmarkes. Die Erstbeschreibung der pathologischen Läsionen im zentralen Nervensystem [Carswell R., 1838; Cruveilhier J., 1842] war dreißig Jahre vor der ersten umfassenden histologischen und klinischen Beschreibung durch Charcot 1868. Er nannte die Erkrankung *sclérose en plaque* [Charcot JM: 1868].

Man geht davon aus, dass die disseminierten Demyelinisierungs- und Entzündungsherde in genetisch suszeptiblen Individuen aufgrund einer fehlgeleiteten Reaktion des Immunsystems durch autoreaktive, gegen ZNS-Antigene gerichtete T-Zellen vermittelt werden. Diese Annahme wird durch folgende Hinweise gestützt: (a) autoreaktive CD4+ T-Zellen gegen Myelin sind nur im Liquor von Multiple Sklerose Patienten zu finden [Zhang et al., 1994], (b) immunmodulatorische Therapien, die auf die T-Zellen wirken wie Interferon- β , Glatirameracetat und Natalizumab reduzieren die Krankheitsaktivität, (c) das Risiko Multiple Sklerose zu entwickeln steigt bei bestimmten MHC II- Allelen und (d) im Tiermodell lässt sich die Erkrankung durch syngene autoreaktive T-Zellen gegen Myelin übertragen. Dennoch fehlt der direkte Nachweis der autoimmunen Genese, da man bisher keinen Autoantikörper oder autoreaktive T-Zellen bei Patienten gefunden hat, die die Erkrankung dann im Tier auslösen können, wie z.B. bei Myasthenia gravis.

1.3.1.1 Der Schritt von Autoreaktiv zu Autoaggressiv

Die Präsenz von autoreaktiven T-Zellen ist ein häufiges Phänomen. Jedes Individuum hat autoreaktive Immunzellen, die jedoch normalerweise durch ein komplexes Netzwerk reguliert werden. Man geht davon aus, dass diese autoreaktiven Zellen nicht aktiviert werden, solange nicht eine Schwelle an Antigenmenge überschritten, kostimulatorischen Moleküle fehlen oder sie durch regulatorischen Zellen und Moleküle gehemmt werden [Kamradt and Mitchison, 2001]. Die Präsentation von ZNS Autoantigenen im Immunsystem selbst, z.B. im Thymus, soll hierbei die Bildung von autoreaktiven Zellen beeinflussen [Anderson et al., 2000; Pribyl et al., 1993].

1.3.1.2 Die Einwanderung von T-Zellen in das Gewebe des zentralen Nervensystems

Vor einem Krankheitsschub erfolgt nach heutiger Erkenntnis eine Aktivierung und Expansion außerhalb des ZNS. Das Genexpressionsmuster der aktivierten autoreaktiven T-Zellen ändert sich im peripheren Immunsystem [Butcher and Picker, 1996], so dass es ihnen möglich ist, die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden und perivaskulär in Kontakt mit den lokalen Antigen präsentierenden Zellen zu treten [Wekerle et al., 1986; Greter et al., 2005].

Hier können autoreaktive T-Zellen ihren spezifischen Zielstrukturen begegnen - meist Antigenen aus der Myelinscheide - werden reaktiviert und initiieren eine gegen das Myelin gerichtete Immunreaktion, die mit der Rekrutierung weiterer Immunzellen einhergeht. Eine wichtige Rolle spielen dabei aktivierte Plasmazellen, die myelinreaktive Antikörper sezernieren und damit die immunologische Attacke unterstützen [Hemmer et al., 2002], sowie aktivierte, aus dem peripheren Blut stammende Makrophagen und Mikrogliazellen aus dem ZNS. Als Folge kommt es zur inflammatorischen Demyelinisierung.

1.3.1.3 Degenerative Prozesse

Entzündliche Prozesse scheinen aber nicht alleine eine Rolle bei der Pathogenese zu spielen. Neben dem Verlust von Myelin und Oligodendrozyten kommt es zu einem neuronalen und axonalen Schaden, der auch eine degenerative Komponente hat [Zipp and Aktas, 2006]. Abgesehen von der Schädigung der Axone in der weißen Substanz [Trapp et al., 1998] konnte auch der apoptotische Untergang

von Neuronen im Cortex gezeigt werden [Peterson et al., 2001]. Hinweis auf eine direkte, primäre neuronale Störung ist die bei MS Patienten bereits in der Anfangsphase der Erkrankung auftretende Reduktion des neuronalen Markers N-Azetyl-Aspartat in der so genannten *normal appearing gray matter* (von klassischen MS-Läsionen verschonte Bereiche) in der Magnetresonanz Spektroskopie [Inglese et al., 2004].

1.3.2 Klinische Zeichen der Multiple Sklerose

Aufgrund der disseminierten Läsionen können die klinischen Zeichen der Multiplen Sklerose sehr vielschichtig sein von fokal neurologischen Ausfällen bis zu kognitiven Dysfunktionen. Die ersten Symptome treten meist zwischen dem 15. und 40. Lebensjahr auf [McFarlin and McFarland, 1982a; McFarlin and McFarland, 1982b]. Der Krankheitsverlauf ist auch vielfältig im Hinblick auf die Häufigkeit des Auftretens der Symptome. Gemeinsam ist den meisten Verläufen jedoch, dass sich die subakut aufgetretenen Symptome zu Beginn wieder zurück bilden. Man spricht dann von einem schubförmig remittierenden Verlauf, der dann meist über die Zeit in einen sekundär chronisch progredienten Verlauf übergeht. Fraglich ist, ob eine Untergruppe der Erkrankung, die von Beginn an auch ohne Schübe verlaufen kann, eine andere Pathogenese hat, oder ob die Verlaufsformen zu ein und derselben Krankheit gehören. Zurzeit spricht man jedoch von einer primär chronisch progredienten Verlaufsform der Multiplen Sklerose, wenn die neurologischen Defizite immer mehr zunehmen.

1.3.3 Aktuelle Therapiemöglichkeiten

Die Therapie der Multiplen Sklerose richtet sich zurzeit vor allem nach der Verlaufsform. Die unterschiedlichen Therapiemöglichkeiten haben als Gemeinsamkeit, dass sie alle die inflammatorische Phase der Multiplen Sklerose beeinflussen. Die Schubhäufigkeit wird reduziert, aber die Progression der Behinderung kaum therapeutisch beeinflusst.

Die so genannten Immunmodulatoren sind Interferon- β und Glatiramerazetat (GA). Die Wirkung von Interferon- β (Betaferon®, Rebif®, Avonex®) wird auf die Hemmung der Proliferation der Leukozyten, Hemmung der MHC II Antigenpräsentation und die Reduzierung von Th1 Zytokinproduktion zurückgeführt. Desweiteren wird die T-Zellwanderung durch die Blut-Hirn-Schranke gehemmt durch Reduktion der Sekretion von Metalloproteinase-9 und die Reduktion der Expression von VLA-4 auf T-Zellen [Hartung et al., 2004].

Über die Wirkung von Glatiramerazetat (Copaxone®) ist noch wenig bekannt. Es konnte gezeigt werden, dass GA reaktive Zellen einen Th2 Phänotyp annehmen und durch die Ähnlichkeit zu MBP es MHC II gebunden die Bindung von MBP spezifischen T-Zellen stört.

Bei aggressiver schubförmiger Verlaufsform werden Mitoxantron (Ralenova®) und Natalizumab (Ty-sabri®) zur Eskalationstherapie eingesetzt. Diese Therapien haben einerseits eine stärkere Wirkung auf die Schubhäufigkeit, jedoch andererseits im Vergleich zu den Interferonen und Glatiramerazetat ein erheblich schwereres Nebenwirkungsprofil. Mitoxantron wirkt immunsuppressiv über eine DNA-Interkalierung wodurch es die Proliferation von B-Zellen, T-Zellen und Makrophagen hemmt, und aber ebenfalls das Risiko für sekundäre Leukämien erhöht. Darüber hinaus ist es auch kardiotoxisch [Fox,

2004]. Natalizumab ist der erste monoklonale Antikörper der zur Therapie der schubförmigen Multiplen Sklerose zugelassen ist und wirkt über eine Hemmung von VLA-4 und reduziert so die Migration der T-Zellen durch die Blut-Hirn-Schranke. Bei einer latenten JC-Virus Infektion kann es nicht nur bei immunsuppressiv vorbehandelten Patienten zu einer progressiven multifokalen Leukenzephalopathie kommen.

In Entwicklung sind zahlreiche andere Therapien wie Alemtuzumab (Campath-1), Fingolimod (FTY-720), Cladribin und autologe Stammzelltransplantation, die jedoch alle ein potenziell höheres Risiko als Interferon- β und Glatiramerazetat aufweisen.

1.4 Ziel der Arbeit

Im Gegensatz zur der verbesserten Beurteilung der Multiplen Sklerose durch MRT-Bildgebung und Liquordiagnostik ist das Verständnis des grundlegenden Charakters der Erkrankung sehr begrenzt. So ist eine wirkliche Kontrolle der Erkrankung und die Reparatur des durch sie entstanden Schadens zurzeit noch nicht möglich. Zentraler Angriffspunkt aller zurzeit zur Verfügung stehenden Therapien ist die Reduktion von Immunzellen, vor allem autoaggressiver T-Zellen im ZNS. Es scheint ein vielversprechender Ansatz zu sein, in die Mobilität der T-Zellen einzugreifen, um so die Zellen von ihren Zielzellen fernzuhalten und dadurch ihre Funktion zu blockieren.

Ziel der Arbeit war zur Entwicklung neuer Therapiemöglichkeiten beizutragen durch die Gewinnung von Informationen, wie sich T-Zellen im Gehirn orientieren. Daher wurden die Mechanismen des Verhaltens unterschiedlicher T-Zellsubtypen im zentralen Nervensystem untersucht.

Über das Schicksal der Immunzellen nach Infiltration des ZNS ist noch vieles unklar. Welche Faktoren und Mechanismen beeinflussen das Verhalten der unterschiedlichen T-Zellsubtypen im gesunden wie im kranken ZNS? Wie wird Immunität und Toleranz im zentralen Nervensystem aufrecht erhalten? Und welche Faktoren führen zu autoimmunen Prozessen, wie zum Beispiel bei der Multiplen Sklerose?

2 Material und Methoden

2.1 Laborartikel

2.1.1 Puffer, Lösungen, Zellkultur- und Hirnschnittkulturmedien

Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS)		Gibco In vitrogen, Karlsruhe
FACS Puffer	PBS 0,5% bovines Serumalbumin 0,5% Natriumazid (NaN ₃)	Serva, Heidelberg Merck, Darmstadt
Saponin Puffer	PBS 0,5% BSA 0,5% Saponin	Roth, Karlsruhe
MACS Puffer	PBS 0,5% BSA	
Zellkulturmedium (CM) für murine Zellen	EDTA (Ethylendianetetraacetic Acid) RPMI 1640 1% Hepes 1M 10% Fetales Kälberserum (FCS) hitze- inaktiviert für 30 Minuten bei 56°C 100U/ml Penicillin 100µg/ml Streptomycin 2mM L-Glutamin	Sigma-Aldrich, Steinheim Gibco In vitrogen, Karlsruhe Gibco In vitrogen, Karlsruhe Biochrom, Berlin Gibco In vitrogen, Karlsruhe Gibco In vitrogen, Karlsruhe Gibco In vitrogen, Karlsruhe
Waschmedium	RPMI 1640 1% Hepes 1M 100U/ml Penicillin 100µg/ml Streptomycin	
Iscove's Mod Dulbecco's Medium (IMDM)	2 mM L-Glutamin 25 mM Hepes	
Hirnschnittpräparations- und Perfusions- medium (ACSF)	124 mM NaCl, 1,25 mM NaH ₂ PO ₄ *H ₂ O 10 mM Glucose*H ₂ O 1,8 mM MgSO ₄ 1,6 mM CaCl ₂ *2H ₂ O 1,6 mM KCl 3,0 mM NaHCO ₃	Roth, Karlsruhe Roth, Karlsruhe Merck, Darmstadt Merck, Darmstadt Sigma-Aldrich, Steinheim Merck, Darmstadt Merck, Darmstadt
Lysis-Puffer	PBS 1% KHCO ₃ 8,29%NH ₄ Cl 37,2%Na ₂ EDTA	Merck, Darmstadt Roth, Karlsruhe

2.1.2 Interleukine

Name	Konzentration	Herkunft
IL-2 human, rekombinant	100 U/l	Chiron Therapeutics, Hayward, USA

Material und Methoden

IL-4	murin, rekombinant	200 U/l	R & D Systems, Wiesbaden
IL-12	murin, rekombinant	2,5 ng/ml	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 HSLGKWLGHDPDKF	Pepceuticals, Leicester, UK

2.1.4 Fluorochrome für die Zwei Photonen Mikroskopie

5-(und-6)-(((4-chloromethyl)benzoyl)amino)tetramethylrhodamin CMTMR Molecular Probes In vitrogen, Eugene, USA

Fluoreszeinisothiocyanat (FITC)-Dextran Molecular Probes In vitrogen, Eugene, USA

2.1.5 Antikörper und Sekundärfarbstoffe

Tab. 1: neutralisierende murine Zellkultur Antikörper und Blockierende Substanzen

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	5µg/ml	BD Bioscience, Heidelberg
α-α4-Integrin	R1-2	20 µg/ml	BD Bioscience, Heidelberg
AMD3100	/	10µg/ml	BD Bioscience, Heidelberg

Tab. 2: Murine Oberflächenantikörper

Name	Klon	Konzentration	Herkunft
α-m-CD4-Biotin	GK1.5	5 µg/ml	BD Bioscience, Heidelberg
α-m-CD4-FITC	GK1.5	5 µg/ml	BD Bioscience, Heidelberg
α-m-CD8 FITC	53-6.7	5 µg/ml	BD Bioscience, Heidelberg
α-m-CD25 APC	PC61	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/ α-CD45 5B1		Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
α-IL10 gekoppelt an α-m-CD45	α-IL10 JES5-16E3/ α-CD45 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

Material und Methoden

CD8 Isolierungssatz	Miltenyi Biotech , Bergisch Gladbach
α -PE MB	Miltenyi Biotech , Bergisch Gladbach

Tab. 4: Murine intrazelluläre Antikörper

Name	Klon	Konzentration	Herkunft
α -m-IL4-APC	11B11	2 μ g/ml	BD Bioscience, Heidelberg
α -m-IL4-PE	11B11	2 μ g/ml	BD Bioscience, Heidelberg
α -m-IL10-PE	JES5-16E3	2 μ g/ml	BD Bioscience, Heidelberg
α -m-IL10-APC	JES5-16E3	2 μ g/ml	BD Bioscience, Heidelberg
α -m-IL17-PE	TC11-18H10.1	1 μ g/ml	BD Bioscience, Heidelberg
α -m-INF γ -FITC	XMG1.2	5 μ g/ml	eBioscience, San Diego, USA
α -m-INF γ -PE	XMG1.2	2 μ g/ml	Miltenyi Biotech , Bergisch Gladbach
α -m-Perforin APC	eBioMAK-D	2 μ g/ml	eBioscience, San Diego, USA
α -m-TNF α -APC	MP6-XT22	2 μ g/ml	BD Bioscience, Heidelberg

Tab. 5: Sekundäntikörper, Isotypenkontrollen und Sonstige

Name	Klon	Konzentration	Herkunft
APC Isotyp IgG ₁		2,5 μ g/ml	BD Bioscience, Heidelberg
FITC Isotyp IgG ₂		5 μ g/ml	BD Bioscience, Heidelberg
PE Isotyp IgG ₁	R3-34		BD Bioscience, Heidelberg
PE Isotyp IgG _{2A} rat	R35-95		BD Bioscience, Heidelberg
Ratten IgG	/	20 μ g/ml	Sigma-Aldrich , Steinheim
SA-APC	/	1 μ g/ml	BD Bioscience, Heidelberg
SA-PerCP	/	1 μ g/ml	BD Bioscience, Heidelberg
α -m-Fc γ III/II Rezeptor (CD16/CD32)	2.4G2	5 μ g/ml	BD Bioscience, Heidelberg
7-AAD	/	0,25 μ g/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
DNase	Roche, Grenzach-Wyhlen
Ethanol	Merck, Darmstadt
Glucose 20%	Braun, Melsungen
Ionomycin	Sigma-Aldrich , Steinheim
Isofluran	Abbot, Wiesbaden
Ketamin	Curamed, Karlsruhe, Deutschland
Kollagenase	Roche, Grenzach-Wyhlen
NaCl 0,9%	Braun, Melsungen
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Percoll	Sigma-Aldrich, Steinheim
Pertussistoxin (PTX)	List Biological Laboratories, Campell, USA

Material und Methoden

Phorbol-Myristat-Acetat (PMA)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Saccharose	Merck, Darmstadt
Trypanblau (0,4%)	Biochrom, Berlin
Xylazinhydrochlorid 2%	Bayer, Leverkusen, Deutschland

2.1.7 Kunststoffartikel und sonstige Materialien

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

2.1.8 Verwendete Software

CellQuest	BD Bioscience, Heidelberg
Graphpad Prism 4	Graphpad Software Inc., USA
SPSS	SPSS, München
Volocity	Improvison, Tübingen

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 Biotec, 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
Vibratom "NVSLM1"	Shandon Pittsburgh, USA
Waage (für Chemikalien)	Mettler Gießen Deutschland
Wasserbad	Medingen, Wiesloch

2.2 Tiermodelle

Die Tiere wurden in speziellen Tierhaltungsräumen (klimatisiert, 12:12-Hell-Dunkel-Rhythmus) unter Standardbedingungen (individuell belüfteten Makrolonkäfige, pelletiertes Mausalleinfutter, Holzgranulat-Einstreu und täglich frisches Wasser) im Tierstall des Neurowissenschaftlichen Forschungszent-

rum an der Charité Berlin gehalten und dort von geprüften Versuchstierpflegern betreut. Die Versuche wurden alle im Rahmen der tierschutzrechtlichen Bestimmungen des Landes Berlin durchgeführt.

2.2.1 C57BL/6

Der Mausstamm C57BL/6 ist ein Standardtiermodell für immunologische Fragestellungen. Die Tiere wurden von Charles River Sulzfeld, Deutschland, bezogen. Durch subkutane Injektion von 150 µg Myeloligodendrozytenglycoprotein (MOG), emulsiert mit CFA und Mykobakterium sowie intraperitonealer Injektion von 200 ng Pertussistoxin zum Zeitpunkt der Immunisation und 48 Stunden später wurden enzephalitogene Zellen generiert, die zu einer Multiple Sklerose ähnlichen chronischen entzündlichen Erkrankung des ZNS der Mäuse führte.

2.2.2 SJL

Der Mausstamm SJL wurde von Charles River Sulzfeld, Deutschland bezogen. Die Entzündungsreaktion, die in diesem Mausstamm analog zum C57BL/6 Modell, jedoch durch Proteolipoprotein Peptid (PLP) anstatt MOG induziert wird, ist im Gegensatz zur chronischen Erkrankung bei C57BL/6 eher schubförmig [Gold et al., 2006] und fast ausschließlich CD4+ T-Zell vermittelt.

2.2.3 Ovalbumin als Modellantigen

Da sich MOG als Modellantigen für die funktionellen Analysen als nur bedingt geeignet erwiesen hatte, fiel die Wahl für die weitere Bearbeitung des Projektes auf den Einsatz von Ovalbumin als Modellsystem, welches als Schwerpunkt der Arbeit eingesetzt wurde. Ovalbumin ist ein 42 kDa großes Protein aus Hühnereiweiß und gehört zu der Gruppe der Serpine (Serinproteaseinhibitoren) [Nisbet et al., 1981].

2.2.3.1 OT1

In der Sequenz von Ovalbumin gibt es von Position Aminosäure (AS) 257 bis 264 ein 8 AS langes immundominantes MHC-I-Epitop, welches H-2K_b restringiert ist; seine Sequenz lautet SIINFEKL [Rotzschke et al., 1991]. Die Identifizierung eines solchen Epitops macht Ovalbumin zu einem geeigneten Modellantigen für die Induktion einer CD8+ T-Zellantwort. Die so genannte OT-1 Maus stellt ein transgenes Mausmodell für den passenden spezifischen T-Zell-Rezeptor dar, welcher den SIINFEKL-H-2K_b-Komplex erkennt. Der T-Zellrezeptor besitzt die V α 2 und V β 5 variablen Regionen. Die Mäuse stellen eine große Anzahl an spezifischen CD8+ T-Zellen bereit [Hogquist et al., 1994].

2.2.3.2 OT2

Für die Untersuchung einer CD4+ T-Zellantwort wird Ovalbumin ebenfalls häufig eingesetzt. Von Position Aminosäure 323 bis 339 (ISQAVHAAHAEINEAGR) wurde in der Ovalbumin-Sequenz ein CD4+ T-Zell-Epitop identifiziert, welches I-Ad restringiert ist [Sette et al., 1987]. Analog zur OT-1 Maus wurde das Mausmodell der OT-2 Maus generiert, die transgen für den passenden spezifischen T-Zellrezeptor ist und den OVA₃₂₃₋₃₃₉-MHC-II-Komplex erkennt [Barnden et al., 1998].

2.3 T-Zell-Hirnschnitt Kokultur

2.3.1 Prinzip

Um die Bewegungsweise von Immunzellen im ZNS zu untersuchen wurde eine T-Zell-Hirnschnitt Kokultur verwendet [Nitsch et al., 2004]. In diesem System wurden *in vitro* generierte OVA-spezifische und myelinspezifische CD4+ T-Zell Subpopulationen sowie CD8+ T-Zellen mit zerebralem Mausgewebe in künstlichem Liquor (ACSF) kokubiert. Diese ZNS Schnitte entwickeln eine mittlere Schicht von intaktem ZNS Gewebe, das dem *in vivo* ähnelt [Nitsch et al., 2000].

2.3.2 Hippokampus Schnitte

Zehn bis zwölf Tage alten Mäusen wurde, nachdem sie durch die Inhalation von Isofluran narkotisiert wurden, auf einer gekühlten Metallplatte der Thorax eröffnet. Dann wurde in den linken Ventrikel intrakardial 300 µl FITC-Dextran (8µg/300ml NaCl) injiziert. Anschließend wurde die Maus dekapitiert, der Schädel eröffnet und das Gehirn entnommen und mit Hilfe eines Vibratoms 400µm dicke transversale hippokampale Schnitte angefertigt. Aus diesen wird mit einem Skalpell die Region des Hippokampus herausgeschnitten und auf eine Membran in die abgedunkelte Inkubationskammer übertragen in welcher die Schnitte mindestens 60 Minuten bei Raumtemperatur verblieben. Das Gehirn muss umgehend nach der Extraktion immer von einer mit 95% O₂ und 5% CO₂ begasten Flüssigkeit umgeben sein, die Elektrolyte und Glukose enthält und als *artificial cerebrospinal fluid* (ACSF) bezeichnet wird. Während der Herstellung der Schnitte wurde das Gehirn in einer Umgebungstemperatur ca. 4°C gehalten.

2.3.3 Zellbiologische Methoden

2.3.3.1 Allgemein

Alle Materialien, die in Kontakt mit Zellen kamen, wurden sterilisiert. Die bei der Sektion der Tiere verwendeten Instrumente wurden mit 70% Ethanol desinfiziert. Beim Umgang mit den Zellen wurde unter der Sterilbank gearbeitet, die regelmäßig mit Ethanol desinfiziert und UV- Licht bestrahlt wurde. Die Zellen wurden bei einer Temperatur von 37°C, einer Luftfeuchte von 95% und einer CO₂ Konzentration von 5% inkubiert.

2.3.3.2 Zellgewinnung

2.3.3.2.1 Milz

Die Mäuse wurden durch zervikale Dislokation getötet und mit 70% Ethanol desinfiziert. Im Anschluss wurde mit eines medianen Längsschnittes am Bauch das Peritoneum freigelegt, welches durch einen Schnitt entlang des linken Rippenbogens eröffnet wurde. Die Milz wurde mit einer desinfizierten Pinzette gelöst und in Waschmedium aufgenommen. Alle folgenden Schritte wurden unter der Sterilbank und auf Eis bzw. bei 4°C ausgeführt.

Die Milz wurde in einem Nylonsieb mit Hilfe eines Spritzenstempels zerkleinert. Die daraus entstandene Zellsuspension wurde mit 50 ml Waschmedium gewaschen. Alle Waschschr

durchgeführt: Die Zellen wurden in 50 ml Volumen in einem 50 ml Reaktionsgefäß aufgenommen und mit 500 x g für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das entstandene Pellet resuspendiert.

Die in der Milz vorhandenen Erythrozyten wurden mit Hilfe eines hypoosmolaren Puffers lysiert. Da sie eine geringere osmolare Stabilität als die Leukozyten aufweisen, werden diese nicht zerstört. Für die Erythrozytolysen wurde das Pellet in 10 ml Lysispuffer resuspendiert und 5 ml Waschmedium hinzugegeben, sofort abzentrifugiert und der Überstand verworfen und erneut gewaschen. Danach wurden die Zellen in 10 ml Waschmedium aufgenommen und gezählt, dazu wurde im Verhältnis 1:1 10 µl der Zellsuspension mit Trypanblau gemischt und auf eine Neubauerzählkammer aufgetragen. Unter dem Lichtmikroskop wurden dann die vitalen Zellen in 16 Feldern eines Quadrats ausgezählt (N), die vitalen Zellen zeichneten sich dadurch aus, dass sie kein Trypanblau aufgenommen hatten. Die Gesamtzahl der Zellen ergibt sich wie folgt: Gesamtzahl = N x 2 (Verdünnungsfaktor) x 10 (Volumen) x 10⁴ Nach einem letzten Waschschrift wurden die Zellen in Kulturmedium in einer Konzentration 2,5 - 3 x 10⁶ Zellen pro ml aufgenommen.

2.3.3.2.2 Lymphknoten

Die Lymphknoten wurden an der Mesenterialwurzel bzw. im Bereich der Inguinalregion dargestellt und entfernt. Alle folgenden Schritte waren identisch zur Aufarbeitung der Milzzellen, nur dass keine Erythrozytolysen notwendig war.

2.3.3.2.3 Gehirn und Rückenmark

Zur Gewinnung der Lymphozyten aus dem zentralen Nervensystem musste zunächst das gesamte Blut aus dem Gefäßsystem entfernt werden. Hierzu wurden den Tieren entsprechend ihres Gewichtes eine tödliche Menge einer Narkoselösung aus 0,25 ml Xylazinhydrochlorid 2%, 5 ml Ketamin und 19,75 ml PBS intraperitoneal injiziert. Nach Erlöschen des "Hinterpfoten Reflexes" in tiefer Analgesie wurde die Maus nach Besprühen mit 70% Ethanol mit einer desinfizierten Schere entlang der medianen Bauchlinie eröffnet. Die Rippen wurden seitlich eingeschnitten um durch Hochklappen des Brustkorbes einen freien Zugang zu Herzen zu erreichen. In den linken Ventrikel wurde eine Kanüle injiziert und durch einen kleinen Schnitt der rechte Vorhof eröffnet. 20 ml PBS wurden langsam über den linken Ventrikel appliziert. Der Erfolg der Perfusion war durch Entfärbung der Leber festzustellen.

Anschließend wurden der Schädel und die Wirbelsäule vom umliegenden Gewebe befreit und mit Hilfe einer Schere geöffnet. Das Gehirn wurde mit Hilfe eines Spatel entnommen, das Rückenmark mit einer Pinzette gelöst und entnommen. In einer Petrischale wurde das Gewebe mit einem Skalpell zerkleinert und in 10ml IMDM Medium, das bereits DNase und Kollagenase enthielt, mit einer 10 ml Pipette in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt. Dieses Gemisch wurde 25-30 Minuten in einem 37°C warmen Wasserbad inkubiert und alle 5 Minuten sanft geschüttelt. Anschließend wurde die Suspension durch ein Nylonsieb gegeben und mit 50 ml IMDM Medium gewaschen. Danach wurde das Pellet in 6ml IMDM Medium resuspendiert und über 6 ml Percoll vorsichtig geschichtet. Die Lymphozyten finden sich aufgrund ihrer Größe im Dichtegradienten in der Interphase wieder, dazu wurde bei Raum-

temperatur für 30 Minuten bei 700 g ohne Bremse zentrifugiert. Nach der Abnahme der Interphase wurden die Zellen einmal mit WM gewaschen und dann in Kulturmedium aufgenommen.

2.3.3.3 Zellkultur

2.3.3.3.1 MOG-Zelllinien

Durch einen begrenzten Verdünnungsansatz, genannt „limiting dilution“ [Cohen et al., 1987], wurde versucht, MOG spezifische Zellklone zu isolieren. Von mit MOG₃₅₋₅₄ immunisierten C57BL/6 Mäusen wurden zwischen Tag 40 und 50 die Milzzellen isoliert. Von diesen wurden die CD8+ Zellen mit magnetischer Zellsortierung (MACS) depletiert und mit 50 µg/ml MOG₃₅₋₅₄ sowie 2,5 ng/ml Interleukin-12 restimuliert, um CD4+ Th1-Zellkulturen zu erhalten. Nach acht Tagen wurden die toten Zellen mit Ficollgradient entfernt und neu in Kultur genommen. Diesmal wurden die Zellen so verdünnt, dass nach Aussaat auf eine 96 Lochplatte im Durchschnitt 100 Zellen pro Loch vorhanden waren. Als Antigen präsentierende Zellen (APC) wurden mit 30 Gy bestrahlte, CD90 (MACS) depletierte, syngene, naive Milzzellen verwendet. Über weitere 14 Tage wurden die Zellen mit 50 µg/ml Peptid inkubiert. Das Medium wurde regelmäßig gewechselt und alle zwei Tage 100 U/l Interleukin-2 hinzugefügt. Proliferierende Kulturen wurden mit Hilfe eines Lichtmikroskops identifiziert und weiter expandiert durch wöchentliche Restimulation mit syngenen APC und entsprechendem Antigen unter regulären Kulturbedingungen.

2.3.3.3.2 Generierung von OVA spezifischen T Zellsubtypen

Die Zellen von OT1 Mäusen wurden mit 25 nM OVA₂₅₇₋₂₆₄, die Zellen von OT2 mit 0,3 µM OVA₃₂₃₋₃₃₉ inkubiert. Die Differenzierung von OT2 Zellen in Richtung eines Th1 Phenotypes wurde mit Zugabe von 2,5 ng/ml Interleukin-12 und 5 µg/ml α-Interleukin-4 eingeleitet, eines Th2 Phenotypes durch Zugabe von 200U/l Interleukin-4, 5 µg/ml α-Interleukin-12 und α-Interferon-γ. Alle Zellen wurden in Kulturmedium (CM) mit Interleukin-2 gehalten. Zur Restimulation wurden mit 30 Gy bestrahlte, CD90 (MACS) depletierte, syngene, naive Milzzellen in einem Verhältnis T-Zellen zu APC 1:3 und entsprechendes Antigen verwendet. Die jeweilige Zytokinproduktion wurde an Tag vier bis sieben durchflusszytometrisch nach PMA/Ionomycin Stimulation kontrolliert.

Wenn nicht anders erwähnt, wurden die Zellen nach drei bis sieben Tagen für die Kokultur Experimente verwendet.

2.3.3.4 *Blockierung oder Stimulation von Signalwegen*

Bei einigen Versuchen war es notwendig die Zellen vor der Verwendung noch weiter zu behandeln. Sie wurden entweder jeweils vier Stunden mit 50 ng/ml PMA und 500 ng/ml Ionomycin beziehungsweise 10 µg/ml SEB stimuliert oder es wurde 24 Stunden vor Verwendung der Zellen 20 µg/ml anti-α4-Integrin hinzugefügt. Für die Blockierung von CXCR4 wurden die Zellen drei Stunden lang mit 10µg/ml AMD 3100 inkubiert.

2.3.4 Magnetische Zellsortierung

2.3.4.1 Prinzip

Zur Isolierung bestimmter Lymphozytenpopulationen wurde das MACS- Zellsortierungssystem (*High-Gradient Magnetic Cell Sorting*) von Miltenyi verwendet [Miltenyi et al., 1990]. Wie bei der Durchflusszytometrie beruht dieses System auf der spezifischen Bindung von Antikörpern, diese sind im Unterschied zur Durchflusszytometrie nicht fluoreszenzmarkiert, sondern mit kleinen magnetischen Partikeln (MB) beladen. Die Zellen, die Antikörper gebunden haben, werden bei Überführung in eine magnetische Säule zurückgehalten, während unmarkierte Zellen die Säule ungehindert passieren. Wird die Säule entmagnetisiert, kann die Fraktion der Zellen, die Antikörper gebunden hat, eluiert werden.

2.3.4.2 CD4+ und CD8+ Sortierung

Vor den jeweiligen Experimenten wurden die Zelllinien mit α -m-CD4 MB bzw. α -m-CD8 MB inkubiert, um eine Reinheit von mehr als 95% sicherzustellen. Die Reinheit wurde mit Durchflusszytometrie bestimmt.

2.3.4.3 Zytokinsekretionsassay

Nach dem oben erläuterten Prinzip lassen sich jedoch Zellen nur aufgrund ihrer Oberflächenmoleküle sortieren. Bei einigen Fragestellungen im Rahmen dieser Arbeit war es jedoch notwendig, Zellen aufgrund der von ihnen sezernierten Zytokine zu sortieren, wozu der Zytokinsekretionsassay von Miltenyi verwendet wurde [Manz et al., 1995; Brosterhus et al., 1999]. Anders als oben beschrieben wurden die Zellen erst sechs Stunden mit Antigen stimuliert und dann mit einem bivalenten Antikörper, der einerseits über CD45 auf allen Leukozyten bindet und andererseits eine Bindungsstelle für das entsprechende Zytokin aufweist, bei Kulturbedingungen 45 Minuten inkubiert, so dass die Zellen ihre Zytokine weiter sezernierten. So waren die Zytokine nach Bindung an den an der Oberfläche der Zelle gebundenen Antikörper außen an der Zelle für einen zweiten Antikörper zugänglich. Dieser war fluoreszent markiert, um den Anteil der Zytokin produzierenden Zellen anschließend durchflusszytometrisch zu bestimmen. Dann folgte ein dritter Antikörper, der gegen das Fluorochrom gerichtet war, und mit magnetischen Partikeln beladen war.

2.3.5 Färbung

Für die anschließende Messung mit dem Zwei Photonen Mikroskop mussten alle Zellen gefärbt werden. Dabei sollte die Oberflächenstruktur der Zelle möglichst nicht verändert werden und die Zelle sollte in ihrer Vitalität wenig einschränken. CMTMR ist ein fluoreszierendes Chloromethylderivat, welches frei durch die Zellmembran lebender Zellen diffundiert. Innerhalb der Zelle wird daraus unter anderem durch eine Glutathion S-Transferase vermittelte Reaktion ein nicht mehr membrangängiger Farbstoff. Die Zellen sind in ihrer Funktion und Vitalität nicht beeinträchtigt [Ruiz et al., 1996].

Die Zellen wurden in RPMI mit 2,5 μM CMTMR unter Kulturbedingungen 30 Minuten gefärbt und dann zweimal mit Waschmedium gewaschen. Bis zur Messung wurden die Zellen dann in Zellkulturmedium unter Kulturbedingungen gehalten.

2.3.6 Durchflusszytometrie

2.3.6.1 Prinzip

Die Durchflusszytometrie wurde dazu verwendet, die Expression von Oberflächenmolekülen, intrazellulären Zytokinen und Zytokinsekretion von Zellpopulationen zu bestimmen. Zum einen schließt man anhand der Streuung eines Laserstrahls an den Strukturen der Zellen auf deren Größe und Granularität, zum anderen kann durch die Nutzung des Prinzips der Fluoreszenz auf die Expression bestimmter Moleküle von der Zelle zurück geschlossen werden. Die darzustellenden Moleküle werden durch spezifische Antikörper, an die direkt oder indirekt über einen zweiten Antikörper ein Fluorochrom gekoppelt ist, markiert. Die Intensität des emittierenden Lichtes ist proportional zur Menge der angeregten Fluorochrommoleküle und damit proportional zur Expression der durch die Fluorochrome markierten zellulären Moleküle. Die Emissionsbereiche der verwendeten Fluorochrome überlappen sich nur gering, so dass Mehrfachfärbungen möglich sind und die Expression verschiedener zellulärer Moleküle in Beziehung gesetzt werden kann.

Zur Messung der Streuung und Fluoreszenz wurde ein FACSCalibur Gerät verwendet. Die Zellen werden einzeln in einem Flüssigkeitsstrom an zwei Lasern vorbeigeleitet und das gestreute und emittierte Licht wird durch Photodetektoren in elektrische Signale verwandelt, welche dann mit Hilfe eines Computers graphisch und statistisch ausgewertet werden können.

2.3.6.2 Oberflächenfärbung

Etwa 10^6 Zellen wurden in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und in FACS-Puffer gewaschen. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 50 μl FACS Puffer resuspendiert und mit 20 $\mu\text{g/ml}$ Ratten IgG und 0,75 $\mu\text{g/ml}$ $\alpha\text{-m-Fc-Fragment}$ für 10 Minuten bei 4°C inkubiert um unspezifische Antikörper Bindungsstellen zu blockieren.

Nach einem erneuten Waschschrift mit FACS-Puffer wurden die Primärantikörper dazu gegeben und für 10 Minuten in den angegebenen Konzentrationen mit den Zellen in einem Volumen von 100 μl inkubiert. Nach einem Waschschrift folgte die eventuelle Färbung mit einem Sekundärantikörper. Vor der Messung müssen die Zellen noch einmal mit 1ml FACS-Puffer gewaschen werden um dann in ca. 300 μl Puffer aufgenommen zu werden.

2.3.6.3 Intrazelluläre Färbung

Um die Expression von Zytokinen zu induzieren, wurden ca. 10^6 T-Zellen einer Kultur vier Stunden mit PMA und Ionomycin stimuliert. Nach zwei Stunden wurde 5 $\mu\text{g/ml}$ Brefeldin A hinzugefügt, um die Sekretion zu inhibieren und die intrazelluläre Konzentration zu maximieren. Die Zellen wurden für weitere zwei Stunden inkubiert. Brefeldin A blockiert den intrazellulären Transport vom Golgi-Apparat zur Zellmembran und führt so zu einer Anreicherung der sonst sezernierten Zytokine.

Um die intrazellulären Zytokine anzufärben müssen die Antikörper die Zellmembran durchdringen können. Deshalb ist eine Fixierung vor der intrazellulären Färbung notwendig um die Zellmembran zu permeabilisieren [Assenmacher et al., 1994]. Dazu wurden die Zellen nach der Oberflächenfärbung in PBS gewaschen und dann in 1 ml 2% PFA aufgenommen und für 20 Minuten bei 4°C inkubiert. Danach folgte ein erneuter Waschschrift mit PBS. Anschließend konnte die Zellmembran manipuliert werden ohne die Zellstruktur zu zerstören. Mit Hilfe eines 0,5 % Saponinpuffer wurde die Zellmembran perforiert und somit zugänglich für die färbenden Antikörper. Alle folgenden Färbe- und Waschschrift wurden in Saponinpuffer durchgeführt. Vor der eigentlichen Färbung waren ein Waschschrift und eine erneute Blockierung mit 20µg Ratten IgG und 0,75µg/ml A-m-Fc-Rezeptor notwendig, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Der folgende Färbeschrift war identisch zur Oberflächenfärbung. Die unspezifische Bindung bei intrazellulär färbenden Antikörpern wurde mit Hilfe von Isotypen Kontrollen berücksichtigt. Dazu wurde ein Antikörper der gleichen Klasse mit dem gleichen Fluorochromen verwendet, der spezifisch für ein nicht bei der Zelle vorkommendes Antigen war. Ebenso kann die Analyse von Zellen, die nicht mit PMA/Ionomycin stimuliert aber mit Brefeldin A behandelt wurden, zu diesem Zweck herangezogen werden.

2.3.6.4 Lebend -Tod Färbung

Mit der Lebend-Tod Färbung wurde der Anteil der während des Versuchsablaufes zu Grunde gegangenen Zellen mit der Substanz 7-Aminoactinomycin D nachgewiesen. 7-Aminoactinomycin D ist ein von sich aus fluoreszierender DNA Farbstoff, der mit der DNA der Zellen einen Komplex bildet und selektiv die Guanin-Cytosin Regionen der DNA bindet. 7-Aminoactinomycin D dringt sehr langsam in gesunde Zellen ein. Eine intakte Zellmembran verhindert die schnelle Diffusion des 7-Aminoactinomycin D. Sind die Zellen jedoch geschädigt oder getötet, so verliert die Zellmembran ihre Funktion als Schutzbarriere und das 7-Aminoactinomycin D diffundiert schnell in die Zelle hinein. Dort gelangt es schließlich in den Zellkern und an die DNA, mit welcher es interkaliert. Die Zelle wird somit als „tot“ markiert und kann vom Durchflusszytometer erfasst werden. Wie FITC und PE wird auch 7-Aminoactinomycin D vom Licht des Argon Lasers mit der Wellenlänge von 488nm angeregt. Das Emissionsspektrum von 7-Aminoactinomycin D liegt mit einem Wellenlängenmaximum über 610nm weiter im roten Bereich als FITC (530nm) und PE (570nm).

2.4 Zwei Photonen Mikroskopie

2.4.1 Grundlagen

In der vorliegenden Arbeit wurden die Zellen bei ihrer Wanderung durch das intakten Gehirngewebe beobachtet. Die herkömmliche Lichtmikroskopie stößt aufgrund starker Streuung und Brechung des Lichtes an den unterschiedlich dichten Strukturen im Inneren von Gewebe schnell an ihre Grenzen. Verbesserung brachte die konfokale Mikroskopie. Hier wird ein Laserstrahl auf nur einen Bildpunkt gerichtet. Nur das von dort zurückkommende Licht wird detektiert. Durch Verwendung einer Blende lässt sich fast alles Licht aus der Umgebung ablenken, so dass Streulicht vermindert wird. Man nutzt

wie bei der Durchflusszytometrie die spezifische Eigenschaft von Fluorochromen das Licht des Lasers aufzunehmen und nun selbst Licht abzustrahlen. Die Blende beschränkt jedoch die Lichtausbeute, da nur das Licht eines kleinen Teils aller angeregten Moleküle verwendet werden kann. Obwohl nur aus einer dünnen Schicht Information gewonnen wird, bleicht das ganze Präparat aus und wird photochemisch geschädigt. Für Beobachtungen in der Tiefe von intaktem vitalem Gewebe, wie bei den nachfolgenden Experimenten, ist daher eine schonendere Methode wie die Zwei Photonen Mikroskopie notwendig.

Die theoretischen Grundlagen der Anregung durch zwei Photonen wurden bereits in den 30iger Jahren unseres Jahrhunderts von Maria Göppert-Mayer beschrieben [Goepfert-Mayer, 1930]. Jedoch konnten erst in den 60iger Jahren Experimente folgen, die die mögliche Anregung durch zwei Photonen zeigten, da hierzu die Entwicklung des Lasers Voraussetzung war, um die hohen notwendigen Lichtintensitäten zu erzeugen [Kaiser and Garrett, 1961]. Bedeutung für die Biomedizin erlangte diese Technik wiederum erst ab 1990 seit der Entwicklung der Zwei Photonen Mikroskopie [Denk et al., 1990]. Sie wird in vielen Bereichen der Biologie und Medizin eingesetzt, zum Beispiel um intakte Gewebe wie Gehirn, Lymphknoten oder Tumore zu untersuchen [Helmchen and Denk, 2002; Zipfel et al., 2003].

Zwei Photonen Mikroskopie basiert auf der annähernd gleichzeitigen Absorption von zwei Photonen, die zu einer elektrischen Transition führen, für die normalerweise ein einzelnes Photon mit ungefähr der doppelten Energie nötig wäre (siehe Abb.1). Die Wahrscheinlichkeit für solch ein Ereignis ist bei normalen Bedingungen äußerst gering und steigt erst bei einer sehr hohen Photonendichte, d.h. Lichtintensität (im Allgemeinen $> 10^{17} \text{ W/m}^2$) in einem ausreichenden Maße. Normalerweise können solche Intensitäten nur im Fokus von Linsen mit hoher numerischer Apertur bei Verwendung einer „mode-locked“ Laserquelle mit Pulsung im Subpikosekundenbereich erreicht werden. Des Weiteren ist ein Laser erforderlich, der Photonen im Infrarotbereich aussendet, um die Photonen mit der niedrigen Wellenlänge zu erzeugen.

Zwei Photonen Absorption ist auf das Volumen im Fokus begrenzt, nur dort treffen gleichzeitig zwei Photonen auf einem Fluorophor. Dies ermöglicht im Gegensatz zur konfokalen Mikroskopie, die auf einer Einzel-Photonen Anregung basiert, den Verzicht auf räumliche Filter. Beides, die Detektion gestreuter Fluoreszenz und die Reduzierung des Streubereichs durch die Verwendung von Photonen im Infrarotbereich mit niedriger Energie ermöglicht eine hohe Auflösung von Bildern in der Tiefe von lebendem Gewebe ohne dieses zu zerstören (mehrere 100 μm tief). Zusätzlich wird durch die begrenzte Anregung in der Fokusebene nicht nur die Detektionseffizienz signifikant gesteigert, sondern es kommt auch zu keinem Ausbleichen der Fluorophore und Schädigung des Gewebes außerhalb der Fokusebene.

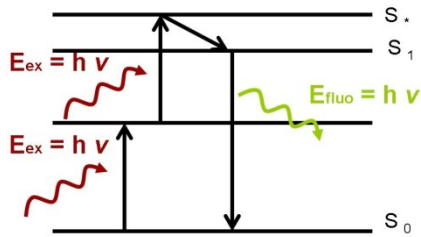


Abb. 2: Schema der Zwei Photonen Anregung. Ein Fluorophor im Ruhezustand S_0 wird auf ein instabiles Niveau S_2 über dem dann als S_1 bezeichneten Anregungsniveau versetzt durch quasi simultane Absorption von zwei Photonen mit niedriger Energie E_{ex} . Das Fluorophor kehrt durch die spontane Abgabe von einem energiereichen Photon (E_{fluo}) von S_1 in seinen Ausgangszustand S_0 zurück ($h\nu_{fluo} \leq 2h\nu_{ex}$)

2.4.2 Aufbau

Es wurde ein Zwei Photonensystem SP2 von Leica mit einem aufrechten Mikroskop, ausgestattet mit einem 20 x Wasserimmersionsobjektiv (NA 0,5 Leica) verwendet. Als Lichtquelle dient ein Titan-Saphirlaser. Dieser besteht aus einem Pumplaser: *solid-state cw laser*, 532 nm, 5 W (Millennia, Spectra Physics) und einem mode-locked Titan-Saphirlaser (Tsunami, Spectra Physics) durchschnittliche Leistung > 0,7 W bei 800 nm, Pulslänge < 100 fs, Nominale Wiederholungsrate 80 MHz, Messbereich 720 - 850 nm. Die Fluoreszenzfarbstoffe FITC-Dextran und CMTMR werden simultan bei 840 nm angeregt. Die Fluoreszenz wurde aufgenommen durch zwei externe nicht scannende Detektoren (NDD).

Des Weiteren ist eine Perfusionskammer von Bedeutung, die mit Hilfe einer Pumpe ständig mit frischem begastem künstlichem Liquor (ACSF) durchspült und auf 33°C temperiert wird.

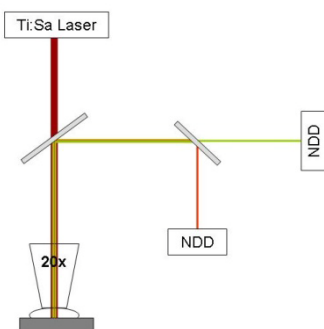


Abb. 3: schematische Darstellung des Aufbaus des Mikroskops

2.4.3 Messungen und Auswertungen der Kokulturrexperimente

Die mindestens 60 Minuten an Raumtemperatur adaptierten Schnitte wurden aus der Inkubationskammer in die auf 37 °C beheizte Luigs & Neumann Perfusionskammer unter das Objektiv transferiert. Dann wurden 250.000 Zellen in 5µl Medium aufgenommen auf den Schnitt pipettiert, anschließend wurde der Schnitt mit den Zellen durch ein selbstgebautes Nylonnetz am Boden der Kammer fixiert.

Die Perfusionskammer wurde kontinuierlich langsam mit vorgewärmtem, mit 95% O₂ und 5% CO₂ begastem ACSF durchspült. Nach 30 Minuten Adaptation wurde mit den Messungen begonnen. Über den Zeitraum mindestens eine Stunde wurde jede Minute wurde meist über 60 µm in einem Bereich von 50-200 µm Tiefe alle 1,8 µm ein Bild gemacht.

Die erstellten Bildersequenzen wurden mit Hilfe des Programms Volocity vierdimensional rekonstruiert, so dass man die Zellen über die Zeit (t) im dreidimensionalen (XYZ) Schnitt verfolgen und Bewegungsparameter wie z.B. durchschnittliche Geschwindigkeit bestimmen konnte. Nur Zellen die länger als 5 Minuten verfolgt werden konnten, wurden in die Auswertung eingeschlossen. Die herkömmlichen Parameter wie Abschweifungsindex und mittlere Entfernungsrate sind entwickelt worden, um das Bewegungsmuster von Lymphozyten, wie gerichtete und ungerichtete Bewegungsform oder Zellarrest im Lymphknoten zu beschreiben [Sumen et al., 2004]. Aufgrund des Hin und Her Wanderns der CD4+ T- Zellen entlang der Gefäße waren diese Parameter jedoch für die Beschreibung der T-Zellen im Gehirn unzureichend, es zeigt sich keine gezielte Bewegung in nur eine Richtung und die absolute Entfernungsrate war reduziert, wenn Zellen abrupt in die Richtung aus der sie kommen zurück wandern.

Mit Hilfe des Programms Volocity wurden Bewegungsvektoren, die eine Verbindungslinie von Start und Endpunkt der Bewegungspfade darstellen, konstruiert. So wurde die Fortbewegung von einzelnen Zellen demonstriert und als Vektordiagramm angezeigt. Hierbei sind die Vektoren in der gleichen Position wie im jeweiligen Hirnschnitt. Des Weiteren wurde die von A. Brandt in unserer Arbeitsgruppe entwickelte Methode der Winkelbestimmung angewendet [Siffrin et al., 2009]. Hierfür mussten die Zellbewegungsdaten aus Volocity noch weiter mit dem Programme Matlab® bearbeitet werden. Der Bewegungsvektor wurde auf die Gefäßachse gespiegelt und der kleinste Winkel zwischen dem Bewegungsvektor und dem Referenzvektor im Gefäß bestimmt, dies ergab einen nominalen Wert zwischen 0° und 90° für jeden Bewegungspfad. Nur Bewegungsvektoren, deren Endpunkte maximal 100 µm entfernt in der Projektionsfläche des Gefäßreferenzvektors lagen, wurde in die Auswertung eingeschlossen. Dieser Parameter ist unabhängig von polarisierter Gerichtetheit und absoluter Entfernung und macht die Auswertung tangentialer Zellbewegungen entlang einer Achse möglich.

3 Ergebnisse

Was geschieht jenseits der Blut-Hirn-Schranke zur Aufrechterhaltung der immunologischen Überwachung und bei entzündlichen ZNS Erkrankungen im ZNS?

CD4⁺ T-Zellen konnten bereits mit der Zwei Photonen Mikroskopie bei ihrer Wanderung durch das dichte Parenchym des Gehirns beobachtet werden [Nitsch et al., 2004; Kawakami et al., 2005]. Aber über das Verhalten von CD8⁺ T-Zellen im Gehirn ist noch wenig bekannt. Im Zuge der Diskussion um den unterschiedlichen Einfluss von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen bei der Multiplen Sklerose und der Experimentellen Autoimmunen Enzephalitis (EAE) [Wucherpfennig et al., 1992; Gold et al., 2006; Johnson et al., 2007; Weiss et al., 2007] war es das Ziel dieser Arbeit, CD4⁺ und CD8⁺ Zellpopulationen zu generieren, die enzephalitogen sind, d.h. *in vivo* eine EAE auslösen können, und *in vitro* in lebendes murines Hirngewebe einwandern, um deren Wanderungsverhalten im Gewebe zu analysieren. Im ersten Teil der Ergebnisse werden die mit unterschiedlichen Ansätzen gewonnenen Zellen näher charakterisiert und ihre Migrationsfähigkeit beschrieben. Im zweiten Abschnitt folgt die Analyse des Bewegungsmusters der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen.

Die Daten dieser Arbeit, zusammen mit den humanen Kokultorexperimenten und den intravitalem Daten von CXCR4^{-/-} Mausmodellen, können die histologischen Beobachtung, dass CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen unterschiedlich in entzündlichen ZNS-Läsionen wie bei der Multiplen Sklerose verteilt sind [Gay et al., 1997] begründen und zeigen den dynamischen Prozess, der zu dieser Verteilung führt.

3.1 Welche Zellen wandern in vitales murines Hirngewebe ein

3.1.1 Restimulation für 4 Tage mit MOG

Die aus mit MOG immunisierten Mäusen gewonnenen und dann *in vitro* für 4 Tage restimulierten T-Zellen sind fast alle bewegungslos und bleiben auf der Oberfläche des Schnittes haften, im Gegensatz zu Modellen in denen PLP oder Ovalbumin stimulierte Zellen verwendet werden. Dort wandern die CD4⁺ Th-1-ähnlichen T-Zelllinien, die Interferon- γ und TNF α aber fast kein Interleukin-4 produzieren, in gut analysierbaren Mengen ein, dabei müssen zwischen 50.000 und 500.000 Lymphozyten pro Schnitt hinzugegeben werden [Nitsch et al., 2004].

Nach vier Tagen Restimulation mit MOG zeigte sich kein Unterschied zwischen CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen hinsichtlich der Aktivierung und Vitalität. Von den kultivierten CD4⁺ waren $3,3\% \pm 0,3\%$ (N=19) (N=Anzahl der Experimente) und von den CD8⁺ T-Zellen nur $3,4\% \pm 0,3\%$ (N=17) der Zellen nicht 7-Aminoactinomycin (7AAD) gefärbt. Zellen, die sich mit 7-Aminoactinomycin anfärben lassen, haben eine geschädigte Zellmembran, da der Farbstoff leicht hindurch diffundieren kann und mit der DNA im Zellkern interkaliert. Dies spricht für spätapoptotische oder nekrotische Zellen. Von den 7-Aminoactinomycin negativen, d.h. vitalen Zellen, waren von den CD4⁺ T-Zellen $14,6\% \pm 0,8\%$ (N=5) und von den CD8⁺ T-Zellen $10,0\% \pm 3,0\%$ (N=3) CD25⁺. CD25 ist die so genannte Alpha-Kette des Interleukin-2 Rezeptors, der in voller Funktion zusätzlich noch aus einer Beta- und Gamma-Kette be-

steht [Robb et al., 1981]. Der Interleukin-2 Rezeptors auf der Oberfläche von T-Lymphozyten wird erst bei Aktivierung der T-Zellen synthetisiert und weist eine hohe Affinität für das von den T-Zellen selbst sezernierte Interleukin-2 auf, welches seine Wirkung para- oder autokrin vermittelt und für die Proliferation und Differenzierung der T-Zellen verantwortlich ist [Minami et al., 1993]. Die CD25-Expression kann somit als einer der Marker für den Aktivierungszustand der T-Lymphozyten angesehen werden und ist wichtig für die Initiation und Regulation von antigen oder mitogen abhängigen Immunantworten. Denn neben der klonalen Expansion und Effektorfunktionsförderung kann der Interleukin-2 Rezeptor auch im Gegensatz dazu zur Anergie und Apoptose führen [Nelson and Willerford, 1998] und ist unter anderem auch ein Marker für regulatorische T-Zellen, die dann jedoch im Gegensatz zu den Effektorzellen *in vitro* anerg sind [Shevach, 2002].

Die Schwierigkeiten, genügend vitale T-Zellen im Vergleich zu PLP spezifischen T-Zellen bei der SJL Maus zu generieren ist typisch für dieses Modell. MOG ist ein Autoantigen, das von wenigen T-Zellen erkannt wird, die Frequenz von autoreaktiven T-Zellen liegt bei 1/1.000.000. Bei Mäusen des Stammes SJL liegt die Vorläuferfrequenz von autoreaktiven T-Zellen gegen PLP jedoch generell höher, bei ungefähr 1/20.000 [Anderson et al., 2000]. Bei gleichen Immunisierungs- und Kulturbedingungen mit PLP ist nach vier Tagen bei SJL Mäusen dementsprechend die Anzahl an vitalen CD4+ T-Zellen wesentlich höher. In typischen Experimenten waren im Mittel 25,1% ± 4,1% (N=3) der CD4+ Zellen 7-Aminoactinomycin negativ und von diesen 32,2% ± 7,7% CD4+ und CD25+. Die seltenere Vorläuferfrequenz von MOG spezifischen Zellen könnte ein Grund für die geringe Anzahl an vitalen, aktivierten Zellen nach vier Tagen Kultur sein.

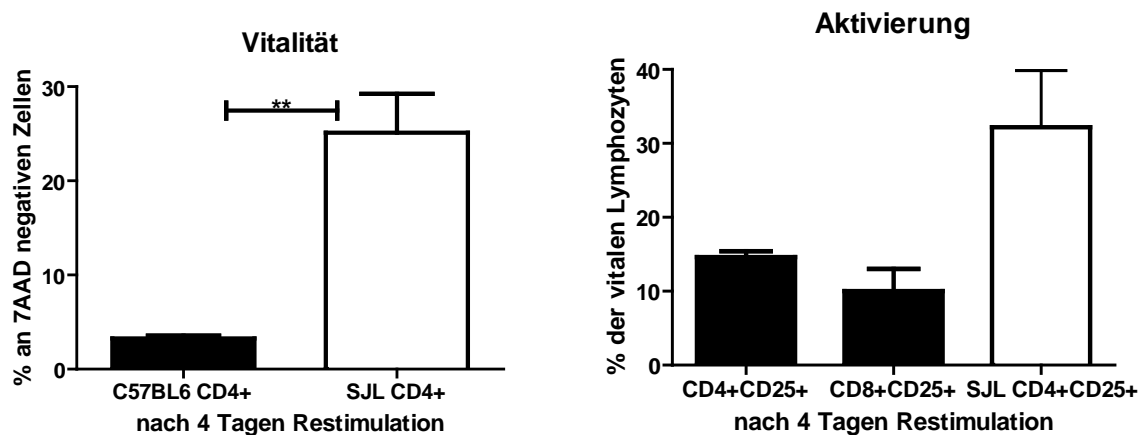


Abb. 4: links Vergleich der Häufigkeiten von vitalen CD4+ T-Zellen nach 4 Tagen Stimulation mit entsprechendem Antigen bei SJL und C57/BL6 Mäusen (** P= 0,0074 ; Mann- Whitney- U Test), rechts Vergleich der Häufigkeiten von CD25+ T-Zellen bei den vitalen Lymphozyten nach 4 Tagen Restimulation.

3.1.2 Stimulierung von MOG reaktiven Zellen mit Phorbol 12-Myristat 13-Acetat/Ionomycin oder Staphylokokken Enterotoxin B

Die zusätzliche Aktivierung mit Phorbol12-Myristat13-Acetat(PMA)/Ionomycin oder Staphylokokken Enterotoxin B führt normalerweise bei T-Zellen nach vier Stunden dazu, dass die Zellen viele Zytokine produzieren [Suni et al., 2005]. In einem Pilotexperiment wurden die Zellen, die vier Tage mit MOG stimuliert wurden zusätzlich mit PMA/Ionomycin oder Staphylokokken Enterotoxin B für vier Stunden inkubiert. Die Interferon- γ Produktion war trotz der Stimulation mit PMA /Ionomycin sehr niedrig ($0,64\% \pm 0,11\%$, N=3). Bei den mit Staphylokokken Enterotoxin B stimulierten Zellen war es ähnlich, die Interferon- γ Produktion war nach vier Stunden bei $0,59\% \pm 0,38\%$ (N=2). Von einer Zellkultur wurden vier Schnitte beobachtet, es wanderten jedoch keine Zellen ein und die meisten wurden weggewaschen. Vereinzelt einwandernde Zellen bewegen sich auf der Stelle. Daher wurde dieser Ansatz nicht weiter verfolgt.

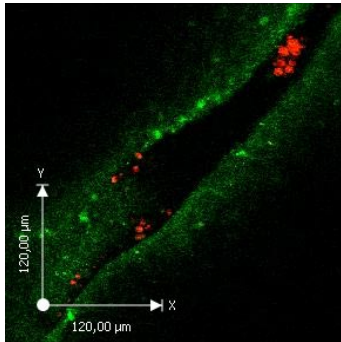


Abb. 5: mit CMTMR rot gefärbte CD4+ T-Zellen nach 4 Tagen Restimulation mit MOG und zusätzliche Aktivierung für 4 Stunden mit PMA/Ionomycin. Zellen liegen bewegungslos in einer Gewebespalte des hippocampalen Hirnschnittes.

3.1.3 Anreicherung Interferon- γ produzierender Zellen

Werden die Lymphozyten aus der Milz von mit MOG immunisierten Mäusen isoliert und mit einem Interferon- γ Sekretionsansatz angereichert, lassen sich vitale, einwandernde myelinspezifische CD4+ T-Zellen beobachten. Es wurden fünf unabhängige Experimente durchgeführt, pro Ansatz ließen sich mehrere Schnitte beobachten. Im Bereich der Lymphozyten im FSC und SSC waren $19\% \pm 1,9\%$ (N=5) der angereicherten Zellen CD4+, $7\% \pm 1,3\%$ (N=6) Interferon- γ -Produzenten und $13\% \pm 1,7\%$ (N=5) der Lymphozytenpopulation waren CD4- und Interferon- γ positiv, so dass 68% der CD4+ Zellen Interferon- γ produzierten. Im Vergleich zu den für vier Tage mit Antigen restimulierten T-Zellen ist der Gesamtanteil der Interferon- γ positiven T-Zellen um ein zehnfaches höher (siehe 3.1.1). Absolut gesehen ist die Zellzahl jedoch mit 20.000 CD4+ T-Zellen zu gering für quantitative Analysen im Kokultur-

model, denn wie bereits erläutert, ist bei dieser Methode bedingt durch Wegspülen mit der Perfusionsflüssigkeit in der Mikroskopierkammer mindestens eine Anzahl von 50.000 Zellen je Schnitt notwendig [Nitsch et al., 2004].

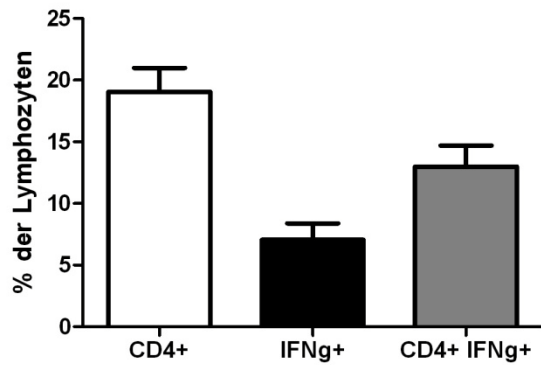


Abb. 6: Durchflusszytometrische Bestimmung der Häufigkeit von CD4+ Lymphozyten und Interferon- γ Produktion nach Interferon- γ -Sekretionsassay (N= 5), vor der magnetischen Selektion der CD4+ Zellen. $19 \pm 1,9\%$ der angereicherten Zellen sind CD4+; $7 \pm 1,3\%$ sind Interferon- γ -Produzenten und $13 \pm 1,7\%$ der Gesamtpopulation sind CD4+ und Interferon- γ positiv, Auswahl der Lymphozyten nach FSC und SSC.

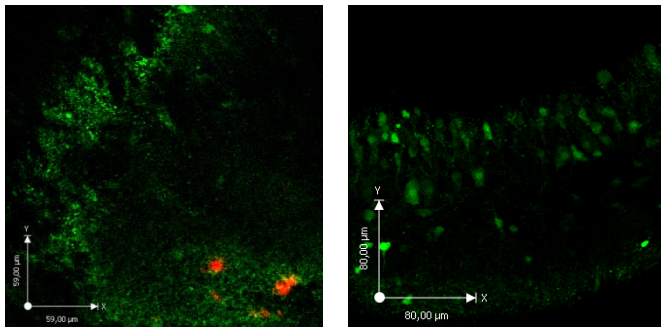


Abb. 7: Ein Beispielerperiment von 5 unabhängigen Experimenten. Die T-Zellen wurden mit CMTMR rot markiert und magnetisch für CD4+ T-Zellen selektiert. Links sieht man die zwei eingewanderte CD4+ T-Zellen im hippokampalen Schnitt aus der Interferon- γ -Produzenten angereicherten Gruppe, rechts einen Schnitt mit Zellen aus der Fraktion ohne Interferon- γ -Produzenten, ohne einwandernde Zellen.

3.1.4 Isolierung von T- Zellen aus dem ZNS erkrankter Mäuse

Unter der Annahme, dass die Zellen, die *in vivo* die Kapazität besitzen ins zentrale Nervensystem einzudringen, auch *ex vivo* in die murinen Hirnschnitte einwandern sollten, wurden Lymphozyten aus den Hirnen an EAE erkrankter C57/BL6 Mäuse isoliert. Diese EAE-Effektorzellen aus dem ZNS erkrankter Mäuse wandern sehr tief ins Gewebe ein, aber nach der aufwendigen Isolierung und Sortierung ist auch hier absolut gesehen die Anzahl an Zellen mit 20.000 Zellen pro Schnitt zu gering. Zwei Wochen nach Immunisierung wurden die Lymphozyten aus den Gehirnen von C57/BL6 Mäusen mit Schwanzlähmung und Hinterbeinschwäche isoliert und dann magnetisch CD8+ und CD4+ Lymphozyten aufgereinigt. $41\% \pm 3\%$ (N=3) der isolierten Zellen sind vitale CD4+ T-Zellen und $42\% \pm 6\%$ (N=3) CD8+ T-Zellen.

3.1.5 MOG Zelllinien vom Th1 Phänotyp durch Verdünnungsansatz

Wie die vorherigen Ansätze zeigten, lassen sich auf die mit den zuvor erläuterten Methoden nicht genügend Effektorzellen aus mit MOG immunisieren Mäusen generieren. Deswegen wurde versucht, gezielt MOG-spezifische Zellen zu expandieren. Mit Hilfe eines „limiting dilution assays“ wurden Zellen so lange verdünnt, bis nur noch wenige Zellen pro Schale kultiviert wurden. Zellklone, die aufs Antigen reagierten, wurden weiter kultiviert. Somit ist die Generierung einer MOG spezifischen Th1-ähnlichen Zelllinie möglich. Die Zellen exprimieren in hohem Maße Interferon- γ und TNF α aber kein Interleukin-17, Interleukin-4 oder Interleukin-10. Die Zellen wandern sehr gut in Hirngewebe ein und eignen sich für Kokultorexperimente.

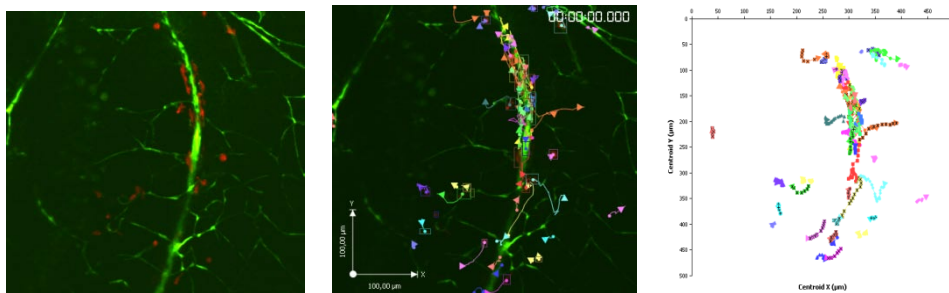


Abb. 8: Ein Beispielexperiment von 5 unabhängigen Experimenten, bei dem MOG spezifische mit CMTMR rot markierte CD4+ Th1-Zellen im hippocampalen Hirnschnitt sich an Gefäßen (mit FITC-Dextran grün gefärbt) entlang bewegen. Links eine Aufnahme aus dem Experiment, in der Mitte mit entsprechenden Bewegungsvektoren der T-Zellen und rechts in der Vektorgraphik deutliche Assoziation der Bewegungsvektoren zum Gefäß.

Ergebnisse

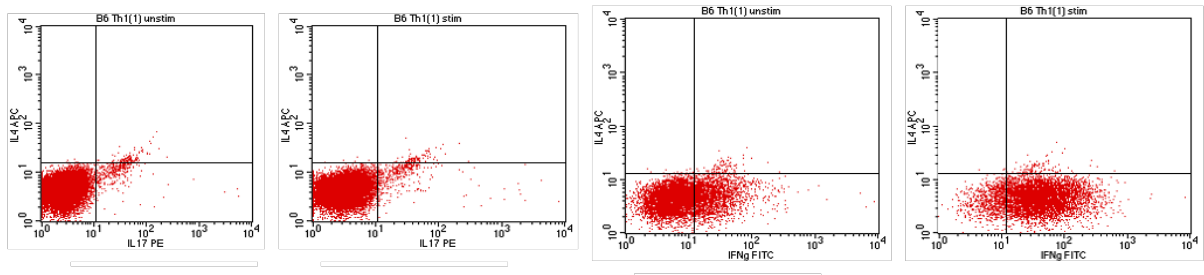


Abb. 9: Zytokinsekretionsmuster eines Beispielerperiments im FACS von C57/BL6 CD4⁺ Zellen mit Th1 Phänotyp nach Verdünnungsansatz: keine Interleukin-4 oder Interleukin-17 Produktion, aber hohe Interferon- γ Produktion (87% der CD4⁺ Zellen)

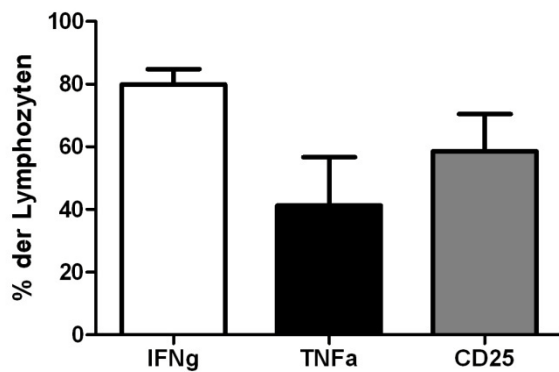


Abb. 10: Darstellung der Zytokinproduktion und Aktivierung der MOG spezifische Zelllinien im FACS. (Werte sind bezogen auf den Bereich der Lymphozyten im FSC und SSC.)

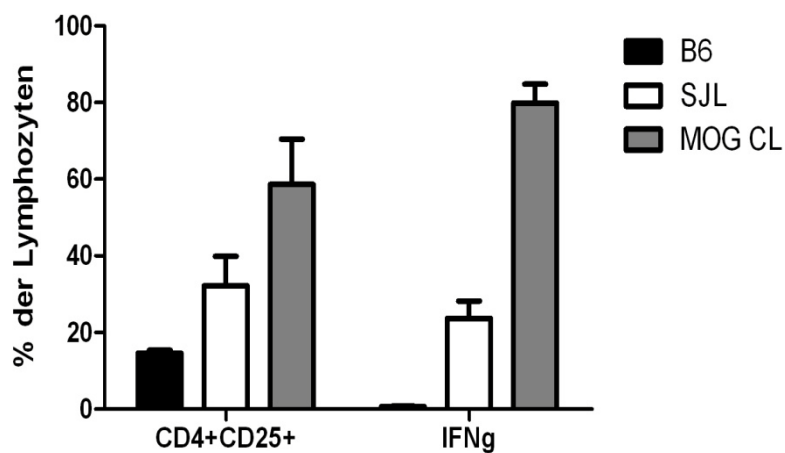


Abb. 11: Vergleich der Zytokinproduktion und Aktivierung der myelinspezifischen T-Zellen (B6: T-Zellen aus C57/BL6 Mäusen nach 4 Tagen Restimulation mit MOG; SJL: T-Zellen aus SJL Mäusen nach 4 Tagen Restimulation mit PLP, MOG CL: MOG spezifische Zellen aus C57/BL6 Mäusen nach Verdünnungsansatz)

3.1.6 Ovalbuminspezifische T-Zellen

Im Vergleich zu den myelinspezifischen Zellen wurde noch ein weiteres System mit antigenspezifischen T-Zellen gegen ein ZNS irrelevantes Antigen gewählt, da für die Analyse des Bewegungsmusters von CD4+ und CD8+ T-Zellen das MOG-Modell bisher nur bedingt nutzbar war, da sich keine CD8+ T-Zelllinie mit Hilfe der Antigenstimulation generieren ließ. Hierfür eignete sich, wie im Folgenden gezeigt wird, das Modell des transgenen T-Zellrezeptors für Ovalbumin in Mäusen mit einem C57/BL6 Hintergrund. Dieses Modell wurde im Rahmen dieser Arbeit in unserem Labor etabliert. Dabei gelingt es durch entsprechende Zugabe von Antigen, Zytokinen und Antizytokinen, ausreichend Ovalbumin-spezifische CD8+, CD4+ Th1 oder Th2 Zellen zu generieren, die alle sehr gut in die Schnitte einwandern. Es wird gezeigt, wie das Zytokinexpressionsmuster und die Verteilung von Aktivitätsmarkern im Verlaufe der Kultivierung der CD4+ und CD8+ T-Zellen aussehen.

3.1.6.1 CD8+ T- Zellen

Bei den CD8+ T-Zellen direkt nach Isolierung der Lymphozyten aus der Milz einer OT-1 Maus, finden sich ca. 20 % CD8+ T-Zellen, nach Stimulation mit Ovalbumin *in vitro* nach 5 Tagen mehr als 80% [Bleifuß, 2004]. Im Rahmen unserer Experimente fanden sich ähnliche Werte (s. Abb.). Die Zellen wurden mit Ovalbumin und Interleukin-2 kultiviert. Die Zellen lassen sich mehrmals mit neuen, bestrahlten, syngenen Antigen-präsentierenden Zellen restimulieren. Der Anteil an Interferon- γ produzierenden CD8+ T-Zellen liegt bei $39\% \pm 6\%$ (N=17) und $26,9\% \pm 10,9\%$ (N=4) produzieren TNF α sowie $92,8 \pm 1,8\%$ (N=6) exprimieren CD25 zwischen Tag 3 und Tag 7 nach Restimulation.

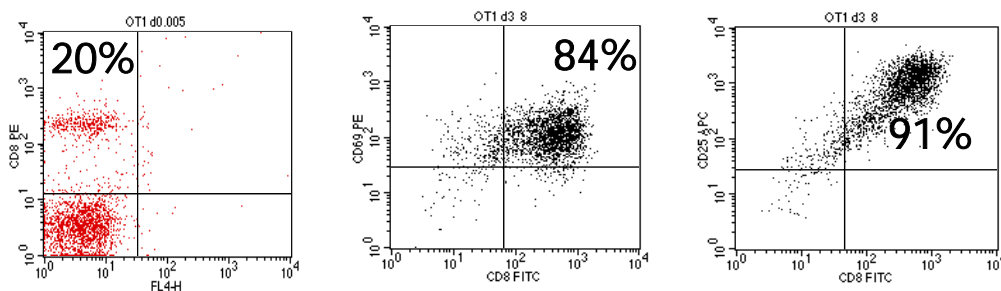


Abb. 12: CD8 Expression und Aktivierung von Milzzellen einer OT-1 Maus; links direkt nach der Isolierung, in der Mitte und rechts nach drei Tagen in Kultur mit Ovalbumin und Interleukin-2. Prozentangaben beziehen sich auf den Lymphozytenbereich im FSC und SSC im FACS.

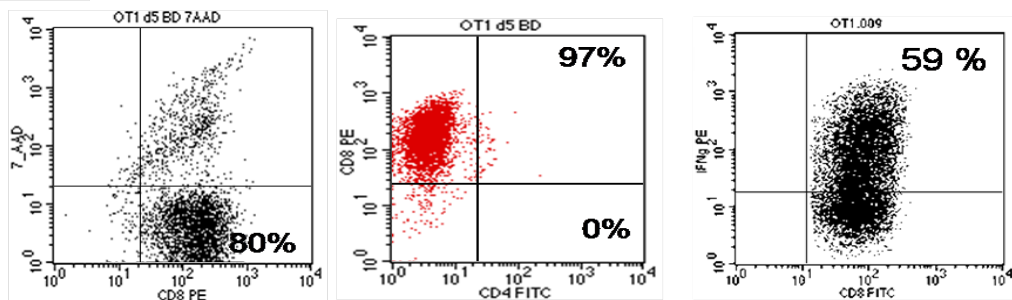


Abb. 13: Vitalität und Zytokinproduktion von Milzzellen einer OT-1 Maus nach 5 Tagen Kultur mit Ovalbumin und Interleukin-2. Prozentangaben beziehen sich auf den Lymphozytenbereich im FSC und SSC im FACS.

3.1.6.2 CD4+ Zellen

Direkt nach Isolierung der Lymphozyten aus der Milz einer OT-2 Maus finden sich ca. 20 % CD4+ T-Zellen, nach Stimulation mit Ovalbumin *in vitro* nach 3 Tagen 90% und nach fünf Tagen 97 % CD4+ Zellen und keine CD8+ T-Zellen mehr. Je nachdem mit welchen Zytokin-spezifischen Antikörpern oder Zytokinen die jeweilige Population zusätzlich kultiviert wurde, bildete sich ein Th1 bzw. Th2 Phänotyp.

3.1.6.2.1 Th1

Diese Zellpopulationen wurden mit Interleukin-12 und anti-Interleukin-4 kultiviert. Die Interferon- γ Produktion liegt drei Tage nach Kultivierung mit Ovalbumin bei $46\% \pm 7,9\%$ (N=12) der Zellen, und $63,5\% \pm 5,3\%$ (N=7) der CD4+ T-Zellen exprimieren den CD25. Zwei von fünf der Interferon- γ positiven Zellen produzieren zusätzlich noch TNF α .

3.1.6.2.2 Th2

Die CD4+ Zellen, die mit anti-Interferon- γ , anti-Interleukin-12 und Interleukin-4 inkubiert wurden, zeigen die typische Zytokinproduktion für einen Th2 Phänotyp: keine Interferon- γ Produktion ($0,2\% \pm 0,2\%$ N=6) aber $29,4\% \pm 5,3\%$ (N=10 Interleukin-4 Produzenten sowie $28,3\% \pm 3,7\%$ (N=6) der CD4+ T-Zellen, die Interleukin-10 produzieren. Auch bei diesem Phänotyp ist nach fünf Tagen die CD25 Expression wie bei den CD4+ T-Zellen des Th1 Phänotypes hoch mit $71,8\% \pm 13,9\%$ (N=2).

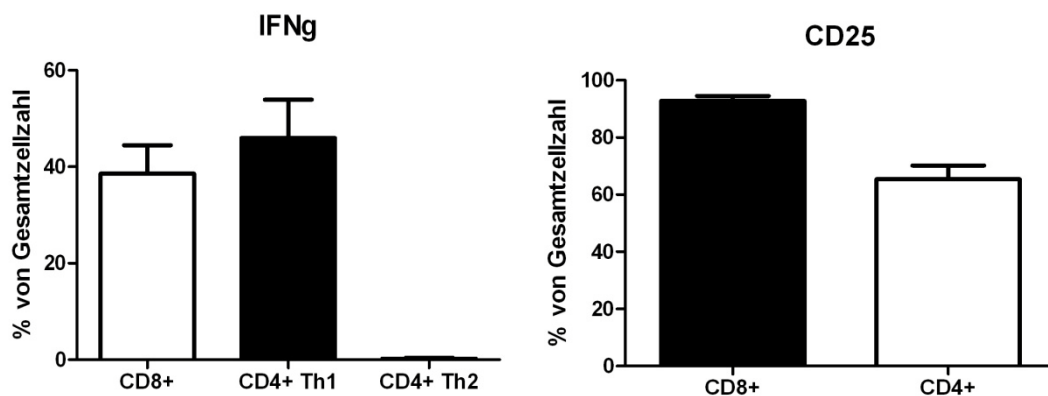


Abb. 14: Darstellung der FACS Ergebnisse nach PMA/IonoStimulation zur Überprüfung des T-Zellphänotypes und der Aktivierung.

3.2 Analyse des Bewegungsmusters von CD4+ und CD8+ T-Zellen

3.2.1 Migrationsverhalten von CD4+ und CD8+ T Lymphozyten in nicht-entzündetem Mausgehirn

Nach einer anfänglichen Einwanderungsperiode sammelte sich die Mehrzahl der CD4+ T-Zellen um mittlere Gefäße, wie hier beispielhaft für OT2 CD4+ Th1 Zellen gezeigt. Einmal in der Nachbarschaft eines Gefäßes präsentierten MOG CD4+ Th1 Zellen, OT2 Th1 und Th2 Zellen eine starke Gefäßassoziation mit konstanter tangentialer Fortbewegung an der Gefäßwand entlang. Die Zellen bewegten sich auf und ab entlang des Gefäßverlaufes und wechselten, manchmal sehr abrupt, die Richtung. Dieses Hin und Her dauerte über die ganze Messperiode an und lässt sich als ein Abrollen des vorderen Zellkorperrandes entlang des Gefäßes mit dem Uropodium beschreiben.

Im Gegensatz zu den CD4+ Zellen bewegten sich die CD8+ Zellen in anderer Weise. Die OT-1 CD8+ T-Zellen wanderten schnell in das Hirngewebe ein und zeigten ein sehr dynamisches Bewegungsmuster in kompakten ZNS Gewebe. Die Bewegungspfade waren nicht auf gefäßnahe Räume begrenzt und kein Innehalten der Zellbewegung konnte beobachtet werden, was darauf hinweist, dass in der Abwesenheit von entsprechendem Antigen keine stabile Interaktion mit diesen sehr stark aktivierten Zellen auftrat. Die Mehrzahl der OT-1 CD8+ T-Zellen zeigte einen polarisierten Umriss mit einem anterior ausgebildeten Lamellipodium und posteriorem Uropodium, wie es auch in Lymphknoten gezeigt werden konnte [Hugues et al., 2004].

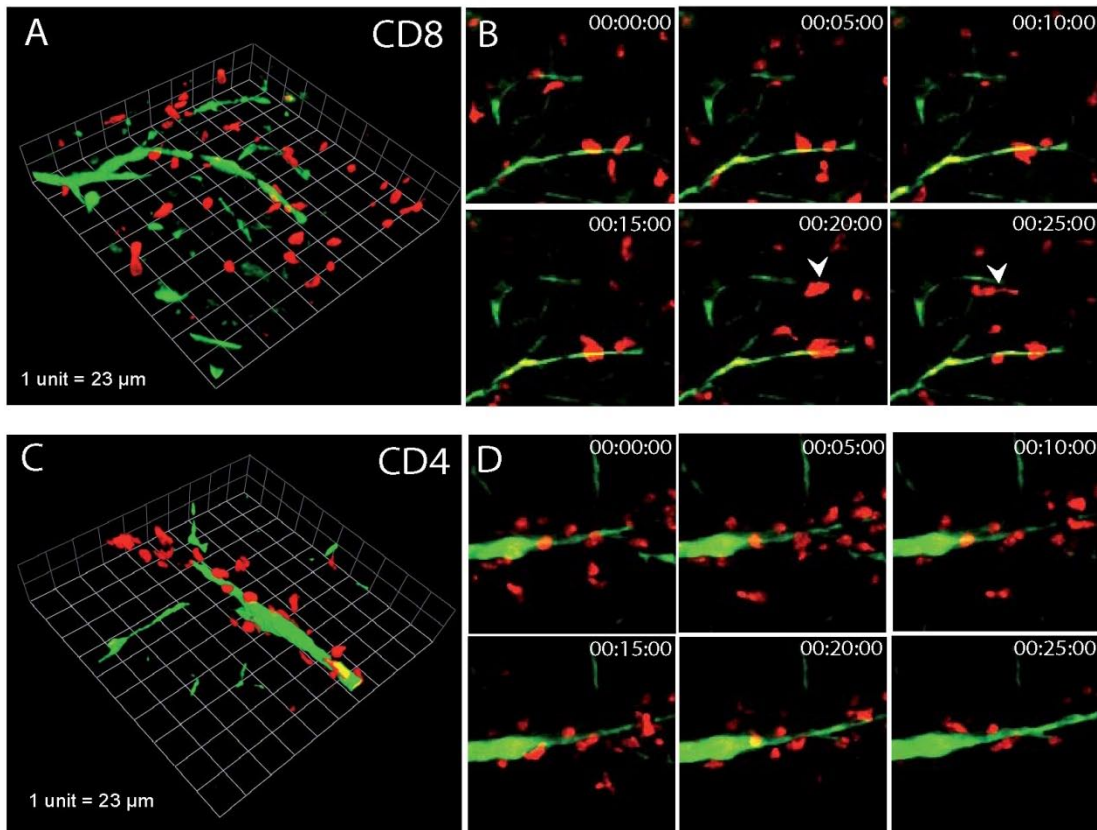


Abb. 15: Dreidimensionale Rekonstruktion von zwei beispielhaften Kokultorexperimenten und Aufnahmen über die Zeit. Der weiße Pfeil markiert eine CD8+ T-Zelle, die sich, wie oben beschrieben, fortbewegt (modifiziert nach [Siffrin et al., 2009]).

3.2.2 Geschwindigkeit

3.2.2.1 Naive T-Zellen

Reife T-Zellen, die ihr entsprechendes Antigen noch nicht gesehen haben, werden als naive T-Zellen bezeichnet. Im Gegensatz zu den mit ihrem Antigen stimulierten T-Zellen wandern T-Zellen vom naiven Phänotyp kaum in die murinen Hirnschnitte ein. Die T-Zellen, die eingewandert sind, zeigen ein vollständig anderes Bewegungsmuster als die stimulierten Effektor T-Zellen. Die Zellen legen nur wenig Strecke im Parenchym zurück, dies kann man gut an der Kürze der Bewegungsvektoren erkennen. Die Geschwindigkeit ist mit $0,028\mu\text{m/s} \pm 0,004\mu\text{m/s}$ (N=14) so gering, dass die Zellen als stationär angesehen werden [Hugues et al., 2004]. Dies steht im Gegensatz zu den mit Antigen über mindestens drei Tagen stimulierten OT-2 CD4+ T-Zellen ($p < 0,0001$ Mann-Whitney-U Test), die eine mittlere Geschwindigkeit hatten von $0,106\mu\text{m/s} \pm 0,005\mu\text{m/s}$ (N=118).

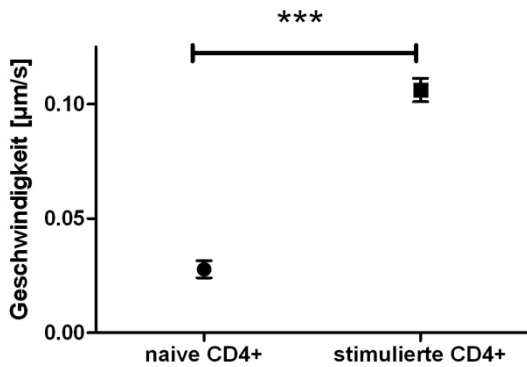


Abb. 16: Vergleich der mittleren Geschwindigkeiten von unstimulierten OT-2 CD4+ T-Zellen mit naivem Phänotyp ($0,028\mu\text{m/s} \pm 0,004\mu\text{m/s}$ N=14) direkt aus der Maus, und nach mindestens drei Tagen Restimulation mit Ovalbumin ($0,106 \mu\text{m/s} \pm 0,005\mu\text{m/s}$ N=118) *** $p < 0,0001$ Mann-Whitney-U Test. Bei der Gruppe der stimulierten CD4+ T-Zellen wurden Th1 und Th2 Zellen zusammengefasst.

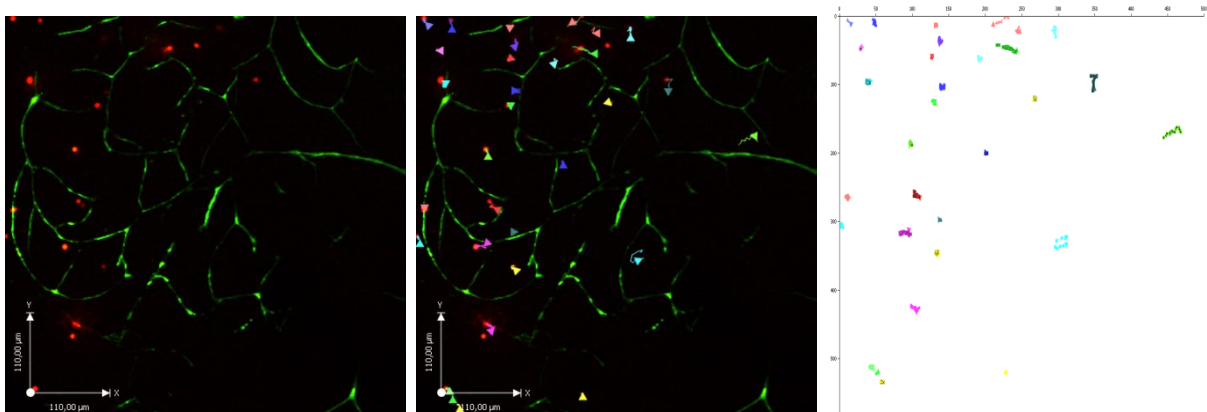


Abb. 17: Ein Beispielerperiment von zwei unabhängigen Experimenten bei dem unstimulierte OT-2 CD4+T-Zellen direkt nach der Isolierung aus der Milz mit CMTMR rot gefärbt wurden. Im hippocampalen Hirnschnitt ist fast gar keine Einwanderung dieser Zellen zu erkennen. Links eine Aufnahme aus dem Experiment, in der Mitte mit entsprechenden wenigen, kurzen Bewegungsvektoren der T-Zellen und rechts die Vektorgraphik mit kurzen Bewegungsvektoren und stationärem Bewegungsverhalten

3.2.2.2 Aktivierte T-Zellen

Zur Etablierung des Systems wurde die Geschwindigkeit der T-Zellsubtypen in Abhängigkeit von der Restimulationsdauer mit dem entsprechenden Antigen untersucht. Bei den OT-1 CD8+ T-Zellen zeigt sich eine Steigerung der Geschwindigkeit mit zunehmender Aktivierung der Zellen. Einen Tag nach Extraktion aus der Milz mit anschließender Stimulation mit ihrem Antigen ist die Geschwindigkeit mit $0,030 \pm 0,002 \mu\text{m/s}$ (N=91) sehr viel langsamer als dann drei Tage später an

Tag 4 nach Stimulation, hier sind die Zellen am schnellsten mit $0,067 \pm 0,007 \mu\text{m/s}$ (N=250). An Tag 5 und 6 ist die mittlere Geschwindigkeit $0,056 \pm 0,001 \mu\text{m/s}$ (N=645) kaum langsamer und hält sich in diesem Rahmen auch bis kurz vor dem nächsten Restimulationszyklus an Tag 7 mit $0,052 \pm 0,001 \mu\text{m/s}$ (N=675).

Die OT-2 CD4+T-Zellen mit einem Th1 Phänotyp bewegen sich hingegen schon am ersten Tag nach der Extraktion aus der Milz und anschließender Stimulation mit Antigen sehr schnell mit $0,102 \pm 0,009 \mu\text{m/s}$ (N=60). Diese Geschwindigkeit wird über den Zeitrahmen eines Restimulationszykluses nicht gehalten, die Zellen werden mit zunehmender Aktivierung leicht langsamer und gleichen sich der der CD8+ OT-1 Zellen an. An Tag 4 haben sie eine mittlere Geschwindigkeit von $0,088 \pm 0,003 \mu\text{m/s}$ (N=351), was geringfügig schneller ist als die Geschwindigkeit der CD8+ OT-1 Zellen zu diesem Zeitpunkt. Auch an den folgenden Tagen bleibt die Geschwindigkeit leicht unter dem Wert von Tag 1, an Tag 5 und 6 haben die CD4+ OT-2 Zellen eine mittlere Geschwindigkeit von $0,099 \pm 0,003 \mu\text{m/s}$ (N=386) und an Tag 8 unmittelbar vor der erneuten Restimulation mit Antigen sind es immerhin noch $0,073 \pm 0,004 \mu\text{m/s}$ (N=119).

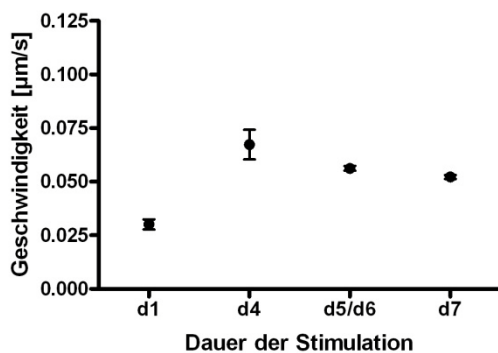


Abb. 18: Geschwindigkeit von OT-1 Zellen

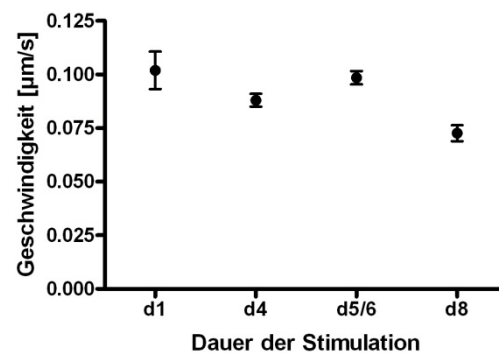


Abb. 19: Geschwindigkeit von OT-2 Th1 Zellen

Insgesamt wurden deshalb nur Zellen, die zwischen vier und sieben Tagen mit Antigen stimuliert wurden, für die nachfolgenden Analysen berücksichtigt. In diesem Zeitraum zeigten die CD4+ und CD8+ T-Zellen nur leicht unterschiedliche Geschwindigkeiten bei der Durchwanderung des Gewebes. OT-1 CD8+ T-Zellen hatten durchschnittlich eine dreidimensionale Geschwindigkeit von $0,0675 \pm 0,003 \mu\text{m/s}$ (N=127), ähnlich wie für OT-1 CD8+ Effektor T-Zellen *in vivo* im Lymphknoten gezeigt wurde [Hugues et al., 2004]. OT-2 CD4+ Th1 Zellen, die sich entlang von Gefäßen bewegten waren etwas schneller (mittlere Geschwindigkeit $0,090 \pm 0,004 \mu\text{m/s}$ N=96) als intraparenchymatös wandernde OT-1 CD8+ T-Zellen. Dagegen waren die OT-2 CD4+ Th2 Zellen bedeutend schneller mit einer mittleren Geschwindigkeit von $0,176 \pm 0,010 \mu\text{m/s}$ (N=22), sie zeigten auch eine extrem deutliche Gefäßassoziation im Vergleich zu den anderen CD4+ T-Zellen.

Ähnlich der OT-2 Th1 Zellen hatten die MOG spezifischen CD4+ Th1 Zellen eine mittlere Geschwindigkeit von $0,080 \pm 0,005 \mu\text{m/s}$ (N=67), ebenso die PLP spezifischen CD4+ Th1 Zellen aus SJL Mäusen, deren mittlere Geschwindigkeit bei $0,112 \pm 0,010 \mu\text{m/s}$ (N=13) lag. Die CD4+ T-Zellen, die aus dem ZNS erkrankter C57/BL6 Mäuse isoliert wurden, hatten eine mittlere Geschwindigkeit von $0,109 \pm 0,022 \mu\text{m/s}$ (N=8), d.h. auch in dem Bereich aller anderen CD4+ T-Zellgruppen. Interessanterweise kann man bei diesen Zellen im Gegensatz zu anderen Zellgruppen keine Anhäufung um den Mittelwert erkennen, sondern es bildeten sich zwei unterschiedlich schnelle Gruppen: eine mit einer ähnlich schnellen Geschwindigkeit wie die OT-2 CD4+ Th2 Zellen, die andere eher langsam im Bereich der OT-1 CD8+ Zellen.

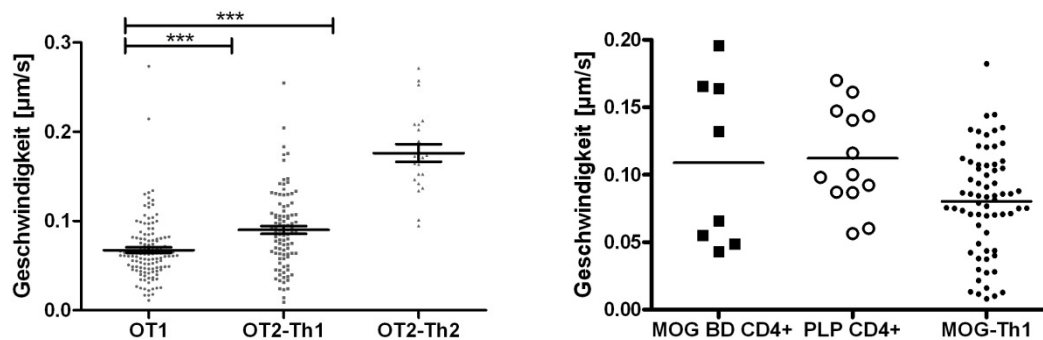


Abb. 20: Geschwindigkeit der untersuchten T-Zellsubtypen im Überblick. Links Ovalbumin spezifische T-Zellen, rechts CD4+ T-Zellen aus dem Gehirn erkrankter Mäuse (MOG BD CD4+), PLP spezifische CD4+ T-Zellen aus SJL Mäusen sowie MOG spezifische CD4+ Th1-Zellen aus C57/BL6 Mäusen.

3.2.3 Bewegungsvektoren und Bewegungsvektor-Gefäßwinkel

Da die herkömmlichen Auswertungsmethoden wie Abschweifungsindex (*meandering index*) oder mittlere Entfernungsrates (*mean displacement plot*) für die in der vorliegenden Arbeit beobachteten Ergebnisse nicht aussagekräftig genug waren, wurde in unserer Arbeitsgruppe von A. Brandt eine Methode entwickelt, um die Beziehung der Zellbewegung zu Referenzgefäßen zu beschreiben. Eine ähnliche Methode wurde von A. Hauser und Kollegen beschrieben, um die intrazonale Zirkulation von B-Zellen im Keimzentrum des Lymphknotens zu beschreiben [Hauser et al., 2007].

3.2.3.1 CD4+

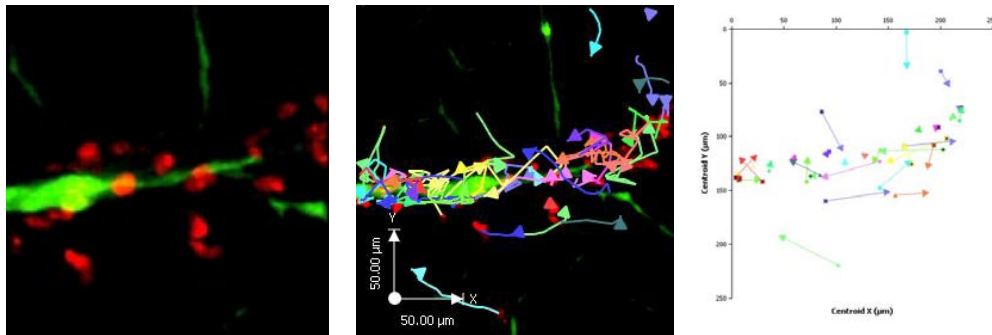


Abb. 21: Ein Beispielexperiment von 25 unabhängigen Experimenten bei dem sich Ovalbumin spezifische mit CMTMR rot markierte CD4+ Th1 Zellen im hippokampalen Hirnschnitt an dem mit FITC-Dextran grün gefärbten Gefäß entlang bewegen. Links eine Aufnahme aus dem Experiment, in der Mitte mit entsprechenden Bewegungsvektoren der T-Zellen und rechts in der Vektorgraphik deutliche Assoziation der Bewegungsvektoren zum Gefäß (modifiziert nach [Siffrin et al., 2009]).

Es zeigt sich eine Anordnung der Bewegungsvektoren um Gefäße, hier exemplarisch für OT-2 Th1 T-Zellen gezeigt. Alle CD4+ T-Zellsubtypen zeigten eine Gefäßassoziation. Die Winkel zwischen den Bewegungsvektoren und dem Referenzvektor in der Gefäßachse waren deutlich kleiner als 45° ($32,36^\circ \Rightarrow 2,56^\circ$ N=185)

3.2.3.2 CD8+

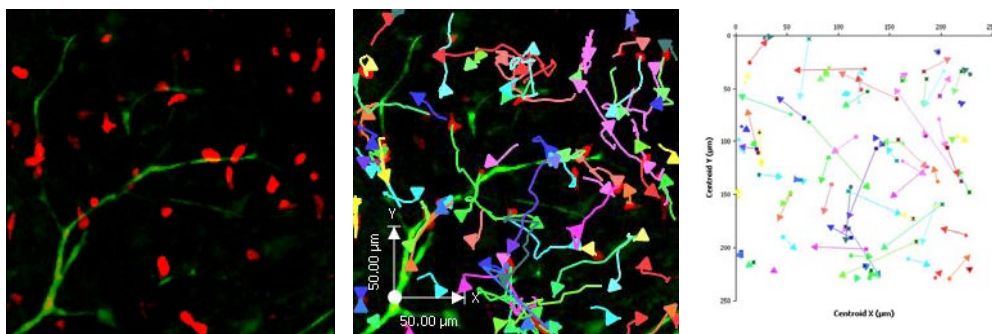


Abb. 22: Ein Beispielexperiment von 30 unabhängigen Experimenten bei dem sich Ovalbumin spezifische mit CMTMR rot markierte CD8+ T- Zellen im hippokampalen Hirnschnitt unabhängig von den mit FITC-Dextran grün gefärbten Gefäß bewegen. Links eine Aufnahme aus dem Experiment, in der Mitte mit entsprechenden Bewegungsvektoren der T-Zellen und rechts in der Vektorgraphik mit ungerichteten Bewegungsvektoren (modifiziert nach [Siffrin et al., 2009]).

Im Gegensatz zu den CD4+ T-Zellen ist das Muster der Bewegungsvektoren von CD8+ T-Zellen ungerichtet. Das Diagramm (Abb.22) zeigt weit über das gesamte Gewebe verteilte Bewegungsvektoren mit sehr unterschiedlichen Winkeln bezüglich der Gefäßachse, welches in einem mittleren Winkel von ungefähr 45° ($44,96^\circ \pm 2,37^\circ$ N=127) resultiert.

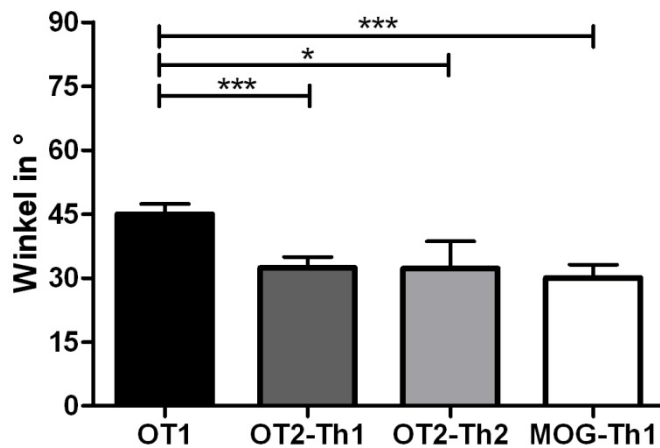


Abb. 23: Winkelwerte zwischen Bewegungsvektoren und Gefäßreferenzvektor der unterschiedlichen T-Zellsubtypen von Ovalbumin und MOG spezifischen Zellen. OT-1 (N=127), OT-2-Th1 (N=96), OT-2-Th2 (N=22), MOG-Th1 (N=67); *** $P \leq 0,001$, * $P \leq 0,05$ (modifiziert nach [Siffrin et al., 2009]).

3.3 Blockierung von Adhäsionsmolekülen

Die Zielsuche der Lymphozyten ist durch ein fein abgestimmtes komplexes System aus Chemokinen und Adhäsionsmolekülen reguliert [Butcher and Picker, 1996], der Einfluss zweier Adhäsionsmoleküle wurde getestet.

3.3.1 Inkubation mit Anti-VLA-4

OT-2 CD4+ Th1 Zellen wurden über 24 Stunden mit einem neutralisierenden Antikörper, der jedoch nicht zu einer Depletion der T-Zellen führt, gegen das Adhäsionsmolekül $\alpha 4\beta 1$ -Integrin, auch genannt VLA-4 (Very-Late-Antigen-4), inkubiert. Dieses Integrin wird normalerweise auf hämatopoetischen Zellen, wie z.B. Lymphozyten, exprimiert und kann an seine Liganden Fibronectin und VCAM-1 binden, wenn die Zelle durch bestimmte Stimuli aktiviert wird. VLA-4 scheint sowohl ein essentieller Faktor für T-Zellen zu sein, um in das ZNS eindringen zu können als auch für enzephalitogenen T-Zellen, um EAE übertragen zu können [Keszthelyi et al., 1996; Yednock et al., 1992].

Trotz blockierendem Antikörper ist die Geschwindigkeit im Vergleich mit unbehandelten OT-2 CD4+ Th1 Zellen fast gleich ($0,099 \pm 0,007 \mu\text{m/s}$ N=62). Der Bewegungsvektor-Gefäßwinkel ist ebenso fast unverändert bei $32,62^\circ \pm 3,24^\circ$ N=62)

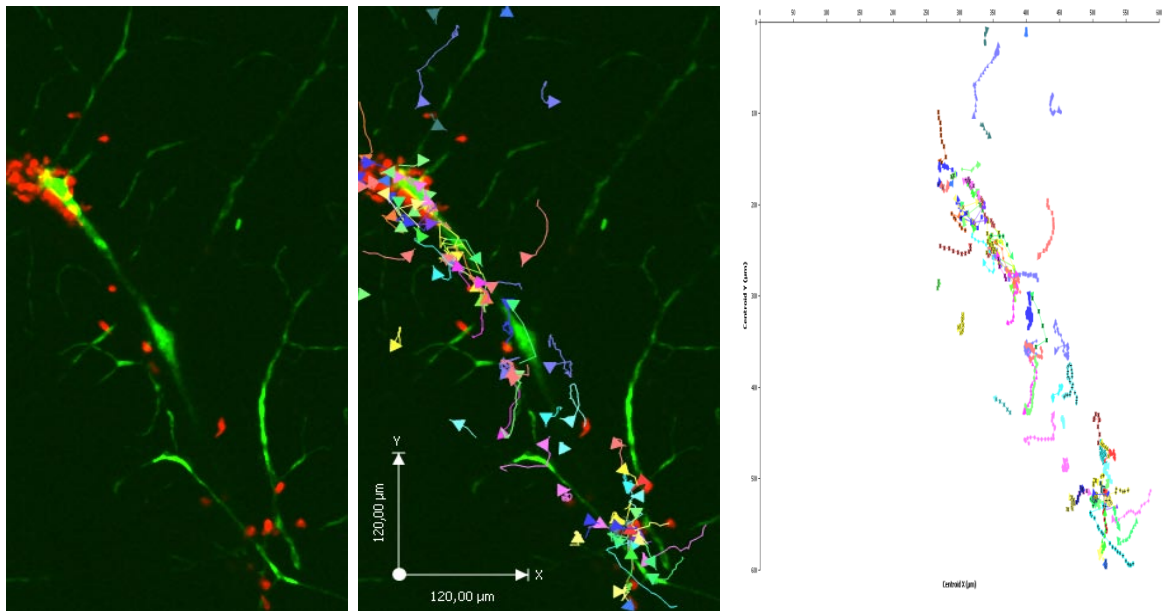


Abb. 24: Ein Beispielexperiment von 3 unabhängigen Experimenten bei dem sich Ovalbumin spezifische mit CMTMR rot markierte CD4+ Th1 Zellen - trotz Inkubation mit einem blockierenden Antikörper gegen $\alpha 4$ -Integrin - im hippokampalen Hirnschnitt an dem mit FITC-Dextran grün gefärbten Gefäß entlang bewegen. Links eine Aufnahme aus dem Experiment, in der Mitte mit entsprechenden Bewegungsvektoren der T-Zellen und rechts in der Vektorgraphik deutliche Assoziation der Bewegungsvektoren zum Gefäß

3.3.2 CXCR4 Blockade durch AMD3100

Der Chemokinrezeptor CXCR4 von OT-2 CD4+ TH1 Zellen wurde drei Stunden vor den Experimenten durch Inkubation mit dessen Antagonisten AMD3100 blockiert, einem kleinem Molekül, das initial für die HIV-Therapie entwickelt wurde, da CXCR4 für manche Virustypen ein Korezeptor darstellt. CXCR4 ist ein α -Chemokinrezeptor spezifisch für CXCL12, auch genannt SDF-1 (*stromal cell derived factor-1*). CXCL12 wird stark an der basolateralen, d.h. der Parenchym zugewandten Seite, exprimiert und scheint während inflammatorischer Prozesse wie z.B. einer EAE das Ausmaß der Entzündung zu limitieren indem die Lymphozyten perivaskulär gehalten werden [McCandless et al., 2006].

Nach Blockade von CXCR4 war die mittlere Geschwindigkeit in den Kokultorexperimenten fast unverändert bei $0,074 \pm 0,003 \mu\text{m/s}$ (N=105). Der Bewegungsvektor-Gefäßwinkel war jedoch deutlich erhöht bei $42,36^\circ \pm 1,99^\circ$ (N=197) und das Bewegungsmuster glich fast dem der ungerichtet wandernden OT-1 CD8+ Zellen.

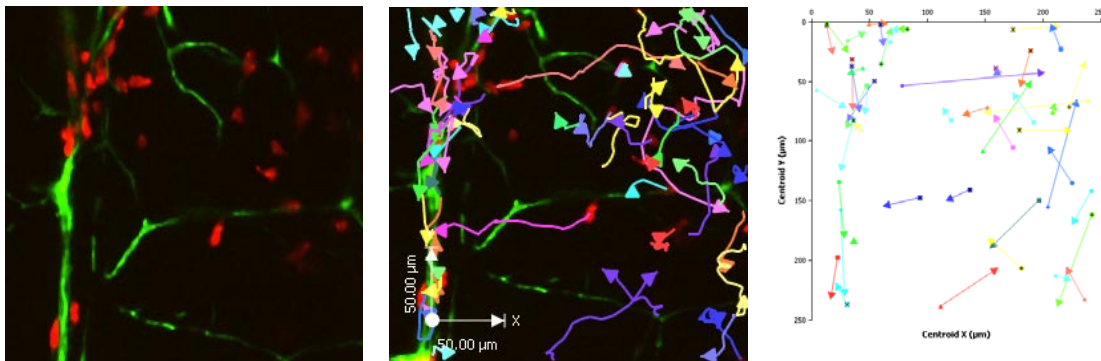


Abb. 25: Ein Beispielexperiment von 6 unabhängigen Experimenten bei dem sich Ovalbumin spezifische mit CMTMR rot markierte CD4+ Th1 Zellen, die nach Inkubation mit einem Antagonisten von CXCR4 (AMD3100), im hippocampalen Hirnschnitt nicht mehr an dem mit FITC-Dextran grün gefärbten Gefäß entlang bewegen. Links eine Aufnahme aus dem Experiment, in der Mitte mit entsprechenden Bewegungsvektoren der T-Zellen und rechts in der Vektorgraphik mit ungerichteten Bewegungsvektoren (modifiziert nach [Siffrin et al., 2009]).

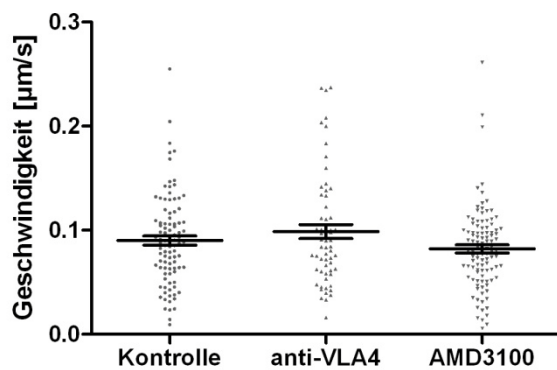


Abb. 26: mittlere Geschwindigkeit von OT-2 CD4+ T-Zellen; Die Kontrollgruppe ist unbehandelt, die beiden anderen Gruppen sind mit anti-VLA-4 bzw. AMD3100 vorinkubiert. Es zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Mittelwerten (modifiziert nach [Siffrin et al., 2009]).

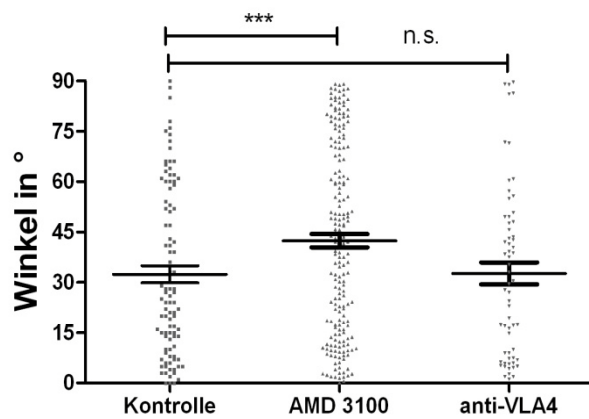


Abb. 27: Die Winkel zwischen Bewegungsvektoren und Gefäßreferenzvektor von OT-2 CD4+ T-Zellen. Die Kontrollgruppe ist unbehandelt, die beiden anderen Gruppen sind mit anti-VLA-4 bzw. AMD3100 vorinkubiert. Es zeigt sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Mittelwerten der AMD3100 und der Kontrollgruppe *** $P < 0,001$ im Gegensatz zu der Gruppe mit anti-VLA4, die keinen signifikanten Unterschied zeigte. Kontrolle $N=96$ (modifiziert nach [Siffrin et al., 2009]).

4 Diskussion

Ziel der Arbeit war die grundlegenden Mechanismen des Verhaltens von Immunzellen im zentralen Nervensystem (ZNS) für das allgemeine Verständnis der Immunüberwachung und der Pathogenese entzündlicher ZNS-Erkrankungen wie z.B. der Multiplen Sklerose aufzudecken und dadurch neue Therapiemöglichkeiten zu gewinnen. Hierzu wurden für Leukozytensubpopulationen die Invasion und Migration im nichtentzündlichen ZNS mit Hilfe der Zwei Photonen Mikroskopie untersucht, um erstmals die Dynamik dieser Vorgänge im vitalen kompakten Hirngewebe mitzuverfolgen.

Zur Analyse des Wanderungsverhaltens in Abhängigkeit vom Aktivierungsgrad, des T-Zellsubtyps und unterschiedlicher Adhäsionsmoleküle und Chemokinrezeptoren waren die bisher in der Peripherie üblichen Analyseparameter unzureichend, so dass zusätzlich eine in unserer Arbeitsgruppe entwickelte Analysemethode Anwendung fand. Diese beschreibt mathematisch den Weg der T-Zelle im Vergleich zu dem nächstliegenden Gefäß und hilft so, Chemokin abhängige Unterschiede im Migrationsverhalten von Zellpopulationen zum Gefäßbaum zu quantifizieren.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit geben Aufschluss über das unterschiedliche Wanderungsverhalten von T-Zellsubtypen im murinen nichtentzündlichen Gehirn. Dazu wurde das oben beschriebene Modell verwendet, in dem murine T-Zellen auf hippokampale Schnitte gegeben werden. Es wurde untersucht welche Mechanismen für das unterschiedliche Wanderungsverhalten von CD4+ und CD8+ T-Zellen verantwortlich sein könnten, und wie die Zellen ausgestattet sein müssen, um überhaupt ins kompakte Gewebe einzuwandern. Es zeigte sich in unseren Experimenten, dass nicht alle Immunzellen, die nach intraperitonealem Transfer *in vivo* im ZNS wieder gefunden werden, oder solche, die eine hohe Zytokinproduktion *in vitro* haben, über den beobachteten Zeitraum von einigen Stunden *ex vivo* in das Hirngewebe eindringen. Im Folgenden sollen die Ergebnisse im Zusammenhang mit der aktuellen Literatur die Rolle der Aktivierung der Immunzellen für die migratorische Fähigkeit näher beleuchten und dann auf das unterschiedliche Wanderungsmuster von CD8+ und CD4+ Effektor T-Zellen im Kontext mit weiteren T-Zellsubtypen eingegangen werden. Hierbei ist es der Technik der Zwei Photonen Mikroskopie zu verdanken, dass im Gegensatz zur Immunhistochemie oder konfokalen Mikroskopie nicht nur ein statischer Zustand nach Fixierung des Gewebes beobachtet werden kann, sondern die Dynamik des Migrationsprozesses im lebenden Gewebe mit verfolgt wird. Zum Abschluss werden die Konsequenzen einer therapeutischen CXCR4-Blockade für Multiple Sklerose und anderer Erkrankungen diskutiert. Die CXCL12 vermittelte Kompartimentbildung im ZNS hat wohl eher eine anti-inflammatorische Wirkung, aufgrund von pro-inflammatorischen Effekten von CXCL12 jenseits der Blut-Hirn-Schranke in der Peripherie, sind die Perspektiven einer therapeutischen CXCR4 Blockade jedoch noch nicht eindeutig.

4.1 Die Rolle von CD4+ und CD8+ T-Zellen bei Multipler Sklerose und EAE

Lange Zeit galt das ZNS als eines der immunologisch privilegierten Organe. Diese Vorstellung hatte ihren Ursprung in der Beobachtung von Sir Peter Medawar, dass Hautlappen eines Hasen, transplan-

tiert auf das subkutane Gewebe eines anderen Hasen, abgestoßen werden, während Hautlappen transplantiert auf das Gehirn des Empfängertieres toleriert werden [Medawar, 1948]. Im Gegensatz zu den meisten Organen ist das ZNS durch eine fast undurchdringliche Barriere für Makromoleküle und Zellen vom Immunsystem getrennt, die Blut-Hirn-Schranke, [Hickey, 2001]. Als weitere Besonderheit fehlen klassische lymphatische Gefäße. Die starre Trennung von Immunsystem und Nervensystem lässt sich jedoch spätestens seit den Beobachtungen nicht mehr aufrecht erhalten, dass aktivierte T-Zellen jederzeit, nicht nur bei Entzündung, die Blut-Hirn-Schranke überwinden und durch das ZNS wandern [Hickey, 1999]. Man vermutet eine immunologisch überwachende Funktion dieser patrouillierenden Zellen. Dabei können Zellen des ZNS als Antigen-präsentierende Zellen für ankommende T-Zellen fungieren. Dies ist vermutlich die Ursache dafür, dass myelinspezifische T-Zellen nach *in vitro* Stimulation im ZNS eine Entzündungsreaktion stimulieren, während entsprechend aktivierte T-Zellen mit irrelevanter Spezifität initial auch im ZNS gefunden werden können, dann aber wieder verschwinden [Wekerle et al., 1986; Hickey et al., 1991].

Das unterschiedliche Wanderungsverhalten von CD4+ und CD8+ T-Zellen ist von besonderem Interesse, da der Einfluss von CD4+ und CD8+ T-Zellen bei Erkrankungen wie Multipler Sklerose und EAE noch nicht vollständig geklärt ist. Bekannt ist, dass die Rolle der CD8+ T-Zellen in der EAE nicht unbedingt mit der bei Multipler Sklerose identisch ist. Während bei Multipler Sklerose durchaus eine aktive Beteiligung bei der neuronalen Schädigung und der Myelinscheiden angenommen wird, [Babbe et al., 2000] zeigen die meisten Studien zur EAE, dass die Krankheit durch CD4+ T-Zellen ausgelöst wird [Gold et al., 2006] und den CD8+ T-Zellen eher eine regulatorische Funktion zukommt [Friese and Fugger, 2005]. Vor diesem Hintergrund gibt das CXCR4 abhängige Wanderungsverhalten von CD4+ T-Zellen im Gegensatz zu jenem der CD8+ T-Zellen einen weiteren Hinweis auf die unterschiedlichen Regulationsmechanismen der beiden T-Zellsubtypen, die man bei einer gezielten Therapie autoimmunologischer Erkrankungen wie der Multiplen Sklerose im Auge behalten muss.

Im nächsten Abschnitt geht es darum, welche Zellen überhaupt unabhängig von der Blut-Hirn-Schranke in das kompakte ZNS Parenchym einwandern können, was die Grundvoraussetzung im gesunden und pathologischen Zustand vom Zusammenspiel zwischen Immunzellen und Gehirn ist. Anschließend werden Faktoren, die die Orientierung der T-Zellen im Parenchym beeinflussen, diskutiert.

4.1.1 Was beeinflusst die Motilität der T-Zellen im ZNS?

4.1.1.1 *Naive T-Zellen*

Das Dilemma, dass in Tieren wie in Menschen, ob gesund oder krank, autoreaktive T-Zellen gegen ZNS Antigene zu finden sind [Anderson et al., 2000; Tejada-Simon et al., 2001], erklärte man damit, dass nur nach eben stattgefundener Aktivierung T-Zellen ins ZNS einwandern können [Meyermann et al., 1986] und somit autoreaktive zu autoaggressiven T-Zellen werden. Was befähigt die T-Zellen in das kompakte Gewebe des ZNS einzuwandern, wo Axon an Axon ummantelt mit Myelin liegt und jede Lücke zwischen den Strukturen mit Astrozyten, Oligodendrozyten und Mikrogliazellen ausgefüllt ist?

Der Mechanismus, der den Zellen einen Weg zwischen diesen Strukturen bahnt, muss sehr effizient sein und ist noch nicht verstanden. Für die aktivierten T-Zellen ist eine Vielzahl an proteolytischen Enzymen bekannt, z.B. die Metalloproteinasen, die Disintegrine oder die Granzyme [Opdenakker et al., 2003], die dazu beitragen könnten, den Weg durch das dichte Gewebe zu bahnen.

Die reifen T Zellen, die ihr entsprechendes Antigen noch nicht gesehen haben, d.h. naive T-Zellen, exprimieren diese Moleküle hingegen nicht. Sie exprimieren Moleküle, die für eine Wanderung zu sekundären lymphatischen Organen wichtig sind. Das wären im speziellen L-Selektin, LFA-1^{int} und CCR7 für CD4+ sowie CD8+ naive T-Zellen. Zusätzlich fehlen naiven T-Zellen die meisten gewebetypischen Rezeptoren, so dass man dachte, sie hätten keinen Zugang zu nicht lymphatischem Gewebe und man davon ausgeht, dass sie zwischen Blut, sekundär lymphatischen Organen und Lymphe zirkulieren [Mora and von Andrian, 2006; Butcher and Picker, 1996].

Mittlerweile wurden einige Hinweise gefunden, dass auch nicht aktivierte, ruhende T-Lymphozyten in das ZNS einwandern können und zum normalen T-Zellrepertoire gehören [Seabrook et al., 1998; Cose et al., 2006], Seabrook und Kollegen fanden im Liquor von gesunden Schafen ruhende Lymphozyten, die zwischen Liquor und zervikalen Lymphknoten zirkulierten. Cose und Kollegen konnten eine nicht zu vernachlässigende Menge an naiven CD4+ und CD8+ T-Zellen in Pankreas, Gastrointestinaltrakt, Lunge, Leber, Niere, Haut, Hoden und Gehirn von Mäusen nachweisen. Sie hatten mindestens einen Anteil von 20% an der gesamt T-Zellpopulationen im entsprechenden Gewebe. Die Zellen waren nicht nur vom Phänotyp, denn diesen können Gedächtnis T-Zellen imitieren [Tough and Sprent, 1994], sondern auch funktionell „naiv“ und exprimierten nach Stimulation mit PMA/Ionomycin keine Effektorzytokine, ebenso wurden Adhäsionsmoleküle nicht hoch reguliert, wie man es von Effektor und Gedächtnis T-Zellen kennt. Leider machen die Autoren keine Angabe, wie die T-Zellen aus dem ZNS isoliert wurden. Bei der üblichen Methode der Perfusion des Blutkreislaufes vor Isolierung, um eine Kontamination mit T-Zellen aus dem Blut zu vermeiden, kann es durch den hohen Druck mit dem der Blutkreislauf durchspült wird, sicherlich zu Verunreinigungen kommen. Damit wäre aber immer noch nicht der wirklich beachtliche Anteil an naiven T-Zellen im Gehirn der gesunden Tiere erklärt. Des Weiteren ist immer noch unklar, wie naive T-Zellen die Blut-Hirn-Schranke überwinden.

In einem *in vitro* Ansatz konnten Woolf und Kollegen zeigen, dass naive T-Zellen in Kammern mit löslichen vs. matrixgebundenen CCL21, dem Ligand von CCR7 und CXCL12, dem Ligand von CXCR4, sich nur die naiven T-Zellen mit matrixgebundenen Chemokinen fortbewegen [Woolf et al., 2007]. In den vorliegenden zwei Pilotexperimenten gehen wir einen Schritt weiter. Es wurden naive T-Zellen im nichtentzündlichen Hirnschnitt unter Umgehung der Blut-Hirn-Schranke untersucht, da die T-Zellen direkt auf das Hirngewebe gegeben wurden, so dass auch bei fehlender Fähigkeit, die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden, untersucht werden kann, wie die Zellen sich im extralymphatischen Gewebe, speziell im Gehirn verhalten. Es wurden CD4+ T-Zellen aus OT-2 Mäusen verwendet, d.h. die Mehrzahl der CD4+ T-Zellen hat einen T-Zellrezeptor für Ovalbumin. Bei diesen Tieren sollte die akzidentielle Aktivierung der T-Zellen durch umgebende Antigene sehr gering sein. Die meisten experi-

mentellen Ansätze, die das Verhalten von naiven T-Zellen *in vivo* untersuchen, haben einen ähnlichen Ansatz und verwenden das Modell der Ovalbumin transgenen Maus.

Nach der Applikation der naiven CD4+ T-Zellen auf den Hirnschnitt wurde die Mehrzahl mit der Perfusionslösung weggespült. Einige wenige jedoch wanderten in das kompakte Gewebe ein, aber mit einer sehr viel geringeren Geschwindigkeit als die aktivierten T-Zellen. Die mittlere Geschwindigkeit der einwandernden Zellen war mit $0.028\mu\text{m/s} \pm 0.004\mu\text{m/s}$ so gering, dass man von einem fast ausschließlich stationären Verhalten sprechen kann. Bei den Studien zu Lymphozytenbewegungsverhalten in Lymphknoten werden Zellen, die sich mit weniger als $0,03 \mu\text{m/s}$ bewegen als stationär bezeichnet [Miller et al., 2002; Hugues et al., 2004].

Bei den vorliegenden Daten der Experimente zu CD4+ T-Zellen mit naivem Phänotyp kann man nach diesem Gesichtspunkt nur bei vier von 14 T-Zellen von einem wirklichen Migrationsverhalten sprechen, aber auch diese T-Zellen waren mit $0,04\mu\text{m/s} \pm 0.01\mu\text{m/s}$ sehr langsam. Im Lymphknoten hingegen zeigen naive T-Zellen intravital gemessen mit Werten um $0,16\mu\text{m/s}$ eine sechsfach höhere mittlere Geschwindigkeit als bei unseren Experimenten mit naiven T-Zellen in hippokampalen Hirnschnitten. Bei den Effektor T-Zellen liegen die mittleren Geschwindigkeiten hingegen im selben Bereich [Miller et al., 2003]. Wahrscheinlich ist daher die unterschiedliche extrazelluläre Matrix für das unterschiedliche Verhalten der naiven T-Zellen im ZNS und Lymphknoten verantwortlich. Die Mechanismen, die zu Bewegung von naiven T-Zellen in organotypischer Umgebung führen, sind wahrscheinlich vielfältiger als das alleinige Vorhandensein von den zwei matrixgebundenen Chemokinen CCL21 und CXCL12, die von Woolf und Kollegen identifiziert wurden.

Die Frage welche Rolle die naiven T-Zellen im Gehirn haben, ob es eine alternative Möglichkeit für periphere Toleranzentwicklung darstellt, oder die naiven Zellen dort apoptotisch werden, könnten nur Zellverfolgungen in und aus dem Gehirn von nicht T-Zellrezeptor transgenen Mäusen *in vivo* zeigen. Experimente von Brabb und Kollegen weisen auf eine mögliche Toleranzfunktion hin. In für MBP transgenen T-Zellrezeptor Mäusen konnten interessante Beobachtungen gemacht werden, auch wenn man diese nur begrenzt auf Mäuse mit einem normalen T-Zellrepertoire übertragen kann. Naive MBP spezifische T-Zellen, die aus dem Gehirn isoliert wurden, reagierten anschließend *in vitro* nicht auf ihr Antigen, im Gegensatz zu nicht ZNS spezifischen T-Zellen. Die MBP spezifischen T-Zellen aus der Peripherie reagierten hingegen unverändert im Vergleich zu nicht ZNS spezifischen T-Zellen stark auf eine Stimulation mit ihrem Antigen [Brabb et al., 2000].

4.1.1.2 Aktivierte T-Zellen

4.1.1.2.1 Stimulation mit Antigen

Anders als bei den naiven T-Zellen, wird von den aktivierten Effektor- und Gedächtnis T-Zellen erwartet, dass sie die Fähigkeit besitzen, durch das Hirngewebe zu wandern. Die Ergebnisse der CD4+ und CD8+ T-Zellen, die mit Antigen *in vitro* stimuliert wurden und anschließend in großer Zahl in das Parenchym einwanderten, ist im Einklang mit der herkömmlichen Vorstellung, dass die Kontrolle der nicht

lymphatischen Gewebe durch das Immunsystem Aufgabe eben dieser ist [Mora and von Andrian, 2006].

Bei den myelinspezifischen Zellen ergab sich die Schwierigkeit der niedrigen Frequenz von MOG spezifischen Zellen trotz Immunisierung mit entsprechendem Peptid. Wenn die Lymphozyten stimuliert wurden, wie für einen adaptiven Transfer der EAE, sind keine vitalen, einwandernde Zellen im Kokulturmodell zu beobachten. Splenozyten aus erkrankten Mäusen können nach *in vitro* Restimulation mit MOG in naiven syngeneten Mäusen zu einer Erkrankung führen. Die Frequenz an aktivierten Effektor- oder Gedächtnis T-Zellen muss so niedrig sein, dass *in vivo* innerhalb von zehn Tagen es zwar zur Einwanderung ins Gehirn der Mäuse kommen kann [Lassmann et al., 1988], die Analyse im Kokulturmodell jedoch nur möglich ist, wenn über einen Verdünnungsansatz, MOG spezifische Zelllinien isoliert werden können. Diese Zelllinien können dann zur Proliferation gebracht werden, so dass genügend MOG spezifische T-Zellen zur Verfügung stehen. Oder aber ein für MOG transgenes T-Zellrezeptor Mausmodell wird verwendet, welches in unserem Labor zum Zeitpunkt der Experimente noch nicht zur Verfügung stand und die Nachteile von transgenen Mausmodellen mit sich bringt.

Die elegante Möglichkeit antigenspezifische CD4+ T-Zellen direkt über die Expression von CD154, mit Hilfe der magnetischen Zellsortierung, wie sie von M. Frentsch und Kollegen für Birken Allergen, Cytomegalievirus und Tetanustoxin gezeigt wurde [Frentsch et al., 2005], anzureichern, konnte nicht genutzt werden. Denn auch für diese Methode, die gut bei Alloantigenen funktioniert, war die Frequenz der autoreaktiven myelinspezifischen CD4+ T-Zellen zu gering.

Im Verlauf von EAE lassen sich aus dem ZNS erkrankter Mäuse CD4+ und CD8+ Lymphozyten gewinnen, die vor allem Interferon- γ und TNF α produzieren. Ein Teil der CD4+ T-Zellen produziert kein Interferon- γ aber Interleukin-17 [Sonobe et al., 2007]. So lässt sich auch erklären, dass, wenn man diese Zellpopulationen mit Hilfe eines Zytokinsekretionsassay anreichert oder die *in vivo* eingewanderten Lymphozyten aus dem ZNS isoliert, die Frequenz der einwandernden Zellen stark ansteigt, absolut gesehen es jedoch immer noch zu wenig Zellen sind. Interessanter Weise zeigte sich jedoch, dass die Zellen in der Interferon- γ negativen Fraktion aus Lymphknoten und Milz funktionell inaktiv waren. In dieser Population waren niemals einwandernde Zellen zu beobachten, trotz durchflusszytometrisch vitalem Erscheinen, und ausreichender Anzahl pro Schnitt. Dies passt zu den Ergebnissen mit den naiven T-Zellen, denn gerade in der Interferon- γ negativen Fraktion müssten diese ruhenden T-Zellen zu finden sein. Andererseits müssten nach Immunisierung gerade in dieser Fraktion die Interleukin-17 produzierenden T-Zellen enthalten sein [Kroenke and Segal, 2007]. Müsste nicht gerade dieser T-Zellsubtyp einwandern?

4.1.1.2.2 Stimulierung mit Superantigen

Bei Staphylokokken Enterotoxin B handelt es sich um ein Superantigen, welches oligoklonal die Proliferation von naiven und Gedächtnis T-Zellen induziert. Es wird nicht erst als Peptid über MHC Moleküle präsentiert, sondern bindet direkt an MHC und T-Zellrezeptor [Janeway et al., 2007]. Nach Staphylokokken Enterotoxin B Stimulation wurde *in vitro* für Lymphozyten eine erhöhte Bereitschaft in Kollagengele einzuwandern beschrieben [Newman and Wilkinson, 1996].

In den vorliegenden Experimenten wurden die Milzzellen aus mit MOG immunisierten Mäusen für vier Stunden mit Staphylokokken Enterotoxin B inkubiert, diese Zellen zeigten zwar eine erhöhte Zytokinproduktion, aber keine migratorischen Fähigkeiten. Ob Staphylokokken Enterotoxin B stimulierte Zellen in Hirnschnittgewebe einwandern, könnte eine Frage der Dauer der Inkubation sein. Die polyklonal mit anti-CD3/anti-CD28 behandelten Zellen wurden über Nacht inkubiert, die mit Staphylokokken Enterotoxin B behandelten nur vier Stunden. Auch in den oben genannten Experimenten von Newman und Kollegen, zeigte sich der migrationsfördernde Effekt erst nach längerer Inkubation (Höhepunkt nach 48 Stunden).

4.1.1.2.3 Antigen unabhängig

4.1.1.2.3.1 Kostimulatorische Moleküle

Schon lange ist bekannt, dass T-Zellen nicht nur durch Aktivierung mit ihrem Antigen, sondern auch durch Aktivierung mit dem mitogenen Lektin Concavalin A [Panitch, 1980; Hickey et al., 1991] EAE auslösen können. Hierbei kommt es zu einer Stimulierung des CD3-Rezeptors der T-Zellen, der zusammen mit dem T-Zellrezeptor den T-Zellrezeptorkomplex bildet. Ganz deutlich war in den Kokulturrexperimenten zu erkennen, dass natürlich neben der Frequenz der vitalen Zellen in der Zellpopulation und dem Grad der Aktivierung durch das entsprechende Antigen auch kostimulatorische Signale über CD3/CD28 eine Rolle spielen. T-Zellen, die polyklonal über ihren T-Zellrezeptor direkt mit anti-CD3/anti-CD28 stimuliert wurden, wandern sehr gut bei den humanen und murinen Kokulturrexperimenten in das Hirngewebe ein [Siffrin et al., 2009]. Hierbei war es jedoch essentiell, dass die T-Zellen zusammen mit anderen mononukleären Zellen aus dem Vollblut inkubiert wurden. T-Zellen ohne Antigen präsentierende Zellen nur mit anti-CD3/anti-CD28 wurden nicht ausreichend aktiviert und wanderten nicht ein. Waren jedoch Antigen präsentierende Zellen anwesend, zeigten die auf diese Weise aktivierten T-Zellen ein ähnliches Verhalten wie die mit Antigen stimulierten T-Zellen. Die mittlere Geschwindigkeit ist in diesem experimentellen Ansatz gleich für CD4+ und CD8+ T-Zellen aus C75/BL6 Mäusen mit 0,06 µm/s.

4.1.1.2.3.2 PMA/Ionomycin

Durch eine Aktivierung mit Phorbol-12 Myristat-13 Acetat (PMA) zuvor immunisierter Mäuse kam es zu einer erhöhten Zytokinproduktion, die Lymphozyten waren jedoch nicht fähig, in das Hirngewebe einzuwandern.

PMA ist einer der wohl stärksten bekannten zellaktivierenden Substanzen. Durch Imitation des intrazellulären Diacylglycerols wird die Proteinkinase C [Berridge, 1993] aktiviert und NF-κB induziert [Iwasaki et al., 1992], der als DNA bindendes Protein auf die Promotorregion zahlreicher Gene wirkt. Über diese Wege initiiert PMA viele physiologische Aktivitäten der Zelle, ist aber dennoch wegen der Umgehung von G-Protein, Tyrosinkinasen und Phospholipasen assoziierten Wegen ein recht künstlicher Stimulus [Ruff et al., 1994]. Für PMA ist bekannt, dass es neben der Stimulation der Zytokinproduktion unter anderem das Wanderungsverhalten von konjunktivalen Fibroblasten oder Glioblastomzellen fördert [Nomura et al., 2007b; Nomura et al., 2007a]. In den Experimenten dieser Arbeit konnte jedoch

wie bei Astrid Hahner im Rahmen ihrer Untersuchungen mit humanen T-Zellen und humanen Hirnschnitten in unserer Arbeitsgruppe keine mit PMA/Ionomycin stimulierten Zellen beobachtet werden die einwandern. Astrid Hahner hat das Genexpressionsmuster verschiedener auf diesem Wege stimulierter T-Zellen mit durch antiCD3/antiCD28 über den T-Zellrezeptor aktivierten T-Zellen verglichen. Hierbei zeigte sich, dass mononukleäre Zellen aus Vollblut isoliert und mit PMA/Ionomycin stimuliert, zwar durchflusszytometrisch Aktivierungsmarker wie CD69 auf nahezu allen T-Zellen aufweisen, andererseits sich keine vermehrte Transkription wichtiger Moleküle für die Migration oder Effektorfunktion nachweisen ließen. Wurden die aus Vollblut isolierten mononukleären Zellen über den T-Zellrezeptor mit antiCD3/antiCD28 stimuliert zeigte sich zwar eine geringere CD69 Expression, jedoch wurden Moleküle wie ICAM-2, CD95L und TRAIL vermehrt gebildet (Astrid Hahner, nicht veröffentlichte Daten).

4.1.2 Wodurch wird die Ansammlung um die Gefäße beeinflusst?

Das Kokulturmodell bietet den Vorteil grundlegende Mechanismen ohne störende Faktoren gezielt zu untersuchen. So konnte die Bewegung von gut definierten unterschiedlichen T-Zellsubtypen unabhängig von Transmigration und Antigenerkennung oder Interaktion mit anderen Immunzellpopulationen gezeigt werden. Im Folgenden werden die unterschiedlichen Effektor-T-Zellsubtypen, Chemokinrezeptoren (insbesondere CXCR4 und CCR7) und Adhäsionsmoleküle im Zusammenhang mit dem gezeigten Bewegungsmuster diskutiert. Die Ansammlung von einwandernden Immunzellen in der unmittelbaren Nachbarschaft von zerebralen Gefäßen könnte ein aktiv durch Chemokine geförderter Prozess zur Kompartimentbildung im gesunden, sowie kranken Gehirn sein. Dies würde bedeuten, dass neben den anatomischen Begrenzungen des perivaskulären Raumes, der sich parallel zu schmalkalibrigen Gefäßen von den Virchow-Robin'schen Räumen und deren Fortsetzung zwischen dem Endothel und der *Membrana glia limitans superficialis* befindet, ein dynamischer durch Chemokine definierter Raum existiert. In diesem könnte die Ansammlung von Lymphozyten eine physiologische Rolle zur Überwachung des ZNS spielen [Hickey and Kimura, 1988; Smorodchenko et al., 2007]. Die Lymphozyten interagieren miteinander und mit lokalen Zellen, wie zum Beispiel im Zuge von Entzündung oder Immunregulation. Des weiteren ist die Interaktion von enzephalitogenen CD4+ T-Zellen mit dendritischen Zellen dort eine wichtige Möglichkeit zur Antigenerkennung im Rahmen der Immunantworten im ZNS [Greter et al., 2005].

4.1.2.1 Zytokinproduktion

4.1.2.1.1 Th-17 Zellen

In letzter Zeit treten an die Stelle der Interferon- γ produzierenden Zellen immer mehr T-Zellen, die Interleukin-17 produzieren, in den Vordergrund. Sie scheinen die gewebeschädigenden enzephalitogenen Zellen zu sein, und müssten hohe migratorische Fähigkeiten haben. Interferon- γ alleine kommt eher eine regulatorische Rolle zu [Becher et al., 2002; Langrish et al., 2005]. Zur Zeit der Experimente dieser Arbeit waren die Mechanismen, die zu einem so genannten Th17 Phänotyp führen noch nicht eindeutig beschrieben [Steinman, 2007]. Die alleinige Stimulation mit Antigen scheint für eine relevan-

te Interleukin-17 Produktion nicht auszureichen. Mit Hilfe eines Interleukin-17 Sekretionassays, der zur Zeit der Experimente noch nicht verfügbar war [Lexberg et al., 2008], könnte dies näher untersucht werden und direkt aus der Maus Interleukin-17 produzierende Zellen angereichert werden. Mittlerweile lassen sich auch CD4+ T-Zellen aus mit MOG immunisierten C57/BL6 Mäusen und anschließender Kultivierung *in vitro* mit anti-Interferon- γ , TGF- β , Interleukin-6 und Interleukin-23 zu Th-17 -Zellen prägen, so dass deren Verhalten im Kokulturmodell untersucht werden könnte. Zurzeit werden Experimente mit Interleukin-17 Reporter Mäusen in unserer Arbeitsgruppe geplant, um intravital das Verhalten dieses Zelltyps im zentralen Nervensystem bei inflammatorischen Prozessen zu untersuchen.

4.1.2.1.2 CXCR4

Lange Zeit wurden Chemokine als Mediatoren der Lymphozyten auf der Suche nach ihrem Ziel angesehen. Der Name leitet sich von chemisch-anziehenden Zytokinen ab. Sie verleiten Immunzellen dazu, anzuhalten, aus der Blutbahn auszutreten und in diverse Organe einzuwandern. Dies geschieht durch eine Integrin-vermittelte Zellanheftung auf dem Endothelium [Engelhardt and Ransohoff, 2005; Vajkoczy et al., 2001].

Der Chemokinrezeptor CXCR4 ist ein α -Chemokinrezeptor spezifisch für CXCL12 auch genannt SDF-1 (*Stromal cell derived factor-1*). CXCL12 ist ein während der Evolution hoch konserviertes Chemokin und scheint eines der „Urchemokine“ zu sein, welches konstitutiv in den meisten Geweben exprimiert wird [Nagasawa et al., 1994]. Bleul und Kollegen konnten als erste zeigen, dass CXCL12 eines der stärksten Chemokine mit Einfluss auf die T- und B-Zellwanderung ist [Bleul et al., 1996].

Die Expression von CXCR4 lässt sich schwer messen, da Chemokinrezeptoren nach Bindung mit ihrem Liganden schnell internalisiert werden [Fischer et al., 2008] und so nur der funktionelle Aspekt einen Aufschluss über die Wirkung von CXCL12 auf die unterschiedlichen T-Zellsubtypen gibt, wobei die Zwei Photonen Mikroskopie ein optimales Werkzeug ist, da die Dynamik der Wirkung des Chemokins in Blockadeexperimenten und transgenen Mausmodellen mit verfolgt werden kann. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit geben zusammen mit den intravitalen Daten aus unserer Arbeitsgruppe Hinweise darauf, dass sich die Ansammlung von CD4+ T-Zellen um zerebrale Gefäße in eine wachsende Zahl von CXCR4 abhängigen immunologischen Prozessen einreicht [Siffrin et al., 2009], wie unter anderem die B-Zellentwicklung [Egawa et al., 2001; Ma et al., 1998; Zou et al., 1998], T-Zellentwicklung [Ara et al., 2003; Plotkin et al., 2003], Eintritt der B-Zellen in den Lymphknoten [Okada et al., 2002], Plasmazelllokalisation [Hargreaves et al., 2001], Bildung der hellen und dunklen Zone der Keimzentren im Lymphknoten [Allen et al., 2004] und der Zielsuche neutrophiler Granulozyten zum Knochenmark [Martin et al., 2003]. Speziell für CD4+ T-Zellen konnte gezeigt werden, dass bei CD4+ Effektor- und Regulatorischen-T-Zellen isoliert aus infizierten Lungen [Debes et al., 2006] CXCL12 zu starken chemotaktischen Antworten führt. Dies deutet auf eine allgemeine Funktion von CXCR4 für CD4+ T-Zellen im Rahmen von Organ abhängiger Zellwanderung hin.

Die Interaktion von CXCR4 und CXCL12 ist ebenso wichtig für die neuronale Migration, Proliferation und Plastizität während der embryonalen und frühen postnatalen Entwicklung des ZNS [Klein and

Rubin, 2004]. CXCL12 wird im gesunden ZNS von Erwachsenen, sowie verstärkt in den Läsionen von Multiple Sklerose Patienten, exprimiert [Krumbholz et al., 2006].

Die Lokalisation von CXCL12 an den kleinen zerebralen Gefäßen vor allem an der basolateralen, d.h. der Parenchym zugewandten, Seite gibt einen weiteren Hinweis auf die Funktion der Ansammlung von CD4+ T-Zellen in diesem Bereich. Während inflammatorischer Prozesse, wie z.B. einer EAE, könnte das Ausmaß der Entzündung limitiert werden, indem die Lymphozyten perivaskulär gehalten werden und die intraparenchymatösen Mikrogliazellen durch sie nicht aktiviert werden [McCandless et al., 2006].

Dieses Szenario passt zu den Daten unserer Arbeitsgruppe. CXCR4 -/- knockout Leberchimären zeigten bei aktiver EAE mehr intraparenchymale Lymphozyten als der Wildtyp C57/BL6 mit einem invasiveren Wanderungsverhalten im ZNS [Siffrin et al., 2009].

Der andere wichtige homeostatische Chemokinrezeptor CCR7 ist analog unabdingbar für die korrekte Zielsuche der Lymphozyten zu den Lymphknoten und für das Wanderungsverhalten und die Kompartimentbildung intranodal. Diese Funktionen sind in Tieren mit mangelhaftem Liganden für diesen Rezeptor gestört, der reichlich in T-Zell relevanten Zonen von lymphatischen Organen exprimiert wird [Okada and Cyster, 2007; Worbs et al., 2007].

Folglich ist der ausschlaggebende Punkt für die intraparenchymale Chemokin vermittelte Wanderung von Lymphozyten das Einfangen der freien dynamischen Beweglichkeit innerhalb eines definierten Raumes, dem anscheinend anatomische Grenzen fehlen. Dieses Phänomen könnte die Kompartimentbildung als Konsequenz der Chemokinesis erklären. Die kombinierte Kontrolle der Beweglichkeit von Immunzellen wurde an *in vitro* Agarose Ansätzen für neutrophile Granulozyten gezeigt, die die grundlegenden Mechanismen von hierarchischen chemisch anziehenden Gradienten deutlich machten [Foxman et al., 1997]. Wenn durch Chemokine angezogene Zellen nah an die Quelle des Signalstoffes kommen, wird die Chemokinkonzentration das Sättigungsniveau des entsprechenden Rezeptors an einem Punkt überschreiten. Dies führt dann zur ‚Desorientierung‘, welches eine weitere gezielte Bewegung zum Signalstoff verhindert, aber sogleich die Möglichkeit auf einen neuen Stimulus zu reagieren bietet. Fehlt dieser wird die Bewegung der Zellen ungerichtet, aber in dieser Zone der gesättigten Chemokinkonzentration bleiben. Eine weitere Entfernung von dem Signalstoff würde die Sättigung des Rezeptors aufheben und hätte wieder eine gezielte Bewegung in Richtung des Signalstoffes zur Folge.

Die Daten dieser Arbeit zusammen mit den intravitalen Messungen im Hirnstamm von an EAE erkrankten Mäusen in unserer Arbeitsgruppe zeigen, dass das Verhalten von T-Zellen im Gehirn diesen Grundsätzen folgt [Siffrin et al., 2009]. Intravital findet sich hier eine Manschette aus T-Zellen um die zerebralen Gefäße. Nach Antagonisierung von CXCR4 mit AMD3100, lösen sich die Ansammlungen von T-Zellen um die Gefäße auf und sie zeigen eine gleichmäßige Verteilung der einwandernden Zellen im Parenchym und eine Auflösung der Manschetten aus T-Zellen um die Gefäße. Die beobachteten Gefäße sind in derselben Größenordnung (25-50µm) wie die Zellansammlungen um Gefäße bei klassischen Transmigrationsuntersuchungen mit histologischen Techniken [Uboldi et al., 2008].

Vergleichbare Bewegungsmuster wie im murinen Modell ließen sich in unserer Arbeitsgruppe in einem humanen Kokulturmodell darstellen. Hierbei wurden auf die von bei Epilepsieoperationen gewonnenen Hirnschnitte anti-CD3/anti-CD28 polyklonal stimulierte autologe CD4⁺ T-Zellen gegeben [Siffrin et al., 2009].

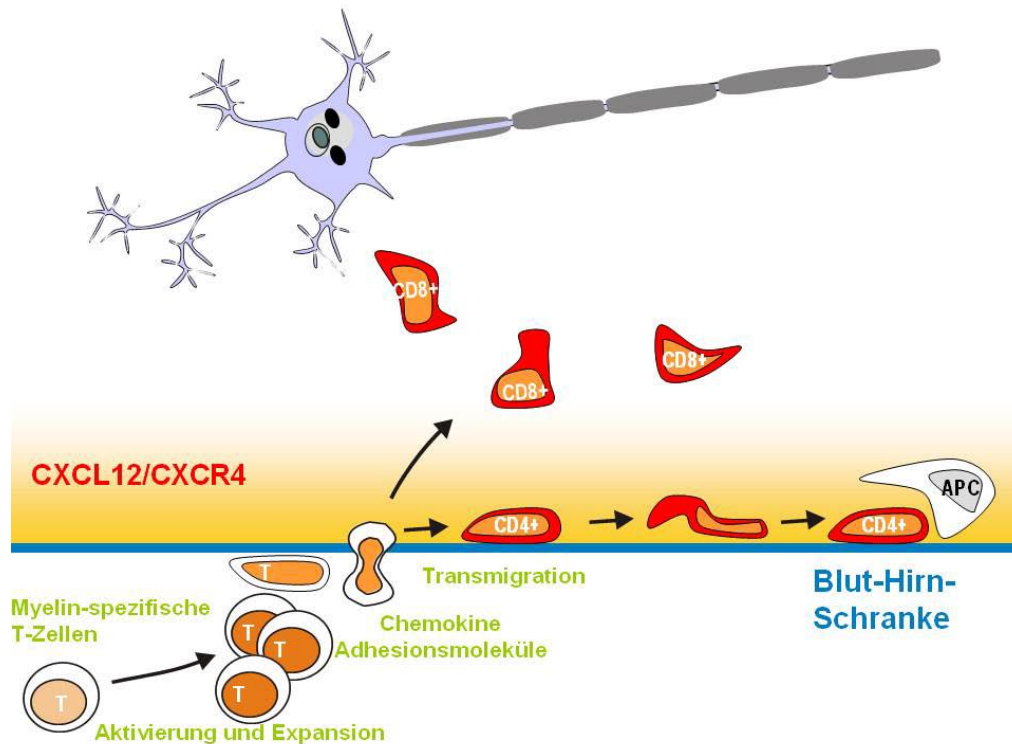


Abb. 28: Darstellung des Wanderungsverhaltens der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen. Durch CXCR4/CXCL12 werden die CD4⁺ T-Zellen vermehrt perivaskulär gehalten, die CD8⁺ T-Zellen wandern CXCL12 unabhängig (modifiziert nach [Zipp and Aktas, 2006]).

Kohler und Kollegen fanden hingegen bei Blockierung von CXCR4 durch ein synthetisches CXCL12 Analogon einen milderen Krankheitsverlauf in der aktiv ausgelösten EAE im SJL Mausstamm (durch PLP induziert), nicht jedoch im passiven Krankheitsmodell [Kohler et al., 2008]. Die Abmilderung des Krankheitsverlaufes widerspricht in erster Linie den *in vivo* Daten unserer Arbeitsgruppe und von McCandless und Kollegen. Dabei müssen jedoch die Unterschiede im experimentellen Aufbau, AMD3100 vs. synthetisches antagonistisches Peptid sowie PLP induzierte EAE in SJL Maus vs. MOG induzierter EAE in C57/BL6 Maus, bedacht werden. Diese führten eventuell dazu, dass bei Kohler die Behandlung mit dem synthetischen Peptid vor allem in der frühen Prägungsphase der enzephalitogenen Zellen eine Rolle zu spielen scheint und nicht in der Effektorphase im zentralen Nervensystem. Dafür spricht, dass zwar im aktiven EAE Modell, nicht jedoch beim passiven Transfer der Krankheitsverlauf abgemildert wurde. Dies könnte einerseits an einer unterschiedlichen Verteilung der blockenden Substanzen AMD3100 und dem CXCL12 Analogon liegen, oder dass das CXCL12 Analogon auch

eine Wirkung auf CXCR7 hat und AMD3100 nicht. Für AMD3100 aber noch nicht für das CXCL12 Analogon wurde gezeigt, dass es spezifisch für CXCR4 ist und nicht mit anderen Chemokinrezeptoren wie CXCR7, CXCR3 oder CCR7 interagiert [Fricker et al., 2006].

4.1.2.1.3 CCR7

Der oben erwähnte andere wichtige homöostatische Chemokinrezeptor ist CCR7. Sein Ligand ist CCL21. Dieses Paar ist essentiell für die sekundären lymphatischen Organe zur Zielsuche der Lymphozyten zu den Lymphknoten und für das Wanderungsverhalten und die intranodale Kompartimentbildung [Okada and Cyster, 2007; Worbs et al., 2007]. Im ZNS hat CCR7 nach den Ergebnissen unserer Arbeitsgruppe jedoch keinen Einfluss auf die Wanderungseigenschaften der T-Zellen. CD4+ CCR7-/- T-Zellen von transgenen Mäusen mit defizientem CCR7 Rezeptor zeigen eine unveränderte Geschwindigkeit und auch der Winkel zwischen Gefäß und Bewegungsvektor ist vergleichbar mit der Wildtyp Kontrolle [Siffrin et al., 2009].

4.1.2.1.4 VLA-4

VLA-4 wird auf T-Zellen exprimiert und kann wenn die Zelle aktiviert wird an seine Liganden Fibronectin und VCAM-1 binden. VLA-4 scheint ein essentieller Faktor für T-Zellen zu sein, um in das ZNS eindringen sowie für enzephalitogenen T-Zellen, EAE übertragen zu können. Die Blockade von VLA-4 durch einen neutralisierenden Antikörper reduziert in mehreren Mausmodellen der EAE die Anzahl der aktivierten T-Zellen, die das Gehirn erreichen [Keszthelyi et al., 1996; Yednock et al., 1992; Brocke et al., 1999]. Auch wenn schon T-Zellen das ZNS erreicht haben und der Krankheitsprozess fortgeschritten ist, hat anti-VLA-4 einen schützenden Effekt bei EAE und ebenso werden bei Patienten mit Multipler Sklerose die migratorischen Fähigkeiten der T-Zellen verringert [Niino et al., 2006] (siehe Kapitel 1.3.3).

In den Kokultorexperimenten ließ sich jedoch kein Unterschied des Bewegungsmusters der intraparenchymatösen CD4+ T-Zellen im ZNS nach Inkubation mit dem VLA-4 neutralisierenden Antikörper im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe beobachten. Da in diesem Experiment die T-Zellen nicht die Gefäßwand durchdringen müssen, scheint VLA-4 nur bei der Überwindung der Blut-Hirnschranke eine Rolle zu spielen. Bei der Migration innerhalb des Gewebes hingegen können sich die antigenaktivierten T-Zellen ungehindert bewegen. In den oben zitierten Arbeiten wird diskutiert, ob anti-VLA-4 auch einen Effekt auf den Aktivierungszustand der T-Zellen haben könnte. Die Ergebnisse der Kokultorexperimente sprechen nicht dafür, denn in ihrer Aktivität geminderte T-Zellen haben eine deutlich reduzierte Geschwindigkeit und wandern nur vereinzelt in die Hirnschnitte ein, wie die ersten Experimente mit MOG restimulierten T-Zellen zeigten. Der schützende Effekt von anti-VLA-4 scheint vor allem die Beeinflussung der sekundär einwandernden T-Zellen, die nach der Initiierung des Entzündungsprozesses im ZNS durch die enzephalitogenen T-Zellen, die vom Blut ins Gehirn übertreten, zu sein. Das würde bedeuten, dass ein Großteil des klinischen Schadens und der Demyelinisierung nicht durch die enzephalitogenen T-Zellen an sich, sondern durch die sekundäre immunologische Antwort entsteht und nicht durch die Wanderungseigenschaften von den T-Zellen, die bereits im Gehirn sind.

Auch im Lymphknoten scheinen in Abwesenheit von Scherkräften Chemokine zur Migration aber nicht zum Stoppen und Adhäsion der Lymphozyten zu führen, anders als in Gefäßen während des Transmigrationprozesses [Woolf et al., 2007].

4.1.2.1.5 LFA-1

LFA-1 (Leukozyten Funktionsassoziiertes Molekül-1) ist ein weiteres Adhäsionsmolekül aus der Familie der Integrine, welches mit ICAM-1 (Interzelluläres Adhäsionsmolekül-1) interagiert. Die Datenlage bezüglich des Effekts von LFA-1 ist kontrovers, transgene Tiere und Studien mit Neutralisierung von LFA-1 oder ICAM-1 kamen nicht zu eindeutigen Ergebnissen. Einerseits wird durch die Bindung von LFA-1 und ICAM-1 die T-Zelle aktiviert und für den Durchtritt durch die Gefäßwand vorbereitet [Bullard et al., 2007; Welsh et al., 1993; Kobayashi et al., 1995; Samoilova et al., 1998] andererseits spielt LFA-1 eine wichtige Rolle in der Bildung der immunologischen Synapse [Dustin, 2002].

Arbeiten von Josephine Herz aus unserer Arbeitsgruppe zeigten, dass CD4⁺ T-Zellen aus C57/BL6 Mäusen, die so genetisch verändert waren, dass sie kein LFA-1 exprimierten, ein unverändertes Wanderungsmuster in Kokulturrexperimenten hatten. Der Winkel und die mittlere Geschwindigkeit waren bei den CD4⁺ T-Zellen unverändert im Vergleich zur Kontrollgruppe. Bei diesen Experimenten wurden die T-Zellen polyklonal mit anti-CD3/anti-CD28 für drei bis sieben Tage stimuliert [Siffrin et al., 2009]. Dies verdeutlicht, dass die Kompartimentbildung ein Prozess bei der Immunantwort ist, der zwischen Transmigration der Lymphozyten aus den Blutgefäßen in das ZNS Parenchym und der Bildung der immunologischen Synapse statt findet.

4.1.2.1.6 Antigenerkennung

Hickey und Kollegen demonstrierten, dass aktivierte T-Zellen für mindestens 12 Stunden nach i.v. Injektion im zentralen Nervensystem nachweisbar sind, unabhängig von MHC oder Antigenpezifität. Danach bleiben nur antigenspezifische T-Zellen im zentralen Nervensystem nachweisbar [Hickey et al., 1991].

Nitsch und Kollegen zeigten, dass weder MHC Unstimmigkeiten (H-2^u vs. H-2^s) noch Antigenpezifität (OVA vs. PLP) einen Einfluss auf die Verteilung von T-Zellen im ZNS Parenchym im Kokulturmodell haben [Nitsch et al., 2004]. Die vorliegenden Experimente ergänzen dies dahingehend, dass alle aktivierten CD4⁺T-Zellen die gleiche Zielsuche mit Ansammlung um die Gefäße auch unabhängig vom Zytokinprofil und Antigenerkennung (MOG vs. OVA) zeigen.

Da die MHC-II Expression in nicht entzündlichen ZNS Gewebe vernachlässigbar gering ist, kann in dem Kokulturmodell die Antigenpräsentation für CD4⁺ T-Zellen keine große Rolle spielen. Die Situation in den Hirnschnitten ähnelt traumatischen mechanischen Hirnläsionen *in vivo*, bei denen Bechmann und Kollegen zeigten, dass MHC-II Hochregulierung und das Erscheinen von T-Zellen im ZNS Parenchym sehr begrenzt sind [Bechmann et al., 2001]. Anders ist es, wenn die Hirnschnitte von Gehirnen aus an EAE erkrankten Mäusen gewonnen werden: Hier zeigten Odoardi und Kollegen, dass die T-Zellen bei Antigenerkennung ihr Bewegungsmuster dahingehend ändern, dass sie ihre Geschwindigkeit drosseln [Odoardi et al., 2007].

In den intravitralen Experimenten unserer Arbeitsgruppe konnten charakteristische, vom Krankheitszeitpunkt abhängige Zellbewegungen beobachtet werden [Siffrin et al., 2009]. Zu Beginn der klinischen Krankheitszeichen, sobald die Lymphozyten im ZNS erschienen, wurden hoch dynamische Zellwanderungen entlang der äußeren Gefäßwände mit charakteristischem Auf- und Ab-Bewegungen beobachtet. Dieses abtastende Verhalten führte zu kurzen Interaktionen mit anderen Zellen, manchmal mit typischem Stoppen und erneuter Bewegungsinitierung, welches in den Kokulturrexperimenten dieser Arbeit nicht beobachtet wurde. Dies könnte an einer fehlenden Antigenerkennung in der Kokultur liegen, da nichtentzündliche Hirnschnitte verwendet wurden. In einer *ex vivo* Hirnschnittstudie, mit inflammatorischen Hirnschnitten bewegten sich MBP-spezifische enzephalitogene CD4⁺ T-Zellen langsamer als in den Experimenten der vorliegenden Arbeit, dies wurde als lokale Antigenreaktivierung dieser Zellen interpretiert [Kawakami et al., 2005]. Bei Mäusen mit weit fortgeschrittener EAE konnten intravital in unserer Arbeitsgruppe große Zellinfiltrate im Gehirn mit den charakteristischen Manschetten um die Gefäße beobachtet werden. Die Zellen waren in sich aktiv in einer Art und Weise, die an T-Zellen erinnert, die in Lymphknoten beobachtet wurden, [Mempel et al., 2004; Miller et al., 2002]. Diese ersten Berichte über immunologische Zwei Photonen Experimente beschrieben ein charakteristisches Ausschwärmen und ein zusammenkommendes Bewegungsmuster der Lymphozyten, welches mit der Funktion der entsprechenden Zelle verbunden war, wie für Antigenerkennung und regulatorische Prozesse im Lymphknoten gezeigt [Hugues et al., 2004; Tadokoro et al., 2006; Tang et al., 2006].

So könnte die Kompartimentbildung wie sie in unseren organotypischen Hirnschnitten beobachtet wird als Ereignis, welches vor der Antigenerkennung steht, eingeordnet werden. Die Kompartimentalisierung ist damit unabhängig von der Antigenerkennung und könnte die Wahrscheinlichkeit erhöhen, dass die CD4⁺ T-Zellen eine MHC-II exprimierende Zelle im gesunden oder kranken zentralen Nervensystem trifft. Daher verhalten sich ZNS-antigenspezifische und nicht ZNS-antigenspezifische CD4⁺ T-Zellen gleich, was die Kompartimentbildung angeht. Dieser Schritt führt zur Persistenz von ZNS Antigen spezifischen T-Zellen im ZNS, was jedoch im Kokulturmodell nicht untersuchbar ist, da ein unversehrtes Blutgefäßsystem dazu unumgänglich ist. Dies wurde in den *in vivo* Ansätzen in unserer Arbeitsgruppe gezeigt [Siffrin et al., 2009].

Diese Zusammenhänge unterstützen die Idee, dass Stimulierung von T-Zellen durch Antigen im Zielorgan ähnlich abläuft wie in den sekundären lymphatischen Organen, mit den gleichen Konsequenzen und voller Spannweite der immunologischen Antwort von Toleranz bis Autoimmunität. Antigenerkennung im perivaskulären Raum scheint eine wichtige Funktion CXCR4 abhängiger Prozesse im gesunden wie im kranken ZNS zu sein und führt zur Frage der therapeutischen Bedeutung (siehe Kapitel 4.2).

4.1.2.2 CD8⁺ T-Zellen

Über das Wanderungsverhalten und die Orientierungshilfen von CD8⁺ T-Zellen zum Gehirn und im Gehirn ist wenig bekannt [Ransohoff et al., 2003]. Die Daten aus den Kokulturrexperimenten sind somit die erste Beschreibung des Bewegungsmusters von CD8⁺ T-Zellen im ZNS im Vergleich mit CD4⁺ T-

Zellen. Die CD8⁺ T-Zellen bewegen sich in den Hirnschnitten unabhängig von den Gefäßen. Sie zeigen ein ähnliches Bewegungsmuster wie intravital mit Hilfe der Zwei Photonen Mikroskopie im Lymphknoten beschrieben [Miller et al., 2002; Mempel et al., 2004]. In den intravitalem Messungen unserer Arbeitsgruppe konnte bisher nicht zwischen CD4⁺ und CD8⁺ Lymphozyten unterschieden werden, da Wildtypmäusen das Knochenmark aus transgenen Mäusen für das grüne Fluorophor gespritzt wurde [Siffrin et al., 2009]. Daher lässt sich bisher nur im Hirnschnitt das Wanderungsverhalten getrennt beurteilen. Ansätze mit unterschiedlich farblich markierten CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen für *in vivo* Experimente werden jedoch zurzeit in unserer Arbeitsgruppe weiterentwickelt.

Die Rolle der CD8⁺ T-Zellen bei der Multiplen Sklerose und ihrem Modell der EAE ist weitgehend unklar. Auch wenn Sun und Kollegen zeigten, dass EAE allein durch CD8⁺ T-Zellen ausgelöst werden kann [Sun et al., 2001], ist die vorherrschende Meinung doch eher dahingehend, dass die Erkrankung durch CD4⁺ T-Zellen vermittelt wird und CD8⁺ T-Zellen nach Initiierung der Entzündungskaskade im zentralen Nervensystem eher regulatorisch wirken [Gold et al., 2006; Friese and Fugger, 2005]. Während bei Multipler Sklerose durchaus eine aktive Beteiligung der CD8⁺ T-Zellen bei der neuronalen Schädigung und der Myelinscheiden angenommen wird [Babbe et al., 2000].

Die meisten Erkenntnisse zu dem Wanderungsverhalten von CD8⁺ T-Zellen im Hirnparenchym gibt es aus der virologischen und onkologischen Forschung, jedoch wurden bisher keine einzelne Zellen im Gehirn verfolgt, sondern nur histologische Daten gewonnen, die Fluoreszenz der Tumore *in vivo* gemessen oder in Zellkulturansätzen *in vitro* die Bewegung von CD8⁺ untersucht. Daher sind die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit ein wichtiger erster Schritt zum besseren Verständnis des fein abgestimmten Zusammenspiels von Immunzellen und Nervensystem.

In den intravitalem Untersuchungen im Lymphknoten und in den Kokultorexperimenten dieser Arbeit wurden Ovalbumin spezifische T-Zellen untersucht. Interessant wäre, wie sich myelinspezifische CD8⁺ T-Zellen im Gehirn verhalten, auch im Zusammenhang mit anderen Immun- und ZNS-Zellen. Mit einem entsprechenden transgenen Maus-Chimären Modell wäre dies *in vivo* realisierbar, auch wenn die Experimente im lebenden Tier sehr komplex sind. Die histologischen Untersuchungen von Müller und Kollegen zeigten bei der EAE ein unterschiedliches Verteilungsmuster der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen [Muller et al., 2007], ebenso wie in den Kokultorexperimenten dieser Arbeit mit nicht ZNS-Antigen spezifischen T-Zellen. Dies spricht dafür, dass es ein generell unterschiedliches Verhalten von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen gibt, welches Antigen unabhängig ist. Die Zellverfolgungen der vorliegenden Arbeit sprechen dafür, dass der histologisch beobachtete Unterschied aufgrund eines im Gegensatz zu den CD4⁺ T-Zellen in einem CXCR4 unabhängig Bewegungsverhalten der CD8⁺ T-Zellen im Hirnparenchym begründet sein kann.

Fraglich ist, wie die hohe Bewegungsaktivität und die Orientierung der CD8⁺ T-Zellen gesteuert werden. Ist es eine intrinsische Eigenschaft dieses Zelltyps oder ein Chemokin gesteuerter Prozess? Ließe sich die intraparenchymale Beweglichkeit der CD8⁺ T-Zellen durch die Blockade eines anderen Chemokinrezeptors, wie z. B. CXCR3, einschränken? Im Lymphknoten ist das ungerichtete Bewegungsmuster ein häufig beobachtetes Merkmal von verschiedenen Zellpopulationen. Dieses anschei-

nend ungerichtete Bewegungsmuster ist im Lymphknoten jedoch gebahnt durch fibroblastische Retikulumzellen, die ein dichtes Netzwerk in sekundären lymphatischen Organen bilden und überzogen sind mit Chemokinen [Bajenoff et al., 2008]. Eine mit den fibroblastischen Retikulumzellen vergleichbare Struktur ist im Zentralnervensystem jedoch bisher nicht bekannt, jedoch zeigen die aktivierten CD8+ T-Zellen in den Experimenten dieser Arbeit ein ähnliches Bewegungsmuster, wie Zellen im Lymphknoten, so dass man annehmen kann, dass eine stromale Struktur mit ähnlicher Funktion wie die fibroblastischen Retikulumzellen existiert. Bei einer Virus vermittelten entzündlichen Erkrankung des Gehirns bei der Maus konnten McCandless und Kollegen histologisch eine massivere Infiltration von CD8+ T-Zellen mit zeigen. Dies scheint vor allem auf die Beeinflussung der Transmigration zurückzuführen zu sein, da nach den Daten der Experimente dieser Arbeit durch Umgehung der Blut-Hirn-Schranke, die CD8+ T-Zellen keine Ansammlung perivaskulär zeigen [McCandless et al., 2008b].

Dass CD8+ T-Zellen nicht durch CXCR4 gefäßnah gehalten werden, könnte man damit erklären, dass für diesen T-Zelltyp eine Antigenerkennung im ZNS Parenchym besser möglich ist als für die CD4+ T-Zellen, die auf die Antigen präsentierenden Zellen mit MHC Molekülen der Klasse II angewiesen sind, während die CD8+ T-Zellen mit den von jeder Körperzelle exprimierten MHC Klasse I Molekülen interagieren (siehe 1.1.2.1). Daher wäre eine Chemokin gesteuerte Kompartimentbildung um die Gefäße für diese Zellen nicht von so großer Bedeutung.

4.2 Therapeutische Konsequenzen

Aufgrund der weit gefächerten Funktionen des Chemokinrezeptor Paares CXCL12/CXCR4 ist der Effekt, der durch die Blockade von CXCR4 erreicht wird, nicht nur auf das Immunsystem begrenzt. Mehrere Fachrichtungen erwähnen eine klinische Anwendung der CXCR4 Blockade. Außer der anti-retroviralen Therapie soll es bei der Transplantationsmedizin, vaskulären und hämato-onkologischen Erkrankungen eingesetzt werden.

4.2.1 antiretroviral

AMD3100 wurde zur Blockierung des Eindringens von CXCR4 benutzenden HIV-Stämmen entwickelt [De Clercq, 2005]. Einige Autoren plädieren für eine Therapie mit AMD3100 auch bei HIV-Stämmen die noch nicht CXCR4 abhängig die T-Zellen infizieren um den Selektionsdruck zu erhöhen, da gerade diese HIV Varianten pathogener sind und mit dem schnellen Verlust der CD4+ T-Zellen und der Entwicklung von AIDS verbunden seien [De Clercq, 2000; Este et al., 1999]. Dabei sollte die oben beschriebenen Effekte im ZNS mit bedacht werden, denn aufgrund einer eventuellen Störung der normalen Blut-Hirn-Schrankenregulation muss mit einem vermehrten Eindringen von Leukozyten in das ZNS-Parenchym und der Förderung der Einwanderung von HIV infizierten Makrophagen gerechnet werden.

4.2.2 hämato- onkologisch und kardiologisch

Bei einer Therapie mit AMD3100 um einen intrazerebralen Tumor, wie zum Beispiel ein Glioblastom zu bekämpfen, können gerade die oben beschriebenen Folgen der Blockierung von CXCR4 förderlich sein. Der Tumor wird durch die Aktivierung des Abwehrsystems im ZNS in seinem Wachstum eingeschränkt. Bei einigen Tumoren gibt es Hinweise, dass die Invasion und Metastasierung unter anderem über den CXCR4/CXCL12 Signalweg geleitet wird, so dass eine Blockade hier therapeutisch sinnvoll sein könnte [Muller et al., 2001; Taichman et al., 2002]. Bei multiplem Myelom oder Leukämie kann die schnelle Stammzellmobilisierung von hämatopoetischen Stammzellen durch AMD3100 genutzt werden [Liles et al., 2003].

Es wird eine therapeutische Blockade von CXCR4 bei der Herzinsuffizienz diskutiert, da die Aktivierung von CXCR4 direkt negativ inotrop am Herzen wirkt zusätzlich zur pro-inflammatorischen Komponente [Pyo et al., 2006]. Andererseits konnte am Herzen gezeigt werden, dass CXCL12 die Mobilisierung von Stammzellen in geschädigtes Gewebe bewirkt, und so zum Beispiel eine Regeneration von durch Ischämie bedingtem Gewebeschaden im Herzen fördern könnte [Askari et al., 2003].

4.2.3 Entzündliche Erkrankungen des ZNS

Bei chronisch entzündlichen ZNS Erkrankungen wie der Multiplen Sklerose ist eine vollständige therapeutische Kontrolle der Erkrankung und die Reparatur des durch sie entstandenen Schadens zurzeit noch nicht möglich. Die aktuellen Therapieansätze haben eine Reduktion von Immunzellen, vor allem autoaggressiver T-Zellen im ZNS zum Ziel. Daher ist zu diskutieren, ob eine Blockade von CXCR4 als Eingriff in die Mobilität der T-Zellen ein neuer therapeutischer Ansatz wäre, um so die Zellen von ihren Zielzellen fernzuhalten und dadurch ihre Funktion zu blockieren. Zusätzlich könnte eine CXCR4 Blockade im Zusammenhang mit einer myeloablativen Therapie bei der Multiplen Sklerose sinnvoll sein, da bekannt ist, dass langlebige Plasmazellen durch CXCL12 ins Knochenmark geleitet werden, diese Zellen sind für chronische Autoimmunerkrankungen von zentraler Bedeutung, da sie im Gegensatz zu den T-Zellen mit den gängigen Therapeutika im Knochenmark nicht zu beeinflussen sind und vor der klinisch apparenten Erkrankung gebildet werden [Hoyer et al., 2008].

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten, dass unabhängig der Rolle von CXCR4 bei der Transmigration von Immunzellen durch die Blut-Hirn-Schranke ein über die Interaktion von CXCL12 und CXCR4 vermittelter Signalweg die Ursache für das unterschiedliche Verhalten antigenunabhängig von CD4+ und CD8+ T-Zellen im ZNS ist. Der perivaskuläre Raum in dem sich die CD4+ T-Zellen ansammeln ist ein Ort der Entzündungsinitiation, wo die T-Zellen auf lokale Antigen präsentierende Zellen treffen und autoaggressive T-Zellen reaktiviert werden können. Andererseits ist es auch ein Ort der Immunregulation, so dass der therapeutische Nutzen und die potentiellen Risiken einer CXCR4 Blockade abgewogen werden müssen. Dies sollte im Zusammenhang mit den Hinweisen für eine proinflammatorische und antiinflammatorische Wirkung der CXCR4 Blockade im ZNS und auch in der Peripherie geschehen. Dabei ist es wichtig, dass das Tiermodell der EAE zwar viele Gemeinsamkeiten mit der Multiplen

Sklerose hat, aber dennoch Unterschiede bestehen und so vor allem auch Informationen, die man über die Wirkung von CXCL12 beim Menschen hat, mit berücksichtigt werden müssen.

Im Folgenden werden die Hinweise für eine pro- und anti-inflammatorische Wirkung einer CXCR4 Blockade im ZNS im Hinblick auf eine mögliche Therapie entzündlicher ZNS-Erkrankungen insbesondere der Multiplen Sklerose diskutiert.

Für eine antiinflammatorische Wirkung spricht, dass man bei der Maus eine Verbesserung des Krankheitsverlaufes der EAE durch einen anderen Stammzellmobilisator, den Granulozyten-Kolonie stimulierenden Faktor, genannt G-CSF fand [Zavala et al., 2002]. Dies war mit einer anti-inflammatorischen Veränderung und Th2 typischen Zytokinen verbunden, so dass man die Beteiligung von regulatorischen Lymphozyten vermutete. Dies wurde durch die Daten von Zou und Kollegen bestärkt, die zeigen konnten, dass G-CSF die CXCL12 Expression in humanem Knochenmark runter reguliert, was zu einem Freilassen von CD4+CD25+ regulatorischen T-Zellen führt, die dort anscheinend über den CXCL12/CXCR4 Signalweg gehalten wurden [Zou et al., 2004]. Mittlerweile laufen Pilotstudien mit einem humanen anti-G-CSF-Antikörper bei Multipler Sklerose.

Weiter spricht für eine antiinflammatorische Wirkung, dass bei anderen autoimmunen Erkrankungen und ihren Modellen die Blockade von CXCR4 mit AMD3100 sich zum Beispiel im Mausmodell der rheumatoiden Arthritis und des Asthmas deutlich die Krankheitsverläufe bessern [Matthys et al., 2001; Gonzalo et al., 2000]. Im gesunden Zustand wird in diesen Geweben relativ gering CXCL12 exprimiert. Die während der Entzündungsreaktion auftretenden hohen Spiegel an CXCL12 und die Reduzierung der Symptome durch die Blockade von CXCR4 mit konsekutiver Verringerung der Expression von Th1 typischen Zytokinen vor Ort spricht dafür, dass hier CXCL12 an sich eine proinflammatorische Wirkung hat und so die Blockade anti-inflammatorisch wirken kann.

Auch an der luminalen Seite der Gefäße im ZNS wird normalerweise kaum CXCL12 exprimiert, im Gegensatz zu Gefäßen im ZNS von Multiple Sklerose Patienten [McCandless et al., 2008a], dies ließe eine anti-inflammatorische Wirkungsweise einer CXCR4 Blockade bei Patienten mit Multipler Sklerose vermuten. Zusätzlich konnten Köhler und Kollegen in der Maus zeigen, dass die Antagonisierung von CXCL12 mittels eines kleinen synthetischen Analogons die Prägung von enzephalitogenen Zellen vermindert und so der Krankheitsverlauf abgemildert wird [Kohler et al., 2008].

Aus den oben genannten Daten von McCandless und Köhler kann man schlussfolgern, dass eine therapeutische CXCR4 Blockade vor allem peripher wirken sollte und nicht wie zum Beispiel AMD3100 auch im ZNS jenseits der Bluthirnschranke. Anders als an der luminalen Seite der Gefäße wird im ZNS im Normalzustand CXCL12 relativ stark exprimiert, vor allem an der basolateralen Seite der Gefäße. Dies kann darauf hindeuten, dass dieses Chemokin im gesunden ZNS perivaskulär eher eine anti-inflammatorische Wirkung besitzen könnte und somit die Blockade proinflammatorisch. Bei einer aktiv induzierten EAE konnten McCandless und Kollegen bei der Blockade von CXCR4 durch AMD3100 anders als Köhler und Kollegen bei der Blockade durch ein synthetisches CXCL12 Analogon einen schwereren Krankheitsverlauf beobachten. Die Blockade von CXCR4 wirkte insgesamt proinflammatorisch [McCandless et al., 2006]. Meiron und Kollegen konnten durch Neutralisierung von

CXCL12 zeigen, dass CXCL12 über CXCR4 die Polarisierung von Th1-Zellen zu antigen spezifischen regulatorischen T-Zellen bewirkt [Meiron et al., 2008]. Beide Gruppen beschreiben eine Verschlimmerung des Krankheitsverlaufes bei Blockade von CXCR4 oder Neutralisierung von CXCL12, so dass die Blockade des CXCL12/CXCR4 Signalweges auch eine pro-inflammatorische Rolle zu spielen scheint.

McCandless und Kollegen fanden, neben dem klinisch schlimmeren Krankheitsverlauf durch die chronische Gabe von AMD3100 bei mit MOG immunisierten Mäusen auch eine stärkere Demyelinisierung und Entzündungsreaktion. Während es normalerweise bei Multipler Sklerose und EAE zu Ansammlungen von Lymphozyten um die Gefäße und umschriebener Demyelinisierung kommt, waren bei den an EAE erkrankten Tieren, die mit AMD3100 behandelt wurden ausgedehnte Infiltrate in der weißen Substanz mit Schädigung der Myelinschichten beobachtet worden. Das würde erklären, warum die mit AMD3100 behandelten an EAE erkrankten Mäuse im Rückenmark vermehrt Zytokine und Chemokine wie zum Beispiel Interferon- γ und TNF α exprimieren, welche Mikroglia aktivieren, sowie einen reduzierten Spiegel an Interleukin-10 aufweisen [McCandless et al., 2006].

Die verstärkte Expression von CXCL12 in Multiple Sklerose Läsionen im ZNS muss daher kein den Entzündungsprozess fördernder oder verursachender Effekt sein, sondern im Hinblick auf unsere Ergebnisse und die von McCandless und Kollegen vielleicht vielmehr ein Versuch des Organismus, den autoimmunologischen Prozess zu limitieren, indem CD4⁺ autoaggressive T-Zellen perivaskulär gehalten werden [McCandless et al., 2006; Siffrin et al., 2009] und daher die Blockade von CXCR4 im ZNS pro-inflammatorisch wirkt.

Alle in Mäusen durch AMD3100 gewonnen Erkenntnisse müssen jedoch dahingehend mit Vorsicht betrachtet werden, dass dieses Molekül für die spezifische Wirkung an humanen CXCR4 entwickelt wurde. Wie eingangs erwähnt, ist CXCR4 ein hoch konserviertes Molekül, welches beim Menschen, bei Primaten, Katzen und bei den Nagetieren die gleichen zwei Aspartat Reste in der Interphase zwischen den transmembranösen Domänen und der extrazellulären Region aufweist, woran AMD3100 bindet [Hatse et al., 2002]. Aber die Wirkung von AMD3100 auf andere murine Chemokinrezeptoren oder gar Rezeptoren anderer Familien wurde noch nicht ausreichend untersucht, um dies auszuschließen. In unserer Arbeitsgruppe wurden transgene Mausmodelle entwickelt, um die eventuelle unspezifische Bindung von AMD3100 *in vivo* zu umgehen und die oben beschriebenen Effekte von CXCR4 im Rahmen von Entzündungsreaktionen im ZNS zu untersuchen. Die fetalen Leberchimären, die defizient für CXCR4 waren, konnten die Daten der AMD3100 Experimente bestätigen und zeigten ebenfalls einen schlimmeren Krankheitsverlauf in der EAE und eine massive Infiltration von T-Zellen in das Parenchym des ZNS [Siffrin et al., 2009].

Zusammenfassend scheint bei der Multiplen Sklerose eine therapeutische CXCR4 Blockade als Schubprophylaxe nach dem heutigen Erkenntnisstand nicht sinnvoll so lange nicht eine selektive periphere Blockade erzielt werden kann auf Grund der beobachteten pro-inflammatorischen Effekte der Blockade im ZNS im Mausmodell der Erkrankung.

Literaturverzeichnis

- Aggarwal,S., Ghilardi,N., Xie,M.H., de Sauvage,F.J., and Gurney,A.L. (2003). Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17. *J Biol Chem.* 278, 1910-1914.
- Allen,C.D.C., Ansel,K.M., Low,C., Lesley,R., Tamamura,H., Fujii,N., and Cyster,J.G. (2004). Germinal center dark and light zone organization is mediated by CXCR4 and CXCR5. *Nature Immunology* 5, 943-952.
- Anderson,A.C., Nicholson,L.B., Legge,K.L., Turchin,V., Zaghouani,H., and Kuchroo,V.K. (2000). High frequency of autoreactive myelin proteolipid protein-specific T cells in the periphery of naive mice: mechanisms of selection of the self-reactive repertoire. *J. Exp. Med.* 191, 761-770.
- Ara,T., Itoi,M., Kawabata,K., Egawa,T., Tokoyoda,K., Sugiyama,T., Fujii,N., Amagai,T., and Nagasawa,T. (2003). A role of CXC chemokine ligand 12/stromal cell-derived factor-1/pre-B cell growth stimulating factor and its receptor CXCR4 in fetal and adult T cell development in vivo. *Journal of Immunology* 170, 4649-4655.
- Askari,A.T., Unzek,S., Popovic,Z.B., Goldman,C.K., Forudi,F., Kiedrowski,M., Rovner,A., Ellis,S.G., Thomas,J.D., DiCorleto,P.E., Topol,E.J., and Penn,M.S. (2003). Effect of stromal-cell-derived factor 1 on stem-cell homing and tissue regeneration in ischaemic cardiomyopathy. *Lancet* 362, 697-703.
- Assenmacher,M., Schmitz,J., and Radbruch,A. (1994). 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.* 24, 1097-1101.
- Babbe,H., Roers,A., Waisman,A., Lassmann,H., Goebels,N., Hohlfeld,R., Friese,M., Schroder,R., Deckert,M., Schmidt,S., Ravid,R., and Rajewsky,K. (2000). 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. *Journal of Experimental Medicine* 192, 393-404.
- Bajenoff,M., Glaichenhaus,N., and Germain,R.N. (2008). Fibroblastic reticular cells guide T lymphocyte entry into and migration within the splenic T cell zone. *Journal of Immunology* 181, 3947-3954.
- Barnden,M.J., Allison,J., Heath,W.R., and Carbone,F.R. (1998). 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.* 76, 34-40.
- Baumann,S., Krueger,A., Kirchhoff,S., and Krammer,P.H. (2002). Regulation of T cell apoptosis during the immune response. *Curr. Mol. Med.* 2, 257-272.
- Becher,B., Durell,B.G., and Noelle,R.J. (2002). Experimental autoimmune encephalitis and inflammation in the absence of interleukin-12. *Journal of Clinical Investigation* 110, 493-497.
- Bechmann,I., Peter,S., Beyer,M., Gimsa,U., and Nitsch,R. (2001). Presence of B7-2 (CD86) and lack of B7-1 (CD80) on myelin phagocytosing MHC-II-positive rat microglia is associated with nondestructive immunity in vivo. *FASEB J.* 15, 1086-1088.
- Berridge,M.J. (1993). Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature* 361, 315-325.
- Bleifuß, E. Einsatz eines aus den Oberflächenproteinen des Hepatitis B-Virus abgeleiteten Zellpermeabilitätsmotives für den Antigentransfer und für die Induktion einer CD8+ T-Zellantwort. 14-1-2004
- Bleul,C.C., Fuhlbrigge,R.C., Casasnovas,J.M., Aiuti,A., and Springer,T.A. (1996). A highly efficacious lymphocyte chemoattractant, stromal cell-derived factor 1 (SDF-1). *Journal of Experimental Medicine* 184, 1101-1109.

- Boulanger,L.M. and Shatz,C.J. (2004). Immune signalling in neural development, synaptic plasticity and disease. *Nat Rev Neurosci* 5, 521-531.
- Brabb,T., von Dassow,P., Ordonez,N., Schnabel,B., Duke,B., and Goverman,J. (2000). In situ tolerance within the central nervous system as a mechanism for preventing autoimmunity. *J. Exp. Med.* 192, 871-880.
- Bradley,L.M., Watson,S.R., and Swain,S.L. (1994). Entry of naive CD4 T cells into peripheral lymph nodes requires L-selectin. *J. Exp. Med* 180, 2401-2406.
- Brocke,S., Piercy,C., Steinman,L., Weissman,I.L., and Veromaa,T. (1999). Antibodies to CD44 and integrin alpha4, but not L-selectin, prevent central nervous system inflammation and experimental encephalomyelitis by blocking secondary leukocyte recruitment. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 96, 6896-6901.
- Brosterhus,H., Brings,S., Leyendeckers,H., Manz,R.A., Miltenyi,S., Radbruch,A., Assenmacher,M., and Schmitz,J. (1999). Enrichment and detection of live antigen-specific CD4(+) and CD8(+) T cells based on cytokine secretion. *Eur. J. Immunol.* 29, 4053-4059.
- Bullard,D.C., Hu,X., Schoeb,T.R., Collins,R.G., Beaudet,A.L., and Barnum,S.R. (2007). Intercellular adhesion molecule-1 expression is required on multiple cell types for the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol.* 178, 851-857.
- Butcher,E.C. and Picker,L.J. (1996). Lymphocyte homing and homeostasis. *Science* 272, 60-66.
- Carswell R. (1838). *Pathological anatomy: illustrations of the elementary forms of disease.*, Longman, ed. (London).
- Chabaud,M., Durand,J.M., Buchs,N., Fossiez,F., Page,G., Frappart,L., and Miossec,P. (1999). Human interleukin-17: A T cell-derived proinflammatory cytokine produced by the rheumatoid synovium. *Arthritis Rheum.* 42, 963-970.
- Charcot JM: (1868). *Histologie de la sclérose en plaques.* *Gazette Hôpitaux* 141, 554-566.
- Cohen,J.A., Essayan,D.M., Zweiman,B., and Lisak,R.P. (1987). Limiting dilution analysis of the frequency of antigen-reactive lymphocytes isolated from the central nervous system of Lewis rats with experimental allergic encephalomyelitis. *Cell Immunol.* 108, 203-213.
- Cose,S., Brammer,C., Khanna,K.M., Masopust,D., and Lefrancois,L. (2006). Evidence that a significant number of naive T cells enter non-lymphoid organs as part of a normal migratory pathway. *Eur. J. Immunol.* 36, 1423-1433.
- Cruveilhier J. (1842). *Anatomie pathologique du corps humain.* (Paris).
- Cserr,H.F., Harling-Berg,C.J., and Knopf,P.M. (1992). Drainage of brain extracellular fluid into blood and deep cervical lymph and its immunological significance. *Brain Pathol.* 2, 269-276.
- De Clercq,E. (2000). Inhibition of HIV infection by bicyclams, highly potent and specific CXCR4 antagonists. *Molecular Pharmacology* 57, 833-839.
- De Clercq,E. (2005). Potential clinical applications of the CXCR4 antagonist bicyclam AMD3100. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry* 5, 805-824.
- Debes,G.F., Dahl,M.E., Mahiny,A.J., Bonhagen,K., Campbell,D.J., Siegmund,K., Erb,K.J., Lewis,D.B., Kamradt,T., and Hamann,A. (2006). Chemotactic responses of IL-4-, IL-10-, and IFN-gamma-producing CD4+ T cells depend on tissue origin and microbial stimulus. *J. Immunol.* 176, 557-566.

Denk,W., Strickler,J.H., and Webb,W.W. (1990). Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science* 248, 73-76.

Dorner,T. and Radbruch,A. (2005). Selecting B cells and plasma cells to memory. *J Exp. Med.* 201, 497-499.

Dustin,M.L. (2002). The immunological synapse. *Arthritis Res.* 4 *Suppl* 3, S119-S125.

Egawa,T., Kawabata,K., Kawamoto,H., Amada,K., Okamoto,R., Fujii,N., Kishimoto,T., Katsura,Y., and Nagasawa,T. (2001). The earliest stages of B cell development require a chemokine stromal cell-derived factor/pre-B cell growth-stimulating factor. *Immunity* 15, 323-334.

Ehrlich,P. (1885). Das Sauerstoffbedürfnis unterschiedlicher Gewebe. Eine farbanalytische Studie. In Paul Ehrlich gesammelte Werke Band I, Springer Verlag, ed. (Berlin Heidelberg: ursprünglich Hirschfeld), pp. 364-432.

Engelhardt,B. and Ransohoff,R.M. (2005). The ins and outs of T-lymphocyte trafficking to the CNS: anatomical sites and molecular mechanisms. *Trends Immunol.* 26, 485-495.

Este,J.A., Cabrera,C., Blanco,J., Gutierrez,A., Bridger,G., Henson,G., Clotet,B., Schols,D., and De Clercq,E. (1999). Shift of clinical human immunodeficiency virus type 1 isolates from X4 to R5 and prevention of emergence of the syncytium-inducing phenotype by blockade of CXCR4. *Journal of Virology* 73, 5577-5585.

Feldmann,M. and Steinman,L. (2005). Design of effective immunotherapy for human autoimmunity. *Nature* 435, 612-619.

Fernandez-Botran,R., Sanders,V.M., Mosmann,T.R., and Vitetta,E.S. (1988). Lymphokine-mediated regulation of the proliferative response of clones of T helper 1 and T helper 2 cells. *J. Exp. Med.* 168, 543-558.

Fischer,T., Nagel,F., Jacobs,S., Stumm,R., and Schulz,S. (2008). Reassessment of CXCR4 chemokine receptor expression in human normal and neoplastic tissues using the novel rabbit monoclonal antibody UMB-2. *PLoS. ONE.* 3, e4069.

Fox,E.J. (2004). Mechanism of action of mitoxantrone. *Neurology* 63, S15-S18.

Foxman,E.F., Campbell,J.J., and Butcher,E.C. (1997). Multistep navigation and the combinatorial control of leukocyte chemotaxis. *J. Cell Biol.* 139, 1349-1360.

Frentsch,M., Arbach,O., Kirchhoff,D., Moewes,B., Worm,M., Rothe,M., Scheffold,A., and Thiel,A. (2005). Direct access to CD4+ T cells specific for defined antigens according to CD154 expression. *Nat. Med.* 11, 1118-1124.

Fricker,S.P., Anastassov,V., Cox,J., Darkes,M.C., Grujic,O., Idzan,S.R., Labrecque,J., Lau,G., Mosisi,R.M., Nelson,K.L., Qin,L., Santucci,Z., and Wong,R.S.Y. (2006). Characterization of the molecular pharmacology of AMD3100: A specific antagonist of the G-protein coupled chemokine receptor, CXCR4. *Biochemical Pharmacology* 72, 588-596.

Friese,M.A. and Fugger,L. (2005). Autoreactive CD8(+) T cells in multiple sclerosis: a new target for therapy? *Brain* 128, 1747-1763.

Gay,F.W., Drye,T.J., Dick,G.W., and Esiri,M.M. (1997). The application of multifactorial cluster analysis in the staging of plaques in early multiple sclerosis. Identification and characterization of the primary demyelinating lesion. *Brain* 120 (Pt 8), 1461-1483.

Goeppert-Mayer, M. Über Elementarakte mit zwei Quantensprüngen. 1930

- Gold, R., Linington, C., and Lassmann, H. (2006). Understanding pathogenesis and therapy of multiple sclerosis via animal models: 70 years of merits and culprits in experimental autoimmune encephalomyelitis research. *Brain* 129, 1953-1971.
- Goldmann, J., Kwidzinski, E., Brandt, C., Mahlo, J., Richter, D., and Bechmann, I. (2006). T cells traffic from brain to cervical lymph nodes via the cribroid plate and the nasal mucosa. *J Leukoc Biol* 80, 797-801.
- Gonzalo, J.A., Lloyd, C.M., Peled, A., Delaney, T., Goyle, A.J., and Gutierrez-Ramos, J.G. (2000). Critical involvement of the chemotactic axis CXCR4/stromal cell-derived factor-1 alpha in the inflammatory component of allergic airway disease. *Journal of Immunology* 165, 499-508.
- Greter, M., Heppner, F.L., Lemos, M.P., Odermatt, B.M., Goebels, N., Laufer, T., Noelle, R.J., and Becher, B. (2005). Dendritic cells permit immune invasion of the CNS in an animal model of multiple sclerosis. *Nat. Med.* 11, 328-334.
- Hargreaves, D.C., Hyman, P.L., Lu, T.T., Ngo, V.N., Bidgol, A., Suzuki, G., Zou, Y.R., Littman, D.R., and Cyster, J.G. (2001). A coordinated change in chemokine responsiveness guides plasma cell movements. *Journal of Experimental Medicine* 194, 45-56.
- Harrington, L.E., Hatton, R.D., Mangan, P.R., Turner, H., Murphy, T.L., Murphy, K.M., and Weaver, C.T. (2005). Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat. Immunol.* 6, 1123-1132.
- Hartung, H.P., Bar-Or, A., and Zoukos, Y. (2004). What do we know about the mechanism of action of disease-modifying treatments in MS? *J. Neurol.* 251 Suppl 5, v12-v29.
- Hatse, S., Princen, K., Bridger, G., De Clercq, E., and Schols, D. (2002). Chemokine receptor inhibition by AMD3100 is strictly confined to CXCR4. *Febs Letters* 527, 255-262.
- Hauser, A.E., Junt, T., Mempel, T.R., Sneddon, M.W., Kleinstein, S.H., Henrickson, S.E., von Andrian, U.H., Shlomchik, M.J., and Haberman, A.M. (2007). Definition of germinal-center B cell migration in vivo reveals predominant intrazonal circulation patterns. *Immunity* 26, 655-667.
- Heath, W.R. and Carbone, F.R. (2001). Cross-presentation, dendritic cells, tolerance and immunity. *Annu. Rev. Immunol.* 19, 47-64.
- Helmchen, F. and Denk, W. (2002). New developments in multiphoton microscopy. *Curr. Opin. Neurobiol.* 12, 593-601.
- Hemmer, B., Archelos, J.J., and Hartung, H.P. (2002). New concepts in the immunopathogenesis of multiple sclerosis. *Nat Rev Neurosci* 3, 291-301.
- Hickey, W.F. (1999). Leukocyte traffic in the central nervous system: the participants and their roles. *Semin. Immunol.* 11, 125-137.
- Hickey, W.F. (2001). Basic principles of immunological surveillance of the normal central nervous system. *Glia* 36, 118-124.
- Hickey, W.F., Hsu, B.L., and Kimura, H. (1991). T-lymphocyte entry into the central nervous system. *J. Neurosci. Res.* 28, 254-260.
- Hickey, W.F. and Kimura, H. (1988). Perivascular microglial cells of the CNS are bone marrow-derived and present antigen in vivo. *Science* 239, 290-292.
- Hofer, T., Nathansen, H., Lohning, M., Radbruch, A., and Heinrich, R. (2002). GATA-3 transcriptional imprinting in Th2 lymphocytes: a mathematical model. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 99, 9364-9368.

- Hogquist,K.A., Jameson,S.C., Heath,W.R., Howard,J.L., Bevan,M.J., and Carbone,F.R. (1994). T cell receptor antagonist peptides induce positive selection. *Cell* 76, 17-27.
- Hoyer,B.F., Mumtaz,I.M., Yoshida,T., Hiepe,F., and Radbruch,A. (2008). How to cope with pathogenic long-lived plasma cells in autoimmune diseases. *Ann. Rheum. Dis.* 67 *Suppl* 3, iii87-iii89.
- Hugues,S., Fetter,L., Bonifaz,L., Helft,J., Amblard,F., and Amigorena,S. (2004). Distinct T cell dynamics in lymph nodes during the induction of tolerance and immunity. *Nat. Immunol.* 5, 1235-1242.
- Infante-Duarte,C., Horton,H.F., Byrne,M.C., and Kamradt,T. (2000). Microbial lipopeptides induce the production of IL-17 in Th cells. *J. Immunol.* 165, 6107-6115.
- Inglese,M., Ge,Y., Filippi,M., Falini,A., Grossman,R.I., and Gonen,O. (2004). Indirect evidence for early widespread gray matter involvement in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Neuroimage.* 21, 1825-1829.
- Ivanov,I.I., McKenzie,B.S., Zhou,L., Tadokoro,C.E., Lepelley,A., Lafaille,J.J., Cua,D.J., and Littman,D.R. (2006). The orphan nuclear receptor ROR γ directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. *Cell* 126, 1121-1133.
- Iwasaki,T., Uehara,Y., Graves,L., Rachie,N., and Bomszyk,K. (1992). Herbimycin A blocks IL-1-induced NF-kappa B DNA-binding activity in lymphoid cell lines. *FEBS Lett.* 298, 240-244.
- Janeway,C.A., Travers, Walport, and Murphy (2007). *Janway's immunobiology.*, Garland Science, ed.
- Johnson,A.J., Suidan,G.L., McDole,J., and Pirko,I. (2007). The CD8 T cell in multiple sclerosis: suppressor cell or mediator of neuropathology? *Int. Rev. Neurobiol.* 79, 73-97.
- Kaiser,W. and Garrett,C. (1961). 2-photon excitation in $\text{caf}_2 - \text{eu}^{2+}$. *Physical Review Letters* 7, 229.
- Kamradt,T. and Mitchison,N.A. (2001). Tolerance and autoimmunity. *N. Engl. J Med.* 344, 655-664.
- Kawakami,N., Nagerl,U.V., Odoardi,F., Bonhoeffer,T., Wekerle,H., and Flugel,A. (2005). Live imaging of effector cell trafficking and autoantigen recognition within the unfolding autoimmune encephalomyelitis lesion. *J. Exp. Med.* 201, 1805-1814.
- Keszthelyi,E., Karlik,S., Hyduk,S., Rice,G.P., Gordon,G., Yednock,T., and Horner,H. (1996). Evidence for a prolonged role of alpha 4 integrin throughout active experimental allergic encephalomyelitis. *Neurology* 47, 1053-1059.
- Klein,R.S. and Rubin,J.B. (2004). Immune and nervous system CXCL12 and CXCR4: parallel roles in patterning and plasticity. *Trends Immunol.* 25, 306-314.
- Kobayashi,Y., Kawai,K., Honda,H., Tomida,S., Niimi,N., Tamatani,T., Miyasaka,M., and Yoshikai,Y. (1995). Antibodies against leukocyte function-associated antigen-1 and against intercellular adhesion molecule-1 together suppress the progression of experimental allergic encephalomyelitis. *Cell Immunol.* 164, 295-305.
- Kohler,R.E., Comerford,I., Townley,S., Haylock-Jacobs,S., Clark-Lewis,I., and McColl,S.R. (2008). Antagonism of the chemokine receptors CXCR3 and CXCR4 reduces the pathology of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain Pathol.* 18, 504-516.
- Kroenke,M.A. and Segal,B.M. (2007). Th17 and Th1 responses directed against the immunizing epitope, as opposed to secondary epitopes, dominate the autoimmune repertoire during relapses of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neurosci Res.* 85, 1685-1693.
- Krumbholz,M., Theil,D., Cepok,S., Hemmer,B., Kivisakk,P., Ransohoff,R.M., Hofbauer,M., Farina,C., Derfuss,T., Hartle,C., Newcombe,J., Hohlfeld,R., and Meinl,E. (2006). Chemokines in multiple sclerosis.

sis: CXCL12 and CXCL13 up-regulation is differentially linked to CNS immune cell recruitment. *Brain* 129, 200-211.

Langrish,C.L., Chen,Y., Blumenschein,W.M., Mattson,J., Basham,B., Sedgwick,J.D., McClanahan,T., Kastelein,R.A., and Cua,D.J. (2005). IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *Journal of Experimental Medicine* 201, 233-240.

Lassmann,H., Brunner,C., Bradl,M., and Linington,C. (1988). Experimental allergic encephalomyelitis: the balance between encephalitogenic T lymphocytes and demyelinating antibodies determines size and structure of demyelinated lesions. *Acta Neuropathol.* 75, 566-576.

Lexberg,M.H., Taubner,A., Forster,A., Albrecht,I., Richter,A., Kamradt,T., Radbruch,A., and Chang,H.D. (2008). Th memory for interleukin-17 expression is stable in vivo. *Eur. J. Immunol.* 38, 2654-2664.

Liles,W.C., Broxmeyer,H.E., Rodger,E., Wood,B., Hubel,K., Cooper,S., Hangoc,G., Bridger,G.J., Henson,G.W., Calandra,G., and Dale,D.C. (2003). Mobilization of hematopoietic progenitor cells in healthy volunteers by AMD3100, a CXCR4 antagonist. *Blood* 102, 2728-2730.

Liu,H., Rhodes,M., Wiest,D.L., and Vignali,D.A. (2000). On the dynamics of TCR:CD3 complex cell surface expression and downmodulation. *Immunity.* 13, 665-675.

Lohning,M., Hegazy,A.N., Pinschewer,D.D., Busse,D., Lang,K.S., Hofer,T., Radbruch,A., Zinkernagel,R.M., and Hengartner,H. (2008). Long-lived virus-reactive memory T cells generated from purified cytokine-secreting T helper type 1 and type 2 effectors. *Journal of Experimental Medicine* 205, 53-61.

Ma,Q., Jones,D., Borghesani,P.R., Segal,R.A., Nagasawa,T., Kishimoto,T., Bronson,R.T., and Springer,T.A. (1998). Impaired B-lymphopoiesis, myelopoiesis, and derailed cerebellar neuron migration in CXCR4- and SDF-1-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 9448-9453.

Maggi,E., Giudizi,M.G., Biagiotti,R., Annunziato,F., Manetti,R., Piccinni,M.P., Parronchi,P., Sampognaro,S., Giannarini,L., Zuccati,G., and Romagnani,S. (1994). Th2-like CD8+ T cells showing B cell helper function and reduced cytolytic activity in human immunodeficiency virus type 1 infection. *J. Exp. Med* 180, 489-495.

Manz,R., Assenmacher,M., Pfluger,E., Miltenyi,S., and Radbruch,A. (1995). Analysis and sorting of live cells according to secreted molecules, relocated to a cell-surface affinity matrix. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 92, 1921-1925.

Manz,R.A., Thiel,A., and Radbruch,A. (1997). Lifetime of plasma cells in the bone marrow. *Nature* 388, 133-134.

Martin,C., Burdon,P.C.E., Bridger,G., Gutierrez-Ramos,J.C., Williams,T.J., and Rankin,S.M. (2003). Chemokines acting via CXCR2 and CXCR4 control the release of neutrophils from the bone marrow and their return following senescence. *Immunity* 19, 583-593.

Matthys,P., Hatse,S., Vermeire,K., Wuyts,A., Bridger,G., Henson,G.W., De Clercq,E., Billiau,A., and Schols,D. (2001). AMD3100, a potent and specific antagonist of the stromal cell-derived factor-1 chemokine receptor CXCR4, inhibits autoimmune joint inflammation in IFN-gamma receptor-deficient mice. *Journal of Immunology* 167, 4686-4692.

McCandless,E.E., Piccio,L., Woerner,B.M., Schmidt,R.E., Rubin,J.B., Cross,A.H., and Klein,R.S. (2008a). Pathological expression of CXCL12 at the blood-brain barrier correlates with severity of multiple sclerosis. *American Journal of Pathology* 172, 799-808.

McCandless,E.E., Wang,Q., Woerner,B.M., Harper,J.M., and Klein,R.S. (2006). CXCL12 limits inflammation by localizing mononuclear infiltrates to the perivascular space during experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol.* 177, 8053-8064.

- McCandless, E.E., Zhang, B., Diamond, M.S., and Klein, R.S. (2008b). CXCR4 antagonism increases T cell trafficking in the central nervous system and improves survival from West Nile virus encephalitis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105, 11270-11275.
- McFarlin, D.E. and McFarland, H.F. (1982a). Multiple sclerosis (first of two parts). *N. Engl. J. Med.* 307, 1183-1188.
- McFarlin, D.E. and McFarland, H.F. (1982b). Multiple sclerosis (second of two parts). *N. Engl. J. Med.* 307, 1246-1251.
- Medawar, P.B. (1948). Immunity to homologous grafted skin III. The fate of skin homografts transplanted to the brain, to subcutaneous tissue and to anterior chamber of the eye. *British Journal Exp. Pathology* 58-69.
- Meiron, M., Zohar, Y., Anunu, R., Wildbaum, G., and Karin, N. (2008). CXCL12 (SDF-1 α) suppresses ongoing experimental autoimmune encephalomyelitis by selecting antigen-specific regulatory T cells. *J. Exp. Med.* 205, 2643-2655.
- Mempel, T.R., Henrickson, S.E., and von Andrian, U.H. (2004). T-cell priming by dendritic cells in lymph nodes occurs in three distinct phases. *Nature* 427, 154-159.
- Meyermann, R., Korr, J., and Wekerle, H. Specific target retrieval by encephalitogenic T-line cells. *Clin. Neuropathol.* 5, 101. 1986
- Miller, M.J., Wei, S.H., Cahalan, M.D., and Parker, I. (2003). Autonomous T cell trafficking examined in vivo with intravital two-photon microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 100, 2604-2609.
- Miller, M.J., Wei, S.H., Parker, I., and Cahalan, M.D. (2002). Two-photon imaging of lymphocyte motility and antigen response in intact lymph node. *Science* 296, 1869-1873.
- Miltenyi, S., Muller, W., Weichel, W., and Radbruch, A. (1990). High gradient magnetic cell separation with MACS. *Cytometry* 11, 231-238.
- Minami, Y., Kono, T., Miyazaki, T., and Taniguchi, T. (1993). The IL-2 receptor complex: its structure, function, and target genes. *Annu. Rev. Immunol.* 11, 245-268.
- Mora, J.R. and von Andrian, U.H. (2006). T-cell homing specificity and plasticity: new concepts and future challenges. *Trends Immunol.* 27, 235-243.
- Mosmann, T.R., Cherwinski, H., Bond, M.W., Giedlin, M.A., and Coffman, R.L. (1986). Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J. Immunol.* 136, 2348-2357.
- Muller, A., Homey, B., Soto, H., Ge, N., Catron, D., Buchanan, M.E., McClanahan, T., Murphy, E., Yuan, W., Wagner, S.N., Barrera, J.L., Mohar, A., Verastegui, E., and Zlotnik, A. (2001). Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature* 410, 50-56.
- Muller, M., Carter, S.L., Hofer, M.J., Manders, P., Getts, D.R., Getts, M.T., Dreykluft, A., Lu, B., Gerard, C., King, N.J., and Campbell, I.L. (2007). CXCR3 signaling reduces the severity of experimental autoimmune encephalomyelitis by controlling the parenchymal distribution of effector and regulatory T cells in the central nervous system. *J Immunol.* 179, 2774-2786.
- Nagasawa, T., Kikutani, H., and Kishimoto, T. (1994). Molecular-Cloning and Structure of A Pre-B-Cell Growth-Stimulating Factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91, 2305-2309.
- Nelson, B.H. and Willerford, D.M. (1998). Biology of the interleukin-2 receptor. *Adv. Immunol.* 70, 1-81.

- Neumann,H., Boucraut,J., Hahnel,C., Misgeld,T., and Wekerle,H. (1996). Neuronal control of MHC class II inducibility in rat astrocytes and microglia. *Eur. J. Neurosci.* *8*, 2582-2590.
- Neumann,H. and Wekerle,H. (1998). Neuronal control of the immune response in the central nervous system: linking brain immunity to neurodegeneration. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* *57*, 1-9.
- Newman,I. and Wilkinson,P.C. (1996). The bacterial superantigen Staphylococcal enterotoxin B stimulates lymphocyte locomotor capacity during culture in vitro. *Immunology* *87*, 428-433.
- Niino,M., Bodner,C., Simard,M.L., Alatab,S., Gano,D., Kim,H.J., Trigueiro,M., Racicot,D., Guerette,C., Antel,J.P., Fournier,A., Grand'Maison,F., and Bar-Or,A. (2006). Natalizumab effects on immune cell responses in multiple sclerosis. *Ann. Neurol.* *59*, 748-754.
- Nisbet,A.D., Saundry,R.H., Moir,A.J., Fothergill,L.A., and Fothergill,J.E. (1981). The complete amino-acid sequence of hen ovalbumin. *Eur. J Biochem.* *115*, 335-345.
- Nitsch,R., Bechmann,I., Deisz,R.A., Haas,D., Lehmann,T.N., Wendling,U., and Zipp,F. (2000). Human brain-cell death induced by tumour-necrosis-factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL). *Lancet* *356*, 827-828.
- Nitsch,R., Pohl,E.E., Smorodchenko,A., Infante-Duarte,C., Aktas,O., and Zipp,F. (2004). Direct impact of T cells on neurons revealed by two-photon microscopy in living brain tissue. *J. Neurosci.* *24*, 2458-2464.
- Noble,A., Giorgini,A., and Leggat,J.A. (2006). Cytokine-induced IL-10-secreting CD8 T cells represent a phenotypically distinct suppressor T-cell lineage. *Blood* *107*, 4475-4483.
- Nomura,N., Nomura,M., Sugiyama,K., and Hamada,J. (2007a). Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)-induced migration of glioblastoma cells is mediated via p38MAPK/Hsp27 pathway. *Biochem. Pharmacol.* *74*, 690-701.
- Nomura,N., Nomura,M., Takahira,M., and Sugiyama,K. (2007b). Phorbol 12-myristate 13-acetate-activated protein kinase C increased migratory activity of subconjunctival fibroblasts via stress-activated protein kinase pathways. *Mol. Vis.* *13*, 2320-2327.
- Odoardi,F., Kawakami,N., Klinkert,W.E.F., Wekerle,H., and Flugel,A. (2007). Blood-borne soluble protein antigen intensifies T cell activation in autoimmune CNS lesions and exacerbates clinical disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *104*, 18625-18630.
- Okada,T. and Cyster,J.G. (2007). CC chemokine receptor 7 contributes to Gi-dependent T cell motility in the lymph node. *J. Immunol.* *178*, 2973-2978.
- Okada,T., Ngo,V.N., Eklund,E.H., Forster,R., Lipp,M., Littman,D.R., and Cyster,J.G. (2002). Chemokine requirements for B cell entry to lymph nodes and Peyer's patches. *Journal of Experimental Medicine* *196*, 65-75.
- Opendakker,G., Nelissen,I., and Van,D.J. (2003). Functional roles and therapeutic targeting of gelatinase B and chemokines in multiple sclerosis. *Lancet Neurol.* *2*, 747-756.
- Panitch,H.S. (1980). Adoptive transfer of experimental allergic encephalomyelitis with activated spleen cells: comparison of in vitro activation by concanavalin a and myelin basic protein. *Cell Immunol.* *56*, 163-171.
- Peterson,J.W., Bo,L., Mork,S., Chang,A., and Trapp,B.D. (2001). Transected neurites, apoptotic neurons, and reduced inflammation in cortical multiple sclerosis lesions. *Ann. Neurol.* *50*, 389-400.
- Piehl,F. and Lidman,O. (2001). Neuroinflammation in the rat--CNS cells and their role in the regulation of immune reactions. *Immunol. Rev.* *184*, 212-225.

- Plotkin,J., Prockop,S.E., Lepique,A., and Petrie,H.T. (2003). Critical role for CXCR4 signaling in progenitor localization and T cell differentiation in the postnatal thymus. *Journal of Immunology* 171, 4521-4527.
- Pribyl,T.M., Campagnoni,C.W., Kampf,K., Kashima,T., Handley,V.W., McMahon,J., and Campagnoni,A.T. (1993). The human myelin basic protein gene is included within a 179-kilobase transcription unit: expression in the immune and central nervous systems. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 90, 10695-10699.
- Pyo,R.T., Sui,J., Dhume,A., Palomeque,J., Blaxall,B.C., Diaz,G., Tunstead,J., Logothetis,D.E., Hajar,R.J., and Schecter,A.D. (2006). CXCR4 modulates contractility in adult cardiac myocytes. *J. Mol. Cell Cardiol.* 41, 834-844.
- Ransohoff,R.M., Kivisakk,P., and Kidd,G. (2003). Three or more routes for leukocyte migration into the central nervous system. *Nat. Rev. Immunol.* 3, 569-581.
- Robb,R.J., Munck,A., and Smith,K.A. (1981). T cell growth factor receptors. Quantitation, specificity, and biological relevance. *J. Exp. Med.* 154, 1455-1474.
- Rotzschke,O., Falk,K., Stevanovic,S., Jung,G., Walden,P., and Rammensee,H.G. (1991). Exact prediction of a natural T cell epitope. *Eur. J. Immunol.* 21, 2891-2894.
- Rousset,F., Garcia,E., Defrance,T., Peronne,C., Vezzio,N., Hsu,D.H., Kastelein,R., Moore,K.W., and Banchereau,J. (1992). Interleukin 10 is a potent growth and differentiation factor for activated human B lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 89, 1890-1893.
- Ruff,M., Henne,C., Barth,T., Rinaldi,N., Strater,J., Schwartz-Albiez,R., and Moller,P. (1994). PMA-activation of peripheral blood and tonsillar B lymphocytes induces large adhesive cells reminiscent of large extrafollicular (monocytoid) B cells. *Virchows Arch.* 424, 195-204.
- Ruiz,M., Roodman,S.T., Bouhasin,J.D., and Knutsen,A.P. (1996). T cell differentiation/maturation of CD34+ stem cells from HIV-seropositive hemophiliacs in cultured thymic epithelial fragments. *Stem Cells* 14, 132-145.
- Saharinen,P., Tammela,T., Karkkainen,M.J., and Alitalo,K. (2004). Lymphatic vasculature: development, molecular regulation and role in tumor metastasis and inflammation. *Trends Immunol.* 25, 387-395.
- Sallusto,F. and Lanzavecchia,A. (2001). Exploring pathways for memory T cell generation. *J Clin. Invest* 108, 805-806.
- Samoilova,E.B., Horton,J.L., and Chen,Y. (1998). Experimental autoimmune encephalomyelitis in intercellular adhesion molecule-1-deficient mice. *Cell Immunol.* 190, 83-89.
- Scott,P., Natovitz,P., Coffman,R.L., Pearce,E., and Sher,A. (1988). 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.* 168, 1675-1684.
- Seabrook,T.J., Johnston,M., and Hay,J.B. (1998). Cerebral spinal fluid lymphocytes are part of the normal recirculating lymphocyte pool. *J. Neuroimmunol.* 91, 100-107.
- Seder,R.A., Gazzinelli,R., Sher,A., and Paul,W.E. (1993). 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* 90, 10188-10192.
- Sette,A., Buus,S., Colon,S., Smith,J.A., Miles,C., and Grey,H.M. (1987). Structural characteristics of an antigen required for its interaction with Ia and recognition by T cells. *Nature* 328, 395-399.

- Shevach, E.M. (2002). CD4⁺ CD25⁺ suppressor T cells: more questions than answers. *Nat. Rev. Immunol.* 2, 389-400.
- Siffrin, V., Brandt, A.U., Radbruch, H., Herz, J., Boldakowa, N., Leuenberger, T., Werr, J., Hahner, A., Schulze-Topphoff, U., Nitsch, R., and Zipp, F. (2009). Differential immune cell dynamics in the CNS cause CD4⁺ T cell compartmentalization. *Brain* 132, 1247-1258.
- Smith, T.R. and Kumar, V. (2008). Revival of CD8⁺ Treg-mediated suppression. *Trends Immunol.* 29, 337-342.
- Smorodchenko, A., Wuerfel, J., Pohl, E.E., Vogt, J., Tysiak, E., Glumm, R., Hendrix, S., Nitsch, R., Zipp, F., and Infante-Duarte, C. (2007). CNS-irrelevant T-cells enter the brain, cause blood-brain barrier disruption but no glial pathology. *Eur. J. Neurosci.* 26, 1387-1398.
- Sonobe, Y., Jin, S., Wang, J., Kawanokuchi, J., Takeuchi, H., Mizuno, T., and Suzumura, A. (2007). Chronological Changes of CD4(+) and CD8(+) T Cell Subsets in the Experimental Autoimmune Encephalomyelitis, a Mouse Model of Multiple Sclerosis. *Tohoku J. Exp. Med.* 213, 329-339.
- Sprent, J. and Basten, A. (1973). Circulating T and B lymphocytes of the mouse. II. Lifespan. *Cell Immunol.* 7, 40-59.
- Steinman, L. (2007). A brief history of T(H)17, the first major revision in the T(H)1/T(H)2 hypothesis of T cell-mediated tissue damage (vol 13, pg 139, 2007). *Nature Medicine* 13, 385.
- Sumen, C., Mempel, T.R., Mazo, I.B., and von Andrian, U.H. (2004). Intravital microscopy: visualizing immunity in context. *Immunity.* 21, 315-329.
- Sun, D., Whitaker, J.N., Huang, Z., Liu, D., Coleclough, C., Wekerle, H., and Raine, C.S. (2001). Myelin antigen-specific CD8⁺ T cells are encephalitogenic and produce severe disease in C57BL/6 mice. *J. Immunol.* 166, 7579-7587.
- Suni, M.A., Maino, V.C., and Maecker, H.T. (2005). Ex vivo analysis of T-cell function. *Curr. Opin. Immunol.* 17, 434-440.
- Szabo, S.J., Kim, S.T., Costa, G.L., Zhang, X., Fathman, C.G., and Glimcher, L.H. (2000). A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell* 100, 655-669.
- Tadokoro, C.E., Shakhar, G., Shen, S., Ding, Y., Lino, A.C., Maraver, A., Lafaille, J.J., and Dustin, M.L. (2006). Regulatory T cells inhibit stable contacts between CD4⁺ T cells and dendritic cells in vivo. *J. Exp. Med.* 203, 505-511.
- Taichman, R.S., Cooper, C., Keller, E.T., Pienta, K.J., Taichman, N.S., and McCauley, L.K. (2002). Use of the stromal cell-derived factor-1/CXCR4 pathway in prostate cancer metastasis to bone. *Cancer Res.* 62, 1832-1837.
- Tang, Q., Adams, J.Y., Tooley, A.J., Bi, M., Fife, B.T., Serra, P., Santamaria, P., Locksley, R.M., Krummel, M.F., and Bluestone, J.A. (2006). Visualizing regulatory T cell control of autoimmune responses in nonobese diabetic mice. *Nat. Immunol.* 7, 83-92.
- Tejada-Simon, M.V., Hong, J., Rivera, V.M., and Zhang, J.Z. (2001). Reactivity pattern and cytokine profile of T cells primed by myelin peptides in multiple sclerosis and healthy individuals. *Eur. J. Immunol.* 31, 907-917.
- Tough, D.F. and Sprent, J. (1994). Turnover of naive- and memory-phenotype T cells. *J. Exp. Med.* 179, 1127-1135.
- Trapp, B.D., Peterson, J., Ransohoff, R.M., Rudick, R., Mork, S., and Bo, L. (1998). Axonal transection in the lesions of multiple sclerosis. *N. Engl. J. Med.* 338, 278-285.

- Uboldi,C., Doring,A., Alt,C., Estess,P., Siegelman,M., and Engelhardt,B. (2008). L-Selectin-deficient SJL and C57BL/6 mice are not resistant to experimental autoimmune encephalomyelitis. *European Journal of Immunology* 38, 2156-2167.
- Urban,J.F., Jr., Katona,I.M., Paul,W.E., and Finkelman,F.D. (1991). Interleukin 4 is important in protective immunity to a gastrointestinal nematode infection in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 88, 5513-5517.
- Vajkoczy,P., Laschinger,M., and Engelhardt,B. (2001). Alpha4-integrin-VCAM-1 binding mediates G protein-independent capture of encephalitogenic T cell blasts to CNS white matter microvessels. *J. Clin. Invest* 108, 557-565.
- Veldhoen,M., Hocking,R.J., Atkins,C.J., Locksley,R.M., and Stockinger,B. (2006). TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity*. 24, 179-189.
- Walunas,T.L., Lenschow,D.J., Bakker,C.Y., Linsley,P.S., Freeman,G.J., Green,J.M., Thompson,C.B., and Bluestone,J.A. (1994). CTLA-4 can function as a negative regulator of T cell activation. *Immunity*. 1, 405-413.
- Weiss,H.A., Millward,J.M., and Owens,T. (2007). CD8+ T cells in inflammatory demyelinating disease. *J. Neuroimmunol.* 191, 79-85.
- Wekerle,H., Linington,C., Lassmann,H., and Meyermann,R. (1986). Cellular immune reactivity within the CNS. *Trends Neuroscience* 9, 271-277.
- Welsh,C.T., Rose,J.W., Hill,K.E., and Townsend,J.J. (1993). Augmentation of adoptively transferred experimental allergic encephalomyelitis by administration of a monoclonal antibody specific for LFA-1 alpha. *J. Neuroimmunol.* 43, 161-167.
- Woolf,E., Grigorova,I., Sagiv,A., Grabovsky,V., Feigelson,S.W., Shulman,Z., Hartmann,T., Sixt,M., Cyster,J.G., and Alon,R. (2007). Lymph node chemokines promote sustained T lymphocyte motility without triggering stable integrin adhesiveness in the absence of shear forces. *Nat. Immunol.* 8, 1076-1085.
- Worbs,T., Mempel,T.R., Bolter,J., von Andrian,U.H., and Forster,R. (2007). CCR7 ligands stimulate the intranodal motility of T lymphocytes in vivo. *J. Exp. Med.* 204, 489-495.
- Wucherpfennig,K.W., Newcombe,J., Li,H., Keddy,C., Cuzner,M.L., and Hafler,D.A. (1992). T cell receptor V alpha-V beta repertoire and cytokine gene expression in active multiple sclerosis lesions. *J. Exp. Med.* 175, 993-1002.
- Yednock,T.A., Cannon,C., Fritz,L.C., Sanchez-Madrid,F., Steinman,L., and Karin,N. (1992). Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis by antibodies against alpha 4 beta 1 integrin. *Nature* 356, 63-66.
- Zavala,F., Abad,S., Ezine,S., Taupin,V., Masson,A., and Bach,J.F. (2002). G-CSF therapy of ongoing experimental allergic encephalomyelitis via chemokine- and cytokine-based immune deviation. *Journal of Immunology* 168, 2011-2019.
- Zhang,J., Markovic-Plese,S., Lacet,B., Raus,J., Weiner,H.L., and Hafler,D.A. (1994). 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.* 179, 973-984.
- Zipfel,W.R., Williams,R.M., and Webb,W.W. (2003). Nonlinear magic: multiphoton microscopy in the biosciences. *Nat. Biotechnol.* 21, 1369-1377.

Zipp,F. and Aktas,O. (2006). The brain as a target of inflammation: common pathways link inflammatory and neurodegenerative diseases. *Trends Neurosci* 29, 518-527.

Zou,L., Barnett,B., Safah,H., Larussa,V.F., Evdemon-Hogan,M., Mottram,P., Wei,S., David,O., Curiel,T.J., and Zou,W. (2004). Bone marrow is a reservoir for CD4+CD25+ regulatory T cells that traffic through CXCL12/CXCR4 signals. *Cancer Res.* 64, 8451-8455.

Zou,Y.R., Kottmann,A.H., Kuroda,M., Taniuchi,I., and Littman,D.R. (1998). Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development. *Nature* 393, 595-599.

Tierschutz

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

Tötungsnummer: T 0087 vom 24.04.2006

Genehmigungsnummer für Tierversuche G 0106/05 vom 31.05.2005

Danksagung

Ich möchte mich vielmals bei meiner Doktormutter Prof. Frauke Zipp für die ständige Ermutigung, Förderung und Anregung, sowie für die Geduld die meine persönliche Situation erforderte und vor allem für die Möglichkeit zur Durchführung der Experimente mit dem Zwei Photonen Mikroskop bedanken.

Mein Dank gilt von ganzem Herzen Alexander Brandt, er hat mich an die wissenschaftliche Arbeit mit dem Mikroskop und den Hirnschnitten herangeführt. Er hat mich offen empfangen und es war mir eine Freude mit ihm zusammen arbeiten zu dürfen. Seine Begeisterungsfähigkeit ist ansteckend und mir ein ständiger Motor auch in Perioden der zähen Etablierungsarbeit gewesen. Ich danke ihm für sein selbstloses Engagement und Weitergabe seines Wissens sowie das Vertrauen und die Loyalität die er mir entgegengebracht hat.

Die Hilfe und Unterstützung, die Volker Siffrin mir hat zukommen lassen, verdienen besondere Erwähnung. Ich danke ihm herzlichst für seine Ratschläge, Diskussionen und tatkräftigen Beistand. Er gab die entscheidenden Impulse für die immunologische Seite des Projektes, ohne ihn wäre diese Arbeit sonst so nicht möglich gewesen. Ich erinnere mich noch genau, wie er mir das erste Mal die vitalen MOG spezifischen Zellen zeigte.

Weiterhin möchte ich mich bei Carmen Infante-Duarte und Orhan Aktas bedanken, sie waren eine große Unterstützung mit ihrer Kritik und Anregung und hatten immer Worte der Aufmunterung übrig. Sie sind großartige Lehrer und haben mich selbstverständlich an ihrem reichen Erfahrungsschatz in den Methoden der T-Zellkultur und EAE teilhaben lassen.

Des Weiteren möchte ich vor allem Nadia Boldakowa, Josephine Herz, Natalie Asselborn und Astrid Hahner danken. Ohne ihre personelle Hilfe wären viele Experimente gar nicht möglich gewesen und sie haben für die Verbesserung und Fortführung der Experimente nach Beendigung meiner Arbeit gesorgt.

Ich danke dem „Kitchen Club“. Er war ein Forum der moralischen und freundschaftlichen Unterstützung und mit vielen ideologisch unbelasteten Diskussionen.

Nicht zuletzt möchte ich mich auch bei meiner Familie, vor allem meinen Eltern, meinem Mann und meinem Sohn bedanken, die durch ihre bedingungslose Unterstützung jeder auf seine Art und Weise einen sehr großen Anteil am Gelingen dieser Arbeit haben.

Lebenslauf

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

Publikationsliste

Niesner,U., Albrecht,I., Janke,M., Doebis,C., Loddenkemper,C., Lexberg,M.H., Eulenburg,K., Kreher,S., Koeck,J., Baumgrass,R., Bonhagen,K., Kamradt,T., Enghard,P., Humrich,J.Y., Rutz,S., Schulze-Topphoff,U., Aktas,O., Bartfeld,S., **Radbruch,H.**, Hegazy,A.N., Lohning,M., Baumgart,D.C., Duchmann,R., Rudwaleit,M., Haupl,T., Gitelman,I., Krenn,V., Gruen,J., Sieper,J., Zeitz,M., Wiedenmann,B., Zipp,F., Hamann,A., Janitz,M., Scheffold,A., Burmester,G.R., Chang,H.D., and Radbruch,A. (2008). Autoregulation of Th1-mediated inflammation by twist1. *J. Exp. Med* 205, 1889-1901.

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

Herz,J., Niesner, R., Hauser,A.E., Brandt,A.U., Leuenberger,T., **Radbruch,H.**, Fehling,H.-J., Zipp,F. and Siffrin,V. Expanding two-photon microscopy to infrared – deeper, crisper, longer-lasting intravital imaging (2009) *Biophysical Journal im Druck*

Radbruch,H., Dörr,J., Wuerfel ,J., Bock,M., Wandinger ,K.-P., Brüggemann,A., Zeise,D., Pfueller,C., Zipp,F., and Paul,F. (2009) Encephalopathy, visual disturbances and hearing loss – classical but often misleading features of a rare disease *Nature reviews Neurology im Druck*

Radbruch,H., Siffrin,V., Niesner,RA., Herz,J., Leuenberger,T., Glumm,R., and Zipp,F. (2009). In vivo imaging of partially reversible TH17-induced neuronal dysfunction in the course of encephalomyelitis. *Immunity eingereicht*

Herz,J., Siffrin,V., Brandt,A.U., Boldakowa,N., Leuenberger,T., Hahner,A., Zipp,F., and **Radbruch,H.** (2009). Tolerance in the brain? The behaviour of naive and regulatory T-cells in the brain. *in Vorbereitung.*

Zusammenfassung

Multiple Sklerose (MS) ist neben der Epilepsie eine der häufigsten neurologischen Erkrankungen im jungen Erwachsenenalter in Europa und Nordamerika. Histologisch findet man im ZNS Demyelinisierungs- und Entzündungsherde meist um mittelgroße Gefäße. Zurzeit stehen vor allem autoreaktive CD4+ T-Zellen in Verdacht die Krankheit zu vermitteln, nachdem sie in der Peripherie aktiviert wurden und die Blut-Hirn-Schranke überwunden haben. Über das Verhalten der Immunzellen im Hirnparenchym ist noch wenig bekannt. In dieser Arbeit konnten mit Hilfe der Zwei Photonen Mikroskopie unterschiedliche T-Zellsubtypen auf ihrem Weg durch das ZNS Parenchym in nicht entzündlichen murinen hippocampalen Hirnschnitten direkt beobachtet werden. Dabei zeigt sich, dass im Gegensatz zu naiven T-Zellen nur aktivierte T-Zellen einwandern und CD4+ und CD8+ T-Zellen sich hinsichtlich ihres Bewegungsmusters unterscheiden. Die CD4+ T-Zellen wandern auf der parenchymalen Seite an den Gefäßen auf und ab, während die CD8+ T-Zellen sich ungerichtet durch das dichte Parenchym bewegen. Es konnte CXCL12 als wichtiger Faktor identifiziert werden, der die CD4+ T-Zellen in der Nähe der Gefäße hält: die Blockade seines Rezeptors CXCR4 führt zu einem ähnlichen Wanderungsmuster wie es die CD8+ T-Zellen zeigen. Dies korreliert mit aktuellen Daten von humanen organotypischen Hirnschnittkokulturen und zeigt die Grenzen und Möglichkeiten einer therapeutischen CXCR4 Blockade für Immunzellen im Gehirn auf.

Abstract

Multiple Sclerosis is next to epilepsy the most common neurological disease of the young adult in North America and Europe. Characteristic for the disease are disseminated lesions of demyelination and inflammation around medium sized vessels in the CNS. Today, auto reactive T-cells are assumed to cause the disease, after being activated in the periphery and having crossed the blood brain barrier. We know only little about the fate of immune cells once they cross the blood brain barrier. In the present analysis, different T-cell subsets have been tracked by two photon microscopy on their way through the CNS parenchyma of non inflamed murine hippocampi. This work demonstrates differences in the motility of T-cells depending on their activation state, and a distinct migrational behaviour of CD4+ and CD8+ T-cells. CD4+ T-cells show a CXCL12-dependent movement along the parenchymal side of the vessels, while CD8+ T-cells move throughout the parenchyma. These results are in agreement with recent analyses of human organotypic slice cocultures, and they point to the limitations and possibilities of therapeutic CXCR4 antagonists to manipulate the movement and action of immune cells in the brain.

Schlagwörter: T-Zellen, ZNS, CXCR4, Zellverfolgung

Keywords: T-cells, CNS, CXCR4, cell tracking

Eidesstattliche Erklärung

Ich, Helena Radbruch, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: Analyse des Bewegungsmusters von T-Zellsubtypen im zentralen Nervensystem 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 21.04.2009

Helena Radbruch