

Aus dem Institut für Immunologie
der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig
und
der Dermatologischen Klinik
der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg

**Die Rolle Dendritischer Zellen
bei der Induktion der Experimentellen Autoimmun-Enzephalomyelitis**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doctor medicinae veterinariae (Dr. med. vet.)
durch die Veterinärmedizinische Fakultät
der Universität Leipzig

eingereicht von
Eva Cierpka
aus Bottrop

Leipzig, 2007

Mit Genehmigung der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Dekan: Prof. Dr. Karsten Fehlhaber

Betreuer: Prof. Dr. Gottfried Alber

PD Dr. Manfred Lutz

Gutachter: Prof. Dr. Gottfried Alber, Institut für Immunologie,
Veterinärmedizinische Fakultät Leipzig

PD Dr. Manfred Lutz, Dermatologische Klinik,
Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg

Prof. Dr. Johannes Seeger, Veterinär-Anatomisches Institut,
Veterinärmedizinische Fakultät Leipzig

PD Dr. Werner Stenzel, Abteilung für Neuropathologie,
Medizinische Klinik der Universität zu Köln

Tag der Verteidigung: 20. Februar 2007

meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Zielsetzung	1
2	Literaturübersicht.....	3
2.1	Das Immunsystem.....	3
2.1.1	Das angeborene Immunsystem	3
2.1.2	Das adaptive Immunsystem	4
2.2	Die Rolle Dendritischer Zellen (DZ) im Immunsystem	6
2.2.1	Herkunft, Lokalisation, Subtypen und Morphologie	6
2.2.2	T-Zellaktivierung	10
2.2.3	Tolerogene DZ.....	11
2.3	Autoimmunität	13
2.4	Experimentelle Autoimmun-Enzephalomyelitis (EAE) als T _H 1-vermittelte Autoimmunerkrankung	14
2.4.1	Induktion der EAE im Versuchstier Maus.....	15
2.4.2	Zellen und Zytokine bei der EAE	16
2.4.3	Mycobacterium tuberculosis (MT) bei der EAE und die Wirkungen auf DZ	19
2.4.4	Pertussis Toxin (PT) bei der EAE und die Wirkungen auf DZ	20
2.5	Die Rolle DZ bei der Induktion von Autoimmunität.....	21
3	Material und Methoden.....	22
3.1	Versuchstiere	22
3.1.1	Mausstämme	22
3.1.2	Genehmigung der Tierversuche.....	23
3.2	Standardlösungen, Puffer und Medien.....	23
3.3	Spezielle Reagenzien	26
3.3.1	Stimulantien, Zytokine und Antigene.....	26
3.3.2	Antikörper gegen Mausantigene	27
3.4	Zellkulturmethoden.....	29

3.4.1	Allgemeine Arbeitstechniken mit Zellen.....	29
3.4.1.1	Handhabung von Zellen.....	29
3.4.1.2	Einfrieren und Auftauen von Zellen.....	29
3.4.1.3	Zellzählung und Vitalitätsbestimmung.....	29
3.4.1.4	Gewinnung von murinem GM-CSF Kulturüberstand.....	30
3.4.2	Spezielle Arbeitstechniken mit Zellen.....	30
3.4.2.1	Knochenmarkspräparation und Generierung von DZ.....	30
3.4.2.2	T-Zellpräparation aus Lymphknoten und Milz.....	32
3.4.2.3	Antigenspezifische Restimulation <i>in vivo</i> stimulierter T-Zellen.....	32
3.4.2.4	Bestimmung der Zytokinkonzentration (ELISA).....	33
3.4.2.5	[³ H]-Thymidineinbau.....	34
3.4.2.6	Expressionsmessung mittels Durchflusszytometrie (FACS).....	35
3.4.2.7	Zellanreicherung durch magnetische Zellsortierung (MACS).....	36
3.4.2.8	Histopathologische Untersuchung von Kryostatschnitten des ZNS.....	37
3.4.3	Spezielle Arbeitstechniken <i>in vivo</i>	38
3.4.3.1	Induktion der EAE.....	38
3.4.3.2	Antigenbeladung von DZ und Injektion in C57BL/6-Mäuse.....	39
3.4.3.3	Blutserumgewinnung.....	39
4	Ergebnisse.....	41
4.1	Einfluss von MT und PT auf Dendritische Zellen.....	41
4.1.1	Knochenmarks-DZ Reifung.....	41
4.1.2	Zytokinprofil.....	44
4.1.3	T-Zellaktivierung.....	46
4.2	Aktive EAE-Induktion mit Kompletten Freund'schen Adjuvans (CFA).....	47
4.2.1	Zytokinprofil und T-Zellaktivierung.....	47
4.3	Versuch der EAE-Induktion durch Myelin-Antigen präsentierende DZ.....	50
4.3.1	T-Zellaktivierung.....	52
4.3.2	Zytokinprofil.....	55
4.3.3	Aktive EAE-Induktion nach vorangegangener DZ-Immunisierung.....	58
4.4	Gegenüberstellung von Unterschieden.....	60
4.4.1	T-Zellaktivierung und Zytokinprofil.....	60

4.4.2	ZNS Histologie	62
4.5	Weitere Versuchsansätze zur Induktion der EAE mittels DZ	64
4.5.1	Verstärkung der T _H 1 Antwort	64
4.5.1.1	Zusätzliche Injektionen von IL-12 oder IFN- γ	64
4.5.1.2	T-Zellfrequenz	65
4.5.1.3	Regulatorische T-Zellen	67
4.5.2	DZ Subtypen	69
4.5.2.1	Immunisierung mit CD8 α^+ DZ	69
4.5.2.2	Zusätzliche Injektionen von Pathogen Derivaten	70
4.5.3	Zusätzliche Injektionen von Adjuvans	73
4.5.4	Erhöhte Entzündung im Zielgewebe	75
4.5.5	Genetische Prädisposition	76
5	Diskussion	77
6	Zusammenfassung	87
7	Summary	89
8	Literaturverzeichnis	91

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Ak	Antikörper
Ag	Antigen
APZ	antigenpräsentierende Zelle
BSA	Bovines Serumalbumin
Ci	Curie
CFA	“Complete Freund’s Adjuvant” (Komplettes Freund’sches Adjuvans)
CpG	unmethylierte Nukleotidstränge mit Cytosin-Guanin-Motiven
cpm	“counts per minute” (Zahl der radioaktiven Zerfälle pro Minute)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonuklease
DZ	Dendritische Zelle
EAE	Experimentelle Autoimmun-Enzephalomyelitis
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	“enzyme-linked-immunoabsorbent-assay”
FACS	“fluorescence-activated cell sorting”
FITC	Fluoreszein-Isothiocyanat
FKS	fötales Kälberserum
FSC	“forward scatter” (Frontalmuster)
GM-CSF	“granulocyte-macrophage colony stimulating factor” (Granulozyten-Makrophagen-koloniestimulierender Faktor)
HLA	“human leucocyte antigen” (Humanes Leukozyten Antigen)

IL	Interleukin
IFN- γ	Interferon- γ
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
LPS	Lipopolysaccharid
LZ	Langerhans Zelle
M	Mol = mol/l
MACS	„magnetic cell sorter“
MAG	Myelin assoziiertes Glykoprotein
MBP	Myelin Basisches Protein
ME	Mercaptoethanol
MHC	“major histocompatibility complex” (Haupthistokompatibilitätskomplex)
MOG	Myelin-Oligodendroglia-Glykoprotein
MT	Mycobacterium tuberculosis
MZ	Mastzelle
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
OD	Optische Dichte
PAMPs	“pathogen-associated molecular patterns”
PBS	“phosphate buffer saline”
PE	Phycoerythrin
pH	“potentia Hydrogeni” negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PLP	Proteolipidprotein
PRRs	“pattern recognition receptors”

Abkürzungsverzeichnis

PT	Pertussis Toxin
rek.	Rekombinant
rpm	“rounds per minute” (Umdrehungen pro Minute)
s.c.	subkutan
SSC	“side scatter” (Seitenmuster)
Tab.	Tabelle
T _H 1	T-Helfer 1
T _H 2	T-Helfer 2
Th3	induzierbare regulatorische T-Zelle
TLR	Toll-like Rezeptor
TGF- β	“transforming growth factor- β ”
TNF- α	Tumornekrosefaktor α
T _R	regulatorische T-Zelle
Tr1	induzierbare regulatorische T-Zelle
TZR	T-Zell-Rezeptor
U	Unit (Enzymeinheit)
V	Volt
WT	Wildtyp
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 Einleitung und Zielsetzung

Die Aufgabe des Immunsystems besteht in der Abwehr von Infektionen durch Initiierung einer Immunantwort gegen körperfremde Antigene. Im Falle von Autoimmunität wendet sich das Immunsystem fälschlicherweise gegen den eigenen Organismus und initiiert durch eine adaptive Immunantwort gegen körpereigene Antigene die Entstehung einer Autoimmunerkrankung.

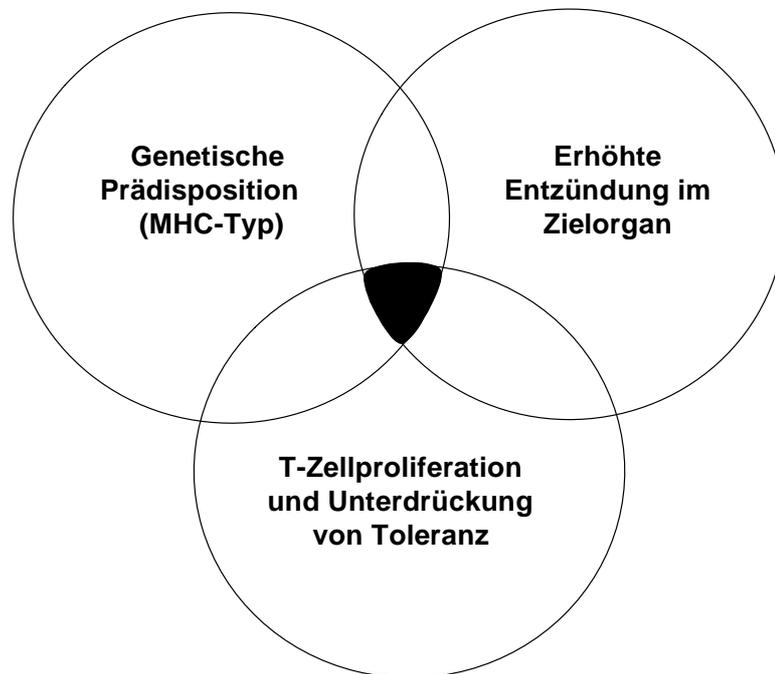
Zur Pathogenese einer Autoimmunerkrankung bedarf es eines äußerst komplexen Zusammenspiels verschiedener Faktoren, welche zum Teil bis heute noch unbekannt sind. Für die Auslösung der Experimentellen Autoimmun-Enzephalomyelitis (EAE) im Versuchstier Maus, welche als Tiermodell für die Multiple Sklerose (MS) des Menschen dient, sind diese Faktoren dagegen partiell bekannt.

Die EAE ist eine T-Helfer 1 (T_H1) -vermittelte Autoimmunerkrankung, weshalb die Aktivierung autoreaktiver T_H1 -Zellen den entscheidenden Schritt zur Auslösung der Erkrankung darstellt. Zudem spielt die genetische Prädisposition und damit die Wahl des geeigneten Mausstammes eine Rolle. Begünstigend für den Eintritt in das Zentrale Nervensystem (ZNS) über die Blut-Hirn-Schranke (BHS) und den Zusammenbruch derselbigen, wirkt eine lokale Entzündung. Die Schnittmenge aus diesen Faktoren scheint der Schlüssel zur Induktion der Autoimmunerkrankung EAE in der Maus zu sein (Abb. 1).

In der Primärphase der EAE-Induktion beobachtet man die Aktivierung autoreaktiver T_H1 -Zellen. Da *in vivo* die antigen-spezifische Aktivierung naiver T-Zellen ausschließlich über Dendritische Zellen (DZ) vermittelt wird, spielen DZ vermutlich auch bei der EAE-Induktion eine entscheidende Rolle.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Rolle der Dendritischen Zellen in der Pathogenese der EAE zu eruieren. Zu diesem Zweck sollten die Aktivierungsbedingungen charakterisiert werden, unter welchen *in vitro* generierte DZ in der Lage sind, nach Antigenbeladung und Injektion die EAE auszulösen.

Autoimmunität:



*Abb. 1: Essentielle Faktoren zur Induktion von Autoimmunität im gesunden Säugetierorganismus
Die Schnittmenge aus genetischer Prädisposition, T-Zellproliferation mit Unterdrückung von T-Zelltoleranz und Entzündung im Zielorgan ist der Schlüssel zur Induktion von Autoimmunität*

2 Literaturübersicht

2.1 Das Immunsystem

Jeder höhere Organismus verfügt zum Schutz vor Krankheitserregern über ein Immunsystem. Dieses dient einerseits der Abwehr körperfremder pathogener Mikroben wie Bakterien, Pilze, Protozoen, Viren oder Parasiten, andererseits aber auch der Abwehr körpereigener Bedrohungen in Form von Tumoren. Hierzu bedient es sich zweier sich ergänzender Komponenten:

Die angeborene oder auch unspezifische Immunität dominiert zu Beginn einer Immunantwort, die adaptive oder spezifische Immunität greift im direkten Anschluss oder auch schon parallel in die Immunantwort ein.

2.1.1 Das angeborene Immunsystem

Haut und Schleimhäute stellen die erste Komponente der angeborenen Immunabwehr dar, sie erschweren als physikalisch-chemische Barriere das Eindringen von Pathogenen. Weitere Komponenten sind auf molekularer Ebene die Proteine des Komplementsystem, außerdem antimikrobielle Enzymsysteme sowie unspezifische Mediatoren wie Interferone und Interleukine. Auf zellulärer Ebene kontrollieren Monozyten, Makrophagen, neutrophile Granulozyten und Dendritische Zellen den Organismus und werden aufgrund ihrer Fähigkeit Pathogene aufzunehmen und zu verdauen als Phagozyten bezeichnet. Natürliche Killer- (NK-) Zellen spielen vor allem bei der Abwehr von Viren eine Rolle, indem sie virusinfizierte Zellen erkennen und töten.

Die Erkennung von Pathogenen erfolgt über Mustererkennungsrezeptoren („pattern recognition receptors“, PRRs) der Phagozyten, welche Pathogen-assoziierte molekulare Muster („pathogen-associated molecular pattern“, PAMP) auf den Fremd-Antigenen erkennen (MEDZHITOV und JANEWAY 2002; MEDZHITOV 2001; KAISHO und AKIRA 2001). Ein typischer PRR ist der Toll-like

Rezeptor 4 (TLR-4), der unter anderem von Neutrophilen, Makrophagen und DZ exprimiert wird. Ein beschriebener Ligand ist das Lipopolysaccharid (LPS), ein charakteristischer Bestandteil gramnegativer Bakterien (POLTORAK et al. 1998).

Makrophagen und DZ sind in der Lage, endozytierte Pathogene zu prozessieren und Bruchstücke als Peptidfragmente auf ihrer Oberfläche mit Hilfe von Haupthistokompatibilitätskomplex-Molekülen („major histocompatibility complex“, MHC) anderen Immunzellen, den T-Zellen zu präsentieren und somit eine spezifische Immunantwort auszulösen. Aufgrund dieser Fähigkeit werden Makrophagen und DZ zusammen mit B-Zellen als professionelle antigenpräsentierende Zellen (APZ) bezeichnet und bilden mit dieser Eigenschaft eine Brücke vom angeborenen zum adaptiven Immunsystem.

2.1.2 Das adaptive Immunsystem

Im Gegensatz zum angeborenen Immunsystem ist das adaptive Immunsystem speziell auf einen Erreger abgestimmt. Nach Erstkontakt mit einem Antigen werden so genannte Gedächtniszellen gebildet. Dieses immunologische Gedächtnis führt dazu, dass der Organismus auf eine wiederholte Exposition mit dem gleichen Erreger spezifischer, schneller und heftiger reagieren kann, als über die angeborene Immunität. Die adaptive Immunität wird durch T- und B-Lymphozyten vermittelt. Beide Zelltypen haben ihren Ursprung in der hämatopoetischen Stammzelle im Knochenmark. Die auch als primär lymphatischen Organe bezeichneten Bildungs- und Differenzierungsorte sind für die B-Zellen zunächst die fötale Leber, später das Knochenmark. Die Differenzierung der T-Zellen findet im Thymus statt.

Im Laufe der Ontogenese erfolgt die „Prägung“ der Lymphozyten auf die Antigenerkennung. Während der positiven Selektion überleben nur die Lymphozyten, deren T-Zellrezeptoren in der Lage sind, mit den MHC-Molekülen des Organismus zu interagieren. Bei der anschließenden negativen Selektion werden solche Lymphozyten aussortiert, die körpereigene, sogenannte Autoantigene erkennen.

Nach Ausreifung verlassen die naiven Lymphozyten ihre Bildungsorte und gelangen über die Blutbahn zu den sekundären lymphatischen Organen, wo sie in B- und T-Zellarealen akkumulieren.

B-Zellen können mithilfe ihres B-Zell-Rezeptors (BZR) lösliche und auf Zellen exprimierte Antigene erkennen und binden. Sie gehören zusammen mit Makrophagen und DZ zu den professionellen APZ und sind somit in der Lage, Antigene zu endozytieren, zu prozessieren und auf ihrer Oberfläche anderen Immunzellen auf MHC-Molekülen zu präsentieren.

B-Zellen zeichnen sich nach Aktivierung und Differenzierung in Plasmazellen durch die Bildung einer Vielzahl von Antikörpern (Immunglobulinen) aus. Eine B-Zell-vermittelte Immunität wird auch als humorale Immunantwort bezeichnet.

Eine durch T-Zellen vermittelte Immunantwort wird als zelluläre Immunität bezeichnet. T-Zellen sind im Gegensatz zu B-Zellen nicht in der Lage freie Antigene zu binden. Vielmehr sind sie auf die Hilfe von APZ angewiesen, welche ihnen Antigene in Form von Peptidfragmenten, gebunden an MHC-Moleküle, präsentieren.

Es werden zwei Klassen von MHC-Molekülen unterschieden, was hinsichtlich der Qualität der Immunantwort von Wichtigkeit ist: MHC-I Moleküle befinden sich auf der Oberfläche jeder kernhaltigen Zelle und präsentieren Peptide mit einer Länge von 8-11 Aminosäuren. MHC-II Moleküle dagegen werden fast ausschließlich auf der Oberfläche professionell antigenpräsentierender Zellen (APZ) exprimiert und können Peptide mit einer Länge von 10-30 Aminosäuren an T-Zellen präsentieren. Die Präsentation endogener Antigene über MHC-I führt zur Aktivierung zytotoxischer CD8⁺ T-Zellen, wodurch es zur Eliminierung dieser Zellen kommt. Im Gegensatz dazu nehmen APZ exogene Fremdproteine auf, welche sie über MHC-II sogenannten CD4⁺ T-Helfer- (T_H-) Zellen präsentieren. CD4⁺ T_H-Zellen existieren in verschiedenen Aktivierungsformen, die sich im Charakter ihrer Zytokinproduktion und somit in der Art der induzierten Immunantwort deutlich unterscheiden. Auf den Vorgang der T-Zellaktivierung und die Qualität der jeweiligen Immunantwort wird noch näher im Abschnitt 2.2.2 eingegangen.

2.2 Die Rolle Dendritischer Zellen (DZ) im Immunsystem

DZ spielen, wie bereits erwähnt, eine zentrale Rolle im angeborenen und adaptiven Immunsystem. Herausragend ist dabei zum einen die Induktion primärer adaptiver Immunantworten, zum anderen aber auch die Induktion immunologischer Toleranz.

2.2.1 Herkunft, Lokalisation, Subtypen und Morphologie

Zur Zeit werden verschiedene DZ-Subtypen unterschieden, denen gemein ihr Ursprung in der hämatopoetischen Stammzelle ist (SHORTMAN und LIU 2002).

Die bekanntesten und als erstes entdeckten DZ sind die Langerhans Zellen (LZ), welche als unreife DZ in der Epidermis lokalisiert sind. Charakteristisch ist die Expression von Birbeck-Granula, Langerin und E-Cadherin (ROMANI et al. 1985; SCHULER und STEINMAN 1985; LARSEN et al. 1990). Weitere DZ-Subtypen wurden ursprünglich in myeloide oder lymphoide DZ unterteilt. Allerdings zeigen neueste Erkenntnisse, dass lymphoide Vorläuferzellen auch zu myeloiden DZ differenzieren können und umgekehrt (MANZ et al. 2001). Momentan werden sie deshalb als klassische oder konventionelle DZ bezeichnet.

Plasmazytoide DZ stellen einen weiteren Subtyp dar. Sie stammen ebenfalls von hämatopoetischen Stammzellen ab (HOCHREIN et al. 2002) und exprimieren Marker aus verschiedenen Zellreihen, wie beispielsweise B-Zellen (B220) oder Granulozyten (Gr-1) (NAKANO et al. 2001; NIKOLIC et al. 2002). Ihre Hauptaufgabe besteht nach bisherigem Kenntnisstand in der Produktion von IFN- α und damit der Abwehr viraler Infektionen (CELLA et al. 2000). Aktuelle Daten zeigen, dass Vorläuferzellen plasmazytoider DZ auch in klassische DZ differenzieren können (CHICHA et al. 2004).

Bei der Generierung von DZ *in vitro* sind neben peripheren Blutmonozyten (Mensch) Knochenmarkszellen (Maus) die wichtigsten Vorläufer. LZ werden *in vitro* aus CD14⁺ Vorläuferzellen in Anwesenheit von GM-CSF/TNF- α und „Transforming growth factor- β “ (TGF- β) kultiviert (JAKSITS et al. 1999). Aus

humanen und murinen Blutmonozyten können mit Hilfe von GM-CSF +/- IL-4 DZ generiert werden, Knochenmarks-DZ entstehen nach Kultivierung mit GM-CSF (INABA et al. 1992; LUTZ et al. 1999; Abb. 2 nach LUTZ).

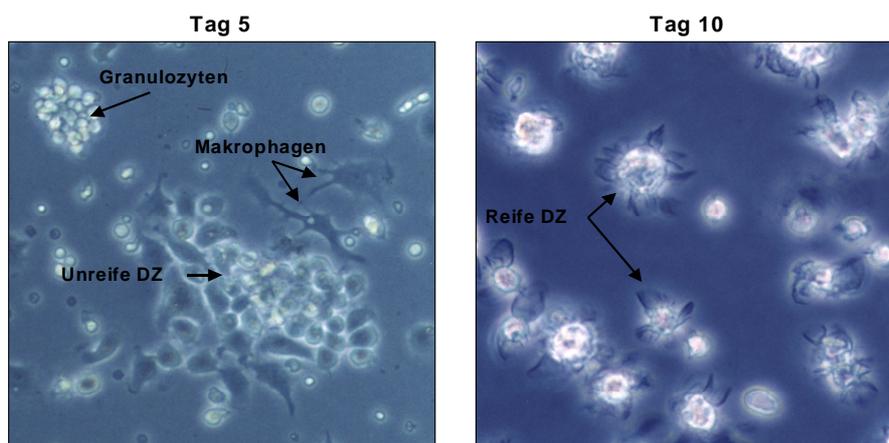


Abb. 2: Fotografie (400x) einer Knochenmarkskultur am fünften und zehnten Tag der Kultivierung (Foto von LUTZ) Die Kultivierung von DZ aus Knochenmark erfolgt in R10-Medium mit dem Wachstumsfaktor Granulozyten-Makrophagen-koloniestimulierender Faktor („granulocyte-macrophage colony stimulating factor“, GM-CSF). Nach fünf Tagen besteht die Kultur vorwiegend aus unreifen DZ und adhärennten Makrophagen und Granulozyten, nach zehn Tagen sind reife DZ mit den typischen „Segeln“ in der Kultur vorhanden (LUTZ et al. 1999)

Die Funktion der DZ ist abhängig von ihrem Differenzierungsstadium. So werden unreife und reife DZ unterschieden, welche sich nicht nur grundlegend in ihrem Phänotyp, sondern auch hinsichtlich ihrer Aufgabe voneinander abgrenzen. Unreife DZ, wie die epidermalen LZ und die dermalen DZ, haben im Immunsystem eine Kontrollfunktion, sie besiedeln die peripheren Organe und zeichnen sich durch eine hohe Endozytosefähigkeit aus. Antigene werden mittels Phagozytose, Makropinozytose oder rezeptorvermittelter Endozytose aufgenommen (BANCHEREAU et al. 2000). DZ exprimieren auf ihrer Oberfläche Toll-like Rezeptoren, welche genetisch determiniert sind und zur Familie der PRR gehören. Durch Erkennung spezifischer Pathogen-assoziiertes molekularer Muster kommt

es zur Aktivierung der DZ und somit zur Induktion der erworbenen Immunität (TAKEDA et al. 2003; MEDZHITOV und JANEWAY 2000; REIS E SOUSA 2004; AKIRA 2001). Die Aktivierung führt zur Wanderung der DZ in die drainierenden Lymphknoten. Mediatoren, welche die Auswanderung induzieren, sind unter anderem TNF- α , IL-1 β und die für Bakterien typischen Cytosin/Guanosin reichen Oligonucleotid-sequenzen (CpG) (BAN et al. 2000) und LPS, welches seine Wirkung wahrscheinlich indirekt über TNF- α vermittelt (ROAKE et al. 1995). Während ihrer Wanderung prozessieren die unreifen DZ das aufgenommene Antigen (INABA et al. 2000), regulieren ihre Oberflächenmoleküle hoch und differenzieren zu reifen DZ. Sie verlieren ihre Endozytosefähigkeit (SALLUSTO et al. 1995) und dienen nun der Aktivierung naiver T-Zellen durch Präsentation der aufgenommenen Antigene am Endpunkt ihrer Migration in den T-Zell-Arealen des Lymphknotens.

Unreife DZ besitzen nur sehr wenige MHC-Moleküle auf der Oberfläche und keine bzw. nur sehr wenige kostimulatorische Moleküle. Reife DZ dagegen exprimieren eine Vielzahl an MHC-Molekülen auf ihrer Oberfläche und sehr viele kostimulatorische Moleküle wie B7-1 (CD80) und B7-2 (CD86) (CELLA et al. 1997; BANCHEREAU und STEINMAN 1998; TURLEY et al. 2000; Abb. 3). Des Weiteren sezernieren reife DZ in Abhängigkeit vom erkannten Pathogen verschiedene Zytokine. Neben IL-12 initiiert auch IL-23, welches ebenfalls zur IL-12 Familie gehört, eine T_H1-Immunantwort (BROMBACHER et al. 2003). IL-1 und TNF- α werden auch im Zusammenhang mit der Initialisierung einer T_H1-Immunantwort sezerniert.

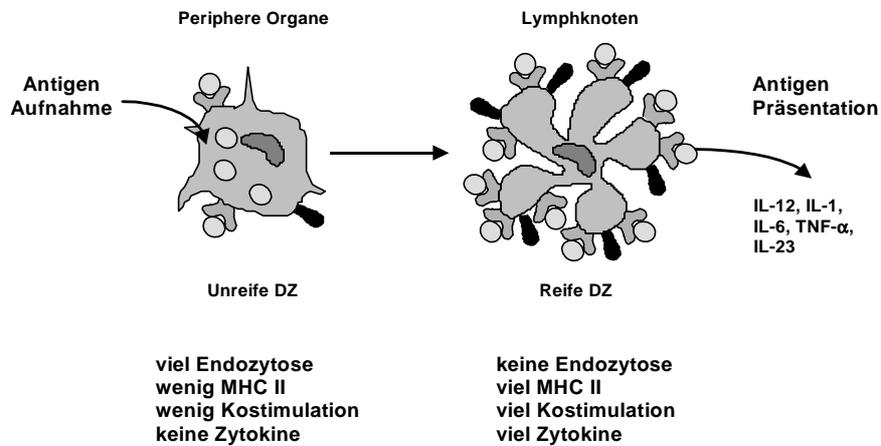


Abb. 3: **Aufgaben und Eigenschaften von Dendritischen Zellen** Unreife DZ besitzen die Fähigkeit zur Endozytose. Ausgelöst durch pathogenes Material, welches vor allem über TLR gebunden wird, wandern die DZ zu den drainierenden Lymphknoten. Auf ihrer Wanderung reifen sie heran und dienen dann fast ausschließlich der Antigenpräsentation. Charakteristisch ist die Hochregulierung der Oberflächenmoleküle wie MHC-II und kostimulatorischer Moleküle. Als Antigen-präsentierende-Zelle produziert sie je nach aufgenommenem Antigen verschiedene Zytokine und beeinflusst so die Qualität der Immunantwort (LUTZ 2000)

2.2.2 T-Zellaktivierung

Die Hauptaufgabe reifer DZ besteht in der T-Zellaktivierung in den T-Zell-Arealen des drainierenden Lymphknotens. Eine vollständige T-Zellaktivierung besteht aus mehreren Schritten verschiedener Interaktionen zwischen der DZ und der T-Zelle. Auf Seiten der T-Zelle dient der TZR zur Antigenerkennung. Er besteht aus zwei Untereinheiten (α und β oder γ und δ) die über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind und am genetisch hoch variablen, extrazellulären N-Terminus MHC-Peptid-Komplexe binden können. Diese TZR-MHC-Bindung zwischen DZ und T-Zelle stellt das erste Signal der T-Zellaktivierung dar (BANCHEREAU et al. 2000). Das zweite Signal stellt die Interaktion von kostimulatorischen Molekülen, wie B7-1 bzw. B7-2 mit CD28 dar (STEINMAN et al. 1999). Diese Interaktion führt zur Produktion von IL-2 durch die aktivierten T-Zellen. IL-2 wirkt wiederum aktivierend auf die T-Zellen durch Bindung an IL-2 Rezeptoren. Neben CD28 wird nach Aktivierung als zusätzlicher Rezeptor CTLA-4 exprimiert, welcher eine etwa 20 mal höhere Affinität zu B7 hat und die Produktion des T-Zellwachstumsfaktor IL-2 wieder limitiert. Induziert durch die Aktivierung der T-Zellen, wird auf deren Oberfläche das CD154 Molekül exprimiert, welches der Ligand für das CD40 Antigen von DZ ist. Durch deren Interaktion nimmt die Expression von kostimulatorischen Molekülen weiter zu, wodurch wiederum die Aktivierung naiver T-Zellen verstärkt wird (JANEWAY 1997).

Produzieren DZ das zentrale proinflammatorische Zytokin IL-12, dessen bioaktive Form IL12p70 an den IL-12 Rezeptor auf der aktivierten T-Zelle bindet erfolgt die Differenzierung zur T_H1 -Effektorzelle (MACATONIA et al. 1995). T_H1 -Zellen produzieren die Zytokine IFN- γ , TNF- α und IL-2. IFN- γ aktiviert $CD8^+$ zytotoxische T-Zellen, welche als Effektorzellen die zelluläre Immunität vermitteln, aber auch Makrophagen der angeborenen Immunabwehr und den Klassenwechsel zu IgG2a in der Maus.

Parasitäre Produkte induzieren eine T_H2 -Antwort (MOSER und MURPHY 2000). Das Zytokin zur T_H2 -Differenzierung ist IL-4. Dessen initiale Synthese stammt vermutlich von NKT-Zellen oder Basophilen und ist später in der aktivierten T-Zelle

nachweisbar und wird durch exogenes IL-4 weiter hochreguliert. Von T_H2-Zellen produzierte Zytokine sind IL-4, IL-5, IL-10 und IL-13. Neben der Wirkung durch Sekretion von Zytokinen unterstützen T_H2-Zellen die Differenzierung von B-Zellen zu IgE und IgG1 produzierenden Plasmazellen und die Aktivierung von Eosinophilen.

2.2.3 Tolerogene DZ

Neben der Induktion von Immunantworten ist die Induktion von immunologischer Toleranz eine wichtige Eigenschaft von DZ. Hierbei werden die zentrale Toleranz, welche während der Entwicklung der T-Zellen im Thymus greift und die periphere Toleranz, die sich verschiedener Mechanismen bedient, unterschieden (BANCHERAU und STEINMAN 1998).

Die zentrale Toleranz, welche durch die negative Selektion vermittelt wird, ist lückenhaft. Die Kreuzreaktivität von Fremd- und Autoantigenen lässt nicht zu, dass alle autoreaktiven T-Zellen durch negative Selektion beseitigt werden können, da sonst eine Immunantwort auf Fremdartigene nicht mehr möglich wäre (MASON 1998). Negativ selektiert werden können daher nur T-Zellen mit einem TZR, der körpereigene Antigene mit hoher Affinität erkennt. Hieraus ergibt sich eine Präsenz von autoreaktiven T-Zellen mit niedrigerer TZR Affinität auch im gesunden Organismus. Um Autoimmunreaktionen als Folge zu verhindern, bedient sich der Organismus der peripheren Toleranz, die über fünf Mechanismen verfügt:

Die immunologische Ignoranz bezieht sich auf die Expression von Selbstantigenen in Organen, die von autoreaktiven T-Zellen im Normalfall nicht wahrgenommen werden. Erst nach deren spezifischen Aktivierung können sie in die Organe eindringen.

Die Deletion ist nicht nur ein Mechanismus der zentralen Toleranz, sondern durchaus auch der peripheren Toleranz. So wird die antigenspezifische Deletion von CD8⁺ T-Zellen mittels Apoptose durch DZ vermittelt, welche das Antigen im Gewebe aufnehmen und in den sekundären Lymphorganen tolerogen präsentieren (HAWIGER et al. 2001).

Immundeprivation bezeichnet den Wechsel von der einen Art der T-Helfer-Zell-Immunantwort zu einer Immunantwort der entgegengesetzten Wirkung. So ist es möglich durch gezielte Induktion einer T_H2 -Immunantwort in einer T_H1 -vermittelten Autoimmunerkrankung diese zu unterdrücken (JANEWAY 1997).

Bei der Anergieinduktion werden T-Zellen über den TZR aber ohne Kostimulation durch CD28 antigenspezifisch aktiviert und sind danach funktionell inaktiv. Nur durch sehr hohe Dosen des T- Zell Aktivierungszytokins IL-2 oder andere polyklonale Stimuli kann der Zustand der Anergie revertiert werden. Bisherige Untersuchungen führten zu der Annahme, dass die Anergieinduktion aus der Interaktion einer unreifen DZ mit einer naiven T-Zelle ohne die Beteiligung kostimulatorischer Moleküle resultiert (SCHWARTZ et al. 1989). Tatsächlich zeigten nähere Untersuchungen, dass Anergieinduktion CTLA 4 Signale, und damit B7-Moleküle auf den DZ benötigt (ABBAS 2003).

Jüngere Studien belegen die Existenz von sogenannten regulatorischen T-Zellen (T_R -Zellen) und in diesem Zusammenhang die Rolle von DZ zur Toleranzinduktion. Zur Zeit sind drei Populationen von T_R -Zellen bekannt (UMETSU et al. 2002). Unterschieden werden natürliche und induzierbare T_R -Zellen. Induzierbare T_R -Zellen sind zum Einen sogenannte Tr1-Zellen, welche sich durch die Produktion des regulatorischen Zytokins IL-10 auszeichnen und zum Anderen sogenannte Th3-Zellen, welche das regulatorische Zytokin „transforming growth factor- β “ TGF- β sezernieren. Beide Zytokine verhindern die Proliferation antigenspezifischer T-Zellen und die Reifung von DZ (GROUX et al. 1997; CHEN et al. 1994). Die Generierung induzierbarer T_R -Zellen erfolgt durch Inkubation mit IL-10, demnach sind *in vivo* IL-10 produzierende DZ die Vermittler von Toleranz.

Zu den natürlichen T_R -Zellen gehören die $CD4^+CD25^+$ T-Zellen, die bereits im Thymus entstehen und einen Anteil von 5-10 % der Gesamt-T-Zellpopulation eines Organismus ausmachen. Ihre regulatorische Wirkung vermitteln sie über direkten Zellkontakt (SAKAGUCHI et al. 1995; THORNTON und SHEVACH, 1998). SHEVACH (2002) und KOHM et al. (2002) zeigten, dass der Transfer $CD4^+CD25^+$ T-Zellen vor Induktion einer T_H1 -vermittelten Autoimmunerkrankung, diese in ihrer Ausprägung deutlich reduzierte.

2.3 Autoimmunität

Autoimmunität ist eine adaptive Immunreaktion, welche gegen körpereigene Antigene gerichtet ist. Man unterscheidet organspezifische und systemische Autoimmunerkrankungen, je nachdem, ob nur ein Organ oder ein Gewebe betroffen ist, oder im Blut zirkulierende Immunkomplexe eine systemische Ausweitung der Erkrankung anzeigen (MARRACK et al. 2001; OHASHI 2002).

Zu den organspezifischen Autoimmunerkrankungen gehören unter anderem die Multiple Sklerose (MS), bei der es durch Aktivierung autoreaktiver T-Zellen zu einer Demyelinisierung von Axonen des ZNS kommt und der Insulin-abhängige Diabetes mellitus (IDDM), bei dem die Inselzellen des Pankreas zerstört werden. Beispiele für systemische Autoimmunerkrankungen sind der Systemische Lupus erythematosus (SLE), welcher durch Autoantikörper gegen ubiquitäre Antigene gekennzeichnet ist, und die Rheumatoide Arthritis (RA), bei der zunächst Gelenkknorpelstrukturen, bei schwerem Verlauf jedoch fast alle Organe betroffen sein können (MARRACK et al. 2001).

Bei Autoimmunerkrankungen dominiert im Allgemeinen eine Immunantwort entweder des einen oder des anderen T_H -Phänotyps. Bei Autoimmunerkrankungen, bei denen Antikörper (AK) eine pathogene Rolle spielen, überwiegt der Einfluss von T_H2 -Zellen. Hingegen dominieren bei entzündlichen Autoimmunerkrankungen, bei denen Antikörper im Gegensatz zu T-Zellen nur eine untergeordnete oder keine Rolle spielen, T_H1 -Zellen (JANEWAY 1997).

Die Ursachen für das Zustandekommen einer Autoimmunerkrankung sind bis heute noch nicht eindeutig geklärt. So besteht unter anderem eine Assoziation bestimmter HLA-Moleküle mit verschiedenen Autoimmunerkrankungen. Eine große Rolle bei T-Zell-vermittelten Autoimmunerkrankungen spielen Gene die für den MHC-Komplex kodieren und damit festlegen, welche Antigene im Immunsystem präsentiert werden. Sie sind nicht nur für die individuelle Präsentation während einer Immunantwort zuständig, sondern auch für die Präsentation von Selbstantigenen (z.B. Myelinantigenen) während der

Thymusentwicklung und somit für die positive oder negative Selektion von autoreaktiven und regulatorischen T-Zellen.

Einen weiteren Einfluss stellen Umweltbedingungen dar; so können von grampositiven Bakterien gebildetes LPS, Mykobakterien, Viren und Toxine eine Immunreaktion auf ein Fremd- oder Selbstantigen wesentlich verbessern. Sie stimulieren als Adjuvans die Reifung und Präsentationsfähigkeit von professionell antigenpräsentierenden Zellen und fördern die Wanderung von DZ in die lymphoiden Organe zur T-Zellaktivierung (CHILLER et al. 1973; KEARNEY et al. 1994; VELLA et al. 1997).

Einige Autoimmunerkrankheiten zeigen zudem eine eindeutige geschlechtsspezifische Häufung, womit ein Zusammenhang zwischen dem Hormonstatus eines Individuums und Autoimmunerkrankungen zu bestehen scheint (JANEWAY 1997).

Des Weiteren gibt es den Prozess der molekularen Mimikry, bei dem ein Antigen eines Mikroorganismus einem Selbstantigen ähnelt und so eine kreuzreaktive Autoimmunantwort induzieren kann (OLDSTONE 1998).

2.4 Experimentelle Autoimmun-Enzephalomyelitis (EAE) als T_H1-vermittelte Autoimmunerkrankung

Die EAE ist ein gut untersuchtes Tiermodell für immunologische, demyelinisierende Krankheiten beim Menschen wie z.B. Multiple Sklerose (MS) (STEINMAN 1996; WEKERLE 1998). Es ist eine durch T_H1-Zellen vermittelte Autoimmunerkrankung des ZNS, welche histologisch durch entzündliche perivaskuläre Infiltrate im ZNS gekennzeichnet ist und sich klinisch, initial durch Druck auf die Myelinscheiden, welcher durch zunehmende Ödematisierung ausgelöst wird, später durch eine Demyelinisierung der Axone, in einer fortschreitenden Lähmung äußert. Die Autoimmunreaktion ist dabei gegen ganz bestimmte Komponenten der Myelinscheide gerichtet: Myelin Basisches Protein (MBP), Myelin assoziiertes Glykoprotein (MAG), Myelin-Oligodendroglia-

Glykoprotein (MOG) und das Proteolipidprotein (PLP) (NOSEWORTHY et al. 2000; O'CONNOR et al. 2001) .

2.4.1 Induktion der EAE im Versuchstier Maus

Zur Induktion der EAE nutzt man abhängig vom Haplotyp des jeweils verwendeten Mausstammes verschiedene Proteine oder deren Peptide (Tab. 1).

Tab. 1: *EAE-empfindliche Mausstämme mit verwendeten enzephalitogenen Peptiden sowie deren typischen Krankheitsverläufe*

Mausstamm	Haplotyp	Myelinkomponente	EAE-Verlauf
C57BL/6	H-2 ^b	MOG ₃₅₋₅₅ MOG-Protein	Monophasisch progressiv, chronisch
SJL	H-2 ^s	MOG ₉₂₋₁₀₆ MBP ₈₉₋₁₀₁ MBP ₈₄₋₁₀₄ PLP ₁₃₉₋₁₅₁ PLP ₁₇₈₋₁₉₁	Progressiv mit teilweiser Stabilisierung und evt. Rückfällen
PL/J	H-2 ^u	MOG ₃₅₋₅₅ MBP ₃₅₋₄₇ PLP ₄₃₋₆₄	Akut, selbst limitierend, keine Rückfälle
C3H	H-2 ^k	PLP ₁₀₃₋₁₁₆	
SWR	H-2 ^q	PLP ₂₁₅₋₂₃₂	

Zur *aktiven* EAE-induktion wird das Myelinantigen als Peptid oder als Protein in kompletten Freund'schen Adjuvans („complete Freund's adjuvans“, CFA) emulgiert und anschließend subkutan („subcutaneous“, s.c.) injiziert. CFA besteht aus einer Mineralölfraction, welche inaktivierte Mykobakterien enthält. Zusätzlich wird Pertussis Toxin (PT) intraperitoneal injiziert. Bei diesem Vorgang werden autoreaktive T_H1-Zellen aktiviert, welche ins ZNS einwandern und die Myelinscheide angreifen (OWENS et al. 1998). Die alleinige Injektion von Myelin-Antigenen emulgiert in Adjuvans, ohne Mykobakterien und PT, führt zwar zu einer peripheren T-Zellaktivierung, eine Auslösung der EAE bleibt jedoch aus (BRABB

et al. 1997). Für die *passive* Induktion der EAE werden aktivierte enzephalitogene T-Zellen eines EAE-erkrankten Tieres in naive Tiere transferiert, welche dann innerhalb weniger Tage erkranken (BERNARD et al. 1992; WEKERLE et al. 1994).

2.4.2 Zellen und Zytokine bei der EAE

Nach bisherigen Erkenntnissen sind mehrere Zelltypen im Geschehen der EAE involviert. Schlüsselfigur sind in der Peripherie aktivierte autoreaktive T_H1 -Zellen, die in der akuten Phase der EAE über die Blut-Hirn-Schranke (BHS) ins ZNS einwandern. Eine zentrale Rolle kommt außerdem dem Zytokin IL-12 zu.

Sowohl in der angeborenen als auch in der adaptiven Immunität ist IL-12 herausragend (TRINCHIERI 1998; ADORINI et al. 1996; MA et al. 1996). IL-12 besteht als Heterodimer aus zwei kovalent gebundenen Untereinheiten, p35 und p40. Während die p35 Untereinheit allein nicht sezerniert werden kann und auch keine biologische Wirksamkeit zeigt, ist die p40 Untereinheit in mehrerer Hinsicht biologisch aktiv. Als Homodimer ist das p40 Molekül ein potenter kompetitiver Antagonist von IL-12 Heterodimer (HEINZEL et al. 1997; GILLESSEN et al. 1995; MATTNER et al. 1993; KATO et al. 1996). HA et al. (1999) wiesen zudem dem p40 Molekül eine chemotaktische Wirkung auf Makrophagen nach. Weitere Mitglieder der IL-12 Familie sind das IL-23, welches aus der p40 Untereinheit und der p19 Untereinheit besteht und von aktivierten Makrophagen und DZ produziert wird (OPPMANN et al. 2000; BROMBACHER et al. 2003). Im Gegensatz zu IL-12 hat das murine IL-23 keinen Einfluss auf naive T-Zellen, vielmehr aktiviert es sogenannte T_H17 -Zellen, welche sich vor allem durch die Produktion von IL-17 auszeichnen (BROMBACHER et al. 2003; LANGRISH et al. 2005). CUA et al. (2003) zeigten, dass nicht IL-12, sondern IL-23 das entscheidende Zytokin für die Entzündung im ZNS im Geschehen der EAE ist.

IL-27 ist das zuletzt entdeckte Zytokin, welches zur IL-12 Familie gehört. Bestehend aus dem Epstein-Barr-Virus induziertem Gen 3 (EBI3), welches Homologie zur p40-Untereinheit hat, und der p28 Untereinheit, ist es beteiligt an der frühen Induktion einer T_H1 -Immunantwort (BROMBACHER et al. 2003).

Die wichtigsten Quellen von IL-12 stellen Monozyten, Makrophagen und DZ dar, aber auch Granulozyten und B-Zellen können nach Stimulation IL-12 produzieren (TRINCHIERI 1998). Die IL-12 Wirkung findet sich vor allem an T- und NK-Zellen, die nach IL-12 Stimulation eine Reihe von Effekten zeigen, u.a. eine verstärkte Proliferation, die Aktivierung von NK-Zellen und erhöhte zytotoxische Aktivität von NK- und CD8-Zellen. Weiterhin bedingt die IL-12-Stimulation von CD4-Zellen während der Antigenpräsentation die Entwicklung eines T_H1-Phänotyps dieser T-Zellen. Ein sehr wichtiger Effekt ist schließlich die IL-12-induzierte Produktion von IFN- γ durch T- und NK-Zellen, schließt sich hierdurch doch ein hochwirksamer positiver Rückkopplungsmechanismus, da IFN- γ wiederum die IL-12 Produktion in Makrophagen, DZ u.a. steigert (TRINCHIERI 1997; TRINCHIERI 1998). Die Bedeutung von IL-12 im Rahmen der EAE ist groß. So wurden eine zerebrale IL-12 Expression im ZNS von Multiple Sklerose Patienten (WINDHAGEN et al. 1995) und ebenso im ZNS EAE-erkrankter Mäuse (OWENS et al. 1998; BRIGHT et al. 1998) nachgewiesen. Neben infiltrierenden Immunzellen exprimieren ebenso hirneigene Zellen wie Mikrogliazellen und Astrozyten IL-12 (STALDER et al. 1997; ALOISI et al. 1997; CONSTANTINESCU et al. 1996).

Die Relevanz von IL-12 im Rahmen der EAE wird vor allem durch Beobachtungen belegt, dass die Gabe von IL-12 Antikörpern die EAE-Symptome erheblich abschwächen und IL-12 KO Mäuse resistent gegen EAE sind (LEONARD et al. 1995; LEONARD et al. 1996; SEGAL et al. 1998).

Das ZNS galt lange als vom Immunsystem vollkommen abgeschirmt. Zwar stellt die Blut-Hirn-Schranke (BHS) tatsächlich eine starke Barriere dar und die Expression von Oberflächenmolekülen mit immunologischer Funktion auf Neuronen oder Gliazellen fehlt oder ist nur gering, dennoch kontrollieren im physiologischen Zustand naive und auch vereinzelte aktivierte Lymphozyten das ZNS (HICKEY et al. 1991; HICKEY 1991). Im pathologischen Zustand findet eine Hochregulierung der verschiedensten Oberflächenrezeptoren wie MHC, „Intercellular adhesion molecules“ (ICAMs), kostimulatorischer Moleküle (RIDET et al. 1997) sowie Zytokinen (OWENS et al. 1994; HOPKINS und ROTHWELL 1995), Chemokinen und deren Rezeptoren statt (GLABINSKI und RANSOHOFF 1999; ASENSIO und CAMPBELL 1999).

Die BHS wird auf der einen Seite von Kapillarendothelzellen, welche durch ICAMs verbunden sind, und auf der anderen Seite von perivaskulären Gliastrukturen gebildet. Selektine suchen gezielt Immunzellen aus dem Blut aus, welche geeignet scheinen, das ZNS zu kontrollieren. Chemokine locken durch ihre chemotaktische Wirkung die vorher selektierten Immunzellen an und verbinden sich mit den chemotaktischen Chemokin-Rezeptoren (CCRs), welche auf deren Zelloberfläche exprimiert werden. Durch diese Verbindung verlangsamen die Immunzellen ihre Fließgeschwindigkeit und nähern sich dem Kapillarendothel an („Rolling“). Aktivierte T-Lymphozyten tragen auf ihrer Oberfläche „Very late antigen“-4 Moleküle (VLA-4), diese verbinden sich mit „Vascular cell adhesion“-1 Molekülen (VCAM-1), welche sich auf der Oberfläche der Gefäßendothelzellen befinden. Durch Eingehen dieser festen Bindung werden die T-Lymphozyten angeregt die BHS zu durchdringen. Zu diesem Zweck produzieren sie Matrix-Metalloproteinasen (MMP), welche gezielt die ICAM-Verbindungen der Endothelzellen untereinander aufbrechen können (MALIK et al. 1996; GOETZL et al. 1996). MMPs verdauen zudem Myelinproteine (GIJBELS et al. 1993; CHANDLER et al. 1995). Eine gesteigerte Aktivität von MMP's wurde in MS-Patienten während eines akuten Schubes gemessen. Erhöhte Werte fanden sich auch bei EAE-erkrankten Tieren (GIJBELS et al. 1992; MAEDA und SOBEL 1996; CUZNER et al. 1996; CLEMENTS et al. 1997).

Die Durchwanderung der BHS wird durch die nachfolgende lokale Entzündung im ZNS noch wesentlich verstärkt, große Bedeutung hat das T_H1-Zytokin IFN- γ , welches zu einer verstärkten Expression von Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen führt (TRUPP et al. 1997). Eine Reaktivierung erfahren ins ZNS eingewanderte T-Zellen bereits perivaskulär, wo sessile APZ wie Astrozyten, Mikrogliazellen und Makrophagen Myelinantigene über MHC-II Moleküle präsentieren. Der Einfluss der proinflammatorischen Zytokine IFN- γ und TNF- α führt noch zu einer verstärkten MHC-II Expression und Autoantigenpräsentation durch APZ (WINGERCHUK 2001). Naive, im ZNS patrouillierende T-Zellen werden zu T_H1-Zellen aktiviert und Makrophagen weiter rekrutiert. Zytotoxische T-Zellen werden durch verstärkte Expression über MHC-I Rezeptoren stimuliert (LEE 1999).

Ein Teil der Zerstörung der Myelinscheide wird durch die myelintoxischen Zytokine IFN- γ und TNF- α vermittelt, welche in den myelinbildenden Oligodendrozyten Apoptose induzieren. Durch die Produktion oxidativer Radikale wie Stickstoffmonoxid (NO) und Wasserstoffperoxid (H₂O₂) durch APZ, erfolgt die Demyelinisierung mittels Lipidperoxidation (TRAPP 1999). Durch Zerstörung der Myelinscheide fällt Detritus an, der von den ZNS-Makrophagen phagozytiert und erneut T-Zellen präsentiert wird, womit die Entzündungsreaktion voranschreitet.

Immunhistopathologisch zeigen sich perivaskulär und parenchymal lokalisierte Zellinfiltrate aus CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen in der weißen Substanz des Nervensystems.

2.4.3 Mycobacterium tuberculosis (MT) bei der EAE und die Wirkungen auf DZ

MT wird bei der *aktiven* Induktion der EAE in hitzeinaktivierter Form verwendet. Als Bestandteil des CFA ist es in der subkutan injizierten Emulsion enthalten und induziert in DZ und Makrophagen die Synthese von IL-12, welches zu einer ausgeprägten T_H1-Antwort führt (MUTIS et al. 1993).

MT beinhaltet u.a. die Glykolipide Trehalose dimycolate (TDM) und Lipoarabino-mannans (LAM) und das „heat-shock-protein“ (HSP), außerdem enthält es Cytosine-phosphorothioate-guanin Oligodeoxynucleotide (CpG-ODN) (BILLIAU und MATTHYS 2001).

Die Glykolipide sind Bestandteil der Zellwand von Mykobakterien und werden unabhängig von MHC-Molekülen über ein CD1-Oberflächenmolekül NKT-Zellen präsentiert, welche durch starke Produktion von IFN- γ und niedrige Sekretion von IL-4 und IL-10 die Immunantwort deutlich beeinflussen können (GONG et al. 1998).

CpG-ODN aktiviert das angeborene Immunsystem und führt zur Reifung und Aktivierung von APZ. Nach Injektion einer CpG-IFA Emulsion ist CpG in der Lage eine ebenso starke T_H1-Antwort zu induzieren, wie es nach der Injektion einer CFA-Emulsion induziert wird (CHU et al. 1997). Im Rahmen der Induktion der Autoimmunhepatitis ist CpG nach intraperitonealer Injektion zum Einen

ausschlaggebend für die Infiltration von T-Zellen ins Leberparenchym, zum Anderen verantwortlich für die Hochregulation von Oberflächenmolekülen auf Hepatozyten, so dass infiltrierende CD8⁺ T-Zellen schneller und gezielter die Zerstörung der Leberzellen forcieren können (SACHER et al. 2002).

2.4.4 Pertussis Toxin (PT) bei der EAE und die Wirkungen auf DZ

PT ist das Toxin von *Bordetella pertussis*, einem gramnegativen Stäbchenbakterium. Es besteht aus einer zellständigen und einer enzymatisch aktiven Untereinheit, welche intrazellulär ablaufende Signalprozesse über G-Proteine irreversibel unterbricht und somit seine Wirkung erzielt (BURNETTE 1997). Im Rahmen der EAE-Erkrankung verstärkt PT die Ausprägung der Krankheitssymptome indem es an der Blut-Hirn-Schranke zu einer Erhöhung der vaskulären Permeabilität und zur Induktion enzephalitogener autoreaktiver T-Zellen führt (YONG et al. 1993; LINTHICUM et al. 1982).

In seiner Eigenschaft als Adjuvans führt PT zu einer Erhöhung sowohl der T_H1- als auch der T_H2-Immunantworten, abhängig vom koinjizierten Antigen (SHIVE et al. 2000; RYAN et al. 1998; SAMORE und SIBER 1996; MU und SEWELL 1994). HOFSTETTER et al. (2002) glauben, dass der Effekt von PT durch Aktivierung von APZ in lymphatischen Geweben und im ZNS realisiert wird.

2.5 Die Rolle DZ bei der Induktion von Autoimmunität

DZ sind in der Lage nach Autoantigenpräsentation autoaggressive T-Zellen zu aktivieren und somit eine Autoimmunerkrankung zu induzieren. ERIKSSON et al. (2003) gelang die Induktion der Experimentellen autoimmunen Myokarditis (EAM) in Mäusen nach Aktivierung CD4⁺ T-Zellen durch Selbstantigen-präsentierende DZ.

WEIR et al. (2001) beschreibt eine schwache Induktion der EAE durch MOG₃₅₋₅₅-Peptid-präsentierende BM-DZ.

Verschiedene Autoren wiesen nach, dass DZ, welche das CD8 α Homodimer exprimieren, T_H1-Immunantworten initialisieren. Dagegen forcieren CD8 α ⁻ DZ vermehrt die Entwicklung von T_H2-Immunantworten (RISSOAN et al. 1999; MALDONADO-LOPEZ et al. 1999; PULENDRAN et al. 1999).

LEGGE et al. (2002) zeigten, dass Mäuse klinische Symptome der EAE entwickelten, nachdem diese mit Proteolipidprotein (PLP) inkubierten CD8 α ⁺ DZ subkutan injiziert wurden. Kontrolltiere, die nach gleichem Protokoll mit CD8 α ⁻ DZ injiziert wurden, erkrankten nicht.

3 Material und Methoden

3.1 Versuchstiere

Alle Versuchstiere wurden unter spezifiziert pathogen freien Bedingungen in standardisierten einzelbelüfteten Käfigen (Techniplast, Hohenpeissenberg) in der Maushaltung der Dermatologischen Klinik der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg gehalten. Die Ernährung erfolgte *ad libitum* mit autoklaviertem Futter und Wasser.

3.1.1 Mausstämme

C57BL/6-Mäuse

Zum großen Teil wurden für die im Rahmen dieser Dissertation durchgeführten Versuche Tiere des C57BL/6-Mausstammes verwendet, welche aus eigener Zucht stammten oder von Charles River (Sulzfeld) bezogen wurden.

SJL-Mäuse

Für einige Versuche wurden weibliche SJL-Mäuse von Harlan (Walsrode) bezogen.

IL-10 defiziente Mäuse

Einige Versuche wurden mit IL-10 defizienten Mäusen (KUHN et al. 1993) durchgeführt, welche freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. Werner Müller (Institut für Genetik, Köln) zur Verfügung gestellt wurden.

MOG-TCR transgene Mäuse

Dieser Mausstamm wurde eigens von Herrn Dr. Tjalf Ziemssen (Institut für Neurologie, Dresden) gezüchtet und freundlicherweise für einige Experimente zur Verfügung gestellt (BETTELLI et al. 2003).

IL-12 transgene Mäuse

Für einige Versuch wurden IL-12p40/p35 doppelt transgene Mäuse von Herrn Dr. Axel Pagenstecher (Institut für Neuropathologie, Freiburg) genutzt (PAGENSTECHER et al. 2000).

3.1.2 Genehmigung der Tierversuche

Die am Tier vorgenommenen Immunisierungen, Tötungen und Organentnahmen wurden bei der Gesundheitsbehörde der Stadt Erlangen entsprechend dem Tierschutzgesetz angezeigt.

Die Genehmigung zur Durchführung der Tierversuche wurde unter dem Aktenzeichen 621-2531.31-11/98 vom Regierungspräsidium Mittelfranken in Ansbach am 15.12.1998 erteilt.

3.2 Standardlösungen, Puffer und Medien

Sämtliche Reagenzien und Chemikalien wurden von den jeweils aufgeführten Firmen bezogen. Dabei entsprachen alle Chemikalien mindestens dem Reinheitsgrad „reinst“. H₂O wurde stets als Reinstwasser aus einer Deionisationsanlage Milli-Q Plus PF (Millipore, Eschborn) mit einem spezifischem Widerstand von 18,2 MΩ/cm³ für die Herstellung aller Lösungen, Puffer und Verdünnungen verwendet.

Carbonatpuffer (pH 9,5)

8,4 g NaHCO₃ (Merck, Darmstadt)

3,56 g Na₂CO₃ (Merck, Darmstadt)

Reagenzien auf 1000 ml mit H₂O auffüllen und auf den pH-Wert 9,5 einstellen.

Einfriermedium (50ml)

45 ml hitzeinaktiviertes FKS, steril filtriert
(PAA Laboratories, Parsching, Österreich)

5 ml Dimethylsulfoxid (Sigma, Deisenhofen)

ELISA-Waschpuffer

100 ml 10 x „phosphate buffer saline“ (Phosphatpuffer, PBS)

1 ml Tween-20 (Sigma, Deisenhofen)

900 ml H₂O

Erythrozyten-Lyse-Puffer (50 ml)

25 ml 1,6 % NH₄Cl (Sigma, Deisenhofen)

25 ml 1 x PBS

FACS-Puffer (1000 ml)

100 ml 10 x PBS

50 ml hitzeinaktiviertes FKS, steril filtriert

10 ml 10% NaN₃ (Merck, Darmstadt)

840 ml H₂O

Formaldehydlösung, 2% ig (100 ml)

5,4 ml	Formaldehyd, 37% (Roth, Karlsruhe)
96,6 ml	1 x PBS

HL-1 Medium (komplett)

500 ml	HL-1-Medium (BioWhittaker, Verviers, Belgien)
100 U/ml	Penicillin (Sigma, Deisenhofen)
100 µg/ml	Streptomycin (Sigma, Deisenhofen)
2 mM	L-Glutamin (Sigma, Deisenhofen)
50 µM	2-Mercaptoethanol (Sigma, Deisenhofen)

MACS-Waschpuffer

100 ml	10 x PBS
50 ml	hitzeinaktiviertes FKS, steril filtriert
900 ml	H ₂ O

10 x PBS

1,37 M	NaCl (Merck, Darmstadt)	
27 mM	KCl (Roth, Karlsruhe)	
43 mM	Na ₂ HPO ₄ (Sigma, Deisenhofen)	
14 mM	KH ₂ PO ₄ (Sigma, Deisenhofen)	pH auf 7,4 einstellen.

Sodium-Phosphatpuffer (pH 6,5)

11,8 g	Na ₂ HPO ₄
16,1 g	NaH ₂ PO ₄ (Merck, Darmstadt)

Zellkulturmedium (R10-Medium)

500 ml	RPMI 1640 (BioWhittaker, Verviers, Belgien)
50 ml	hitzeinaktiviertes FKS, steril filtriert
100 U/ml	Penicillin
100 µg/ml	Streptomycin
2 mM	L-Glutamin
50µM	2-Mercaptoethanol

3.3 Spezielle Reagenzien**3.3.1 Stimulantien, Zytokine und Antigene**Tab. 2: *Stimulantien*

Stimulantien	Konzentration	Quelle
CpG 1668	5 nmol/ml	MWG, TIB Molbiol
IFN- γ	1 µg/Tier	PeptoTech
IL-2	500 U/ml	Chiron
IL-12	1 µg/Tier	PeptoTech
LPS (<i>E. coli</i>)	1 µg/ml	Sigma
MOG-Protein	100 µg/ml	T. Ziemssen, Dresden
MOG-Peptid ₃₅₋₅₅	10 µM	Sigma Genosys
MT (H37Ra)	50µg/ml	BD Bioscience
PT	1µg/ml	List/Quadragech
TNF- α	500 U/ml	PeptoTech

(MWG, Ebersberg; TIB Molbiol, Berlin; PeptoTech/TEBU, Cölbe; Chiron, Marburg; Sigma, Deisenhofen; Sigma Genosys, Cambridge, UK ; BD Bioscience, San Diego, CA, USA; List/Quadragech, Epsom, Surrey, UK)

3.3.2 Antikörper gegen Mausantigene

Tab. 3: Antikörper gegen murine Zelloberflächenantigene (FACS-Analyse)

Antigen	Klon	Konjugat	Isotyp	Konzentration	Quelle
CD4	RM4-5	FITC	rat IgG2a	1:100	BD Pharmingen
CD8	53-6.7	FITC	rat IgG2a	1:100	BD Pharmingen
CD11c	HL-3	FITC	ham IgG	1:100	BD Pharmingen
CD11c	N418	Überstand	ham IgG	unverdünnt	BD Pharmingen
CD25	7D4	FITC/PE	rat IgG2a	1:100	BD Pharmingen
CD40	3/23	unkonjugiert	rat IgG2a	1:100	BD Pharmingen
CD44	IM7	FITC	rat IgG2b	1:100	BD Pharmingen
CD45RB	16A	FITC/PE	rat IgG2a	1:100	BD Pharmingen
CD62L	MEL-14	PE	rat IgG2a	1:100	BD Pharmingen
CD69	H1.2F3	PE	ham IgG	1:100	BD Pharmingen
CD80	16-10A1	FITC	ham IgG	1:100	BD Pharmingen
CD86	GL-1	FITC	rat IgG2b	1:100	BD Pharmingen
MHC II	M5-114	PE	rat IgG2b	1:250	BD Pharmingen

(BD Pharmingen, Heidelberg)

Tab. 4: Isotypkontroll-Antikörper

Isotyp	Klon	Konjugat	Konzentration	Quelle
rat IgG1	R3-34	PE	1:100	BD Pharmingen
rat IgG2a	R35-95	FITC/Bio/PE	1:100	BD Pharmingen
rat IgG2b	A95-1	FITC/PE	1:100	BD Pharmingen
ham IgG	C235-2356	FITC/PE	1:100/1:50	BD Pharmingen

(BD Pharmingen, Heidelberg)

Tab. 5: Apoptose-Färbung

Antigen	Konjugat	Konzentration	Quelle
Annexin V	FITC	1:40	Bender MedSystems
Propidiumjodid	PE	1:20	Bender MedSystems

(Bender MedSystems, Wien, Österreich)

Material und Methoden

Tab. 6: Antikörper zur immunhistologischen Färbung gegen Mausantigene im ZNS

Antigen	Klon	Konjugat	Isotyp	Konzentration	Quelle
CD45	30G12	Überstand	rat IgG	unverdünnt	L. Sorokin
panLam	-	unkonjugiert	Kaninchen-Serum	1:1000	L. Sorokin

(freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. L. Sorokin, Lund, Schweden)

Tab. 7: Sekundärantikörper

Antigen	Klon	Konjugat	Isotyp	Konzentration	Quelle
rat IgG	-	Alexa 555	anti rat IgG	1:2000	Molecular Probes
rabbit IgG	-	FITC	anti rabbit IgG	1:200	Molecular Probes

(Molecular Probes Europe BV, Leiden, Niederlande)

Tab. 8: Antikörper

Antigen	Klon	Konjugat	Isotyp	Konzentration	Quelle
CD25	PC61	-	-	Aszites	M. Moser

(freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Frau Dr. M. Moser, Brüssel, Belgien)

3.4 Zellkulturmethoden

3.4.1 Allgemeine Arbeitstechniken mit Zellen

3.4.1.1 Handhabung von Zellen

Sämtliche Arbeiten mit Zellkulturen wurden unter Sterilwerkbänken durchgeführt. Benötigte Materialien wurden vor dem Verbringen in den sterilen Bereich in geschlossenen Behältern autoklaviert. Die Aufbewahrung der lebenden Zellen vor der Weiterverarbeitung erfolgte stets auf Eis. Die Zellen wurden für 5 min in der auf 4°C vorgekühlten Zentrifuge (Megafuge 2.OR, Heraeus, Hanau) bei 1200 rpm zentrifugiert.

3.4.1.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zum Einfrieren wurden 1,8 ml-Polyethylenröhrchen (Nunc, Wiesbaden) benutzt, die vor Überführung der Zellen bereits auf Eis gestellt wurden. Die Zellen wurden auf $1,5 \times 10^7$ Zellen/ml eingestellt, in eiskaltem Einfriermedium aufgenommen und anschließend langsam auf -70°C gekühlt. Nach 24 h wurden die Röhrchen in flüssigen Stickstoff transferiert, um eine optimale Aufbewahrung zu erreichen.

Zum Auftauen wurden die Aliquots in einem 37°C warmen Wasserbad aufgetaut und schnell in warmes Kulturmedium überführt. Nach einem Zentrifugationsschritt wurden die Zellen gezählt und weiter bearbeitet.

3.4.1.3 Zellzählung und Vitalitätsbestimmung

Aus der Zellsuspension wurden 25 µl steril entnommen und mit 25 µl einer 0,4%igen Trypanblaulösung (Sigma, Taufkirchen) versetzt und die Zelldichte in einer Neubauerzählkammer unter dem Lichtmikroskop bestimmt. Der Farbstoff durchdringt die poröse Membran toter Zellen, weshalb diese sich selektiv blau anfärben und bei der Zählung außer Acht gelassen werden können.

3.4.1.4 Gewinnung von murinem GM-CSF Kulturüberstand

Um GM-CSF angereicherten Kulturüberstand zu gewinnen, wurde eine mit dem GM-CSF Gen transfizierte Plasmazytom-X63-Ag8-Zelllinie verwendet. Diese wurde freundlicherweise von Prof. Dr. Gray und Prof. Dr. Stockinger zur Verfügung gestellt (London, Großbritannien) (ZAL et al. 1994).

Nach Auftauen wurden die Zellen in 20 ml R10-Medium in Zellkulturschalen transferiert. Nach zwei bis vier Tagen Kultivierung wurden die Zellen aufgenommen, zentrifugiert und anschließend in 100 ml frischem R10-Medium aufgenommen und auf Zellkulturflaschen verteilt. Nach etwa drei bis vier Tagen, nachdem das Medium aufgrund des pH-Wertes einen typischen orange-gelben Farbton angenommen hatte, wurden 80 ml der Zellsuspension bei 3000 rpm und 4°C für 15 min zentrifugiert (Megafuge 2.OR, Heraeus, Hanau) und der gewonnene Zellüberstand in sterile Gefäße überführt. Die restlichen 20 ml der Zellsuspension wurden wieder auf 100 ml mit frischem R10-Medium eingestellt und für weitere drei bis vier Tage kultiviert um erneut GM-CSF Überstand zu gewinnen.

Vor Verwendung zur Generierung von Knochenmarks DZ, wurde der GM-CSF Kulturüberstand steril filtriert. Die Zellen wurden entsprechend den Vorschriften der Gentechnik-Verordnung (GVO) entsorgt.

Zehn Prozent von dem GM-CSF Kulturüberstand entsprechen, bezogen auf die Ausbeute an DZ, in etwa 200 U/ml rekombinanten GM-CSF (PeproTech, Cölbe).

3.4.2 Spezielle Arbeitstechniken mit Zellen

3.4.2.1 Knochenmarkspräparation und Generierung von DZ

Zur Gewinnung von Knochenmarkszellen wurden zunächst Femur und Tibia einer getöteten Maus freipräpariert. Anschließend wurde der Femurkopf durch Drehbewegungen luxiert, Muskeln und Bänder mittels Scherenschlag durchtrennt, und das Hinterbein komplett vom restlichen Tierkörper getrennt. Femur und Tibia wurden getrennt, die am Knochen anliegenden Muskeln, Faszien und Bänder

konnten mit Hilfe von Papiertüchern unsteril entfernt werden. Danach wurden die so gesäuberten Knochen für etwa 2 min mit 70% Ethanol in einer Zellkulturschale desinfiziert, um eine anschließende Kontamination der Knochenmarkskultur durch vereinzelte, noch außen am Knochen anhaftenden Gewebszellen zu vermeiden. Der Knochen wurde in den Epiphysen eröffnet, das Knochenmark mit PBS unter Verwendung einer Spritze und einer Kanüle (0,4x19 mm Nr. 20, BD Pharmingen, Heidelberg) steril aus dem Knochen in eine Zellkulturschale gespült. Danach wurden die Knochenmarksklumpchen durch wiederholtes Pipettieren zerkleinert, einmal gewaschen und in R10-Medium aufgenommen. Die Zellausbeute pro Maus betrug zwischen 4 und 6×10^7 Knochenmarkszellen, wobei die Erythrozyten nicht mitgezählt wurden.

Die Gewinnung von DZ aus dem Knochenmark wurde erstmals von INABA et al. (1992) beschrieben. Die praktische Durchführung erfolgte nach der von LUTZ et al. (1999) modifizierten Methode.

Um aus den Knochenmarkszellen DZ zu generieren, wurde die Zelldichte bestimmt, die Zellen in GM-CSF enthaltendes R10-Medium aufgenommen und auf sterile Petrischalen aufgeteilt. Pro Petrischale wurden 2×10^6 Knochenmarkszellen in 10 ml Kulturmedium ausgesät.

Am dritten Tag der Kultivierung wurden pro Petrischale 10 ml Kulturmedium hinzugefügt. Am sechsten und achten Tag wurde jeweils die Hälfte (10 ml pro Petrischale) des Kultur-Überstandes mittels einer Pipette abgenommen, zentrifugiert, und das Zellpellet in frischem Kulturmedium aufgenommen und mit GM-CSF zurück in die Zellkultur gegeben. Die DZ wurden in Abhängigkeit vom Experiment am sechsten oder achten Tag verwendet.

Mittels dieser Methode konnte eine Reinheit der DZ von 50-90% erzielt werden. Bei den restlichen Zellen dieser Mischpopulation handelte es sich vorwiegend um adhärente Makrophagen, Granulozyten (ca. 10%), B-Zellen (5-8%) und T-Zellen (nur etwa 1%).

3.4.2.2 T-Zellpräparation aus Lymphknoten und Milz

Lymphknoten und Milzen wurden unter sterilen Bedingungen entnommen, sofort in eiskaltes PBS (BioWhittaker, Velviers, Belgien) verbracht und anschließend zwischen zwei sterilen Objektträgern (Menzel, Braunschweig) zerrieben. Die so gewonnene Zellsuspension wurde anschließend mit einer Pipette aufgenommen, bei Bedarf durch wiederholtes Pipettieren noch weiter zerkleinert und dann durch ein Zellsieb mit einer Porengröße von 70 μm (Falcon, Heidelberg) gegeben um größere Gewebeanteile von den Lymphozyten zu trennen. Nach zwei Waschgängen wurden die Zellen der Lymphknoten in Zellkulturmedium aufgenommen und gezählt.

Die Milzzellen wurden für 5 min bei 37°C in Erythrozytenlysepuffer geschwenkt, anschließend noch einmal gewaschen und dann ebenfalls in Zellkulturmedium aufgenommen.

3.4.2.3 Antigen-spezifische Restimulation *in vivo* stimulierter T-Zellen

Für Restimulationsversuche wurden 24-Loch und 96-Loch Flachbodenplatten (Falcon, Heidelberg) benutzt und je Probe Triplikate angefertigt.

Zunächst wurde das Antigen in verschiedenen Konzentrationen titriert, dabei wurde in die oberste Reihe das in HL-1 Medium verdünnte Antigen vorgelegt, in die darauffolgenden Reihen wurde reines HL-1 Medium mit dem halben Volumen der obersten Reihe gefüllt. Mit der Mehrkanalpipette wurde anschließend das halbe Volumen der ersten Reihe aufgenommen, in die zweite Reihe gefüllt, gut durchmischt um dann wieder das halbe Volumen aufzunehmen und weiterzuführen. Die Verdünnungsschritte wurden in Zehner oder 30er Potenzen durchgeführt. Nach der Antigentitration wurden die Zellsuspension auf die Platte verteilt. Jede Vertiefung einer 96-Loch Flachbodenplatte wurde mit 2×10^5 T-Zellen in einem Gesamtvolumen von 200 μl befüllt, eine Vertiefung einer 24-Loch Flachbodenplatte wurde mit 1×10^6 Zellen in 1 ml Gesamtvolumen befüllt. Anschließend wurden die Platten bei 37°C im Brutschrank für 72 h inkubiert.

Für einen Großteil der in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Versuche wurde die Restimulation in 96-Loch Flachbodenplatten gewählt, zwei Platten wurden identisch angefertigt. Von der einen Platte wurden die Überstände abgenommen und die Zytokinproduktion der Zellen mittels ELISA ermittelt (vgl. Punkt 3.4.2.4), die andere Platte wurde zur Beurteilung des Proliferationsverhaltens der Zellen durch Zugabe (³H)-markierten Thymidins genutzt (vgl. Punkt 3.4.2.5).

3.4.2.4 Bestimmung der Zytokinkonzentration (ELISA)

Die Zytokinproduktion der T-Zellen konnte in den gewonnenen Überstände mittels kommerziell erhältlicher ELISA-Testsysteme (OptEIA™, BD Pharmingen, Heidelberg) ermittelt werden, wobei in der Regel folgende Zytokine bestimmt wurden: IL-2, IL-4, IL-10, IL-12p40, IL-12p70, TNF-α und IFN-γ.

Die Durchführung erfolgte nach Protokoll des Herstellers. Für jeden Zytokin-nachweis wurde eine Referenzstandardreihe erstellt (Tab. 9). Sowohl die Standards, als auch die einzelnen Proben wurden als Duplikate angefertigt. Für die einzelnen Waschschrte wurde ein Waschpuffer und ein „Columbus-Washer“ genutzt (TECAN, Salzburg, Österreich).

Tab. 9: Referenzstandards

Zytokine	niedrigste Konzentration	höchste Konzentration
IL-2	31,2 pg/ml	2000 pg/ml
IL-4	31,2 pg/ml	2000 pg/ml
IL-10	31,2 pg/ml	2000 pg/ml
IL-12p70	125 pg/ml	8000 pg/ml
IL-12p40	31,2 pg/ml	2000 pg/ml
IFN-γ	62,5 pg/ml	4000 pg/ml
TNF-α	31,2 pg/ml	2000 pg/ml

Das Prinzip des ELISAs ist eine Antigen-Antikörper Reaktion, welche als Farbreaktion sichtbar wird. Dafür wurde zunächst eine 96-Loch Mikrotiterplatte (EIA/RIA, Nr. 3690, Corning/Costar, NY, USA) mit einem gegen das jeweilige

Zytokin gerichteten Antikörpers („capture antibody“) beschichtet. Eine Bindung erfolgt, wenn das jeweilige Zytokin im Überstand vorhanden ist. Im Folgenden wurde das Zytokin mit einem spezifischen biotinylierten Sekundärantikörper markiert. An das Biotin wurde zusätzlich zur Signalverstärkung Streptavidin-gekoppelte „horse-raddish-peroxidase“ (HRP) gebunden, welches als Reaktionssubstrat durch enzymatischen Umbau eine Farbreaktion hervorruft

Die Extinktion wurde bei einer Wellenlänge von 450 nm mit einem Photo-Spektrometer (Multiskan[®] Plus, Labsystems, Frankfurt) gemessen. Durch Vergleich mit den Referenzstandards konnte die Zytokinkonzentration mittels linearer Regressionsanalyse der Messung bestimmt werden. Aus den Duplikaten wurden die Mittelwerte und die einfache Standardabweichung ermittelt, wodurch eine graphische Darstellung möglich war.

3.4.2.5 [³H]-Thymidineinbau

Die Proliferation von antigenspezifisch restimulierten T-Zellen kann *in vitro* mittels Einbau radioaktiv markierten [³H]-Thymidins in der Expansionsphase der Zellen ermittelt werden. Hierzu wurde den Zellen nach 72-stündiger Zellkultur 1 µCi/Vertiefung Methyl-[³H]-Thymidin zugesetzt und für weitere 16-18 h bei den üblichen Bedingungen im Brutschrank inkubiert. Danach wurde der Inhalt der Platte mit Hilfe eines ICH-110 Erntegerät (Inotech, Dottikon, Schweiz) durch einen Glasfaserfilter gesaugt, auf dem die DNS der Zellen zurückblieb. Nach Trocknen und Einbetten des Filters in Szintillationsflüssigkeit enthaltenen Wachses konnte er mittels eines 1450 Mikroplattenzählers (Wallac, Turku, Finnland) eingemessen werden. Aus den jeweiligen Triplikaten wurden die Mittelwerte und die einfache Standardabweichung der Radioaktivitäten in Zerfälle pro Minute („counts per minute“, cpm) errechnet, so das eine graphische Darstellung in Abhängigkeit zur eingesetzten Antigenkonzentration möglich war.

3.4.2.6 Expressionsmessung mittels Durchflusszytometrie (FACS-Analyse)

Zur phänotypischen Charakterisierung von Zellen wurde die Methode der Durchflusszytometrie genutzt. Die Analyse erfolgte an einem Durchflusszytometer (FACScan™, BD Pharmingen). Pro Probe wurden 10000 Ereignisse aufgenommen. Die Auswertung wurde mit dem Computer Programm CellQuest™, Version 3.3 (BD Pharmingen, Heidelberg) durchgeführt.

Grundlage ist bei dieser Methode eine Antikörper-Reaktion gegen zellgebundene Antigene, die mit Fluoreszenzfarbstoff markierten Antikörpern durchgeführt wird. Bei einem Großteil der Versuche sind mehrere Färbeschritte durchgeführt worden. Die Inkubationszeit pro Färbeschritt betrug 30 min, während dieser Zeit wurden die Zellen auf Eis und in Dunkelheit zum Schutz vor photochemischer Inaktivierung der Fluoreszenzfarbstoffe gelagert.

Je Färbung wurden etwa 1×10^6 Zellen zentrifugiert (1200 rpm, 5 min), der Überstand abgesaugt und das Zellpellet nach kurzem Aufschütteln mit 50 µl des jeweiligen Antikörpers versetzt. Bei der direkten Färbung war der Primär-Antikörper (Primär-Ak) bereits mit Fluorochrom konjugiert, bei der indirekten Färbung mussten zwei Färbeschritte durchgeführt werden, um den Primär-Ak, bei dem es sich um einen Zellüberstand oder einen nicht fluoreszierenden Ak handelte, mit einem mit Fluorochrom gekoppelten Sekundär-Ak sichtbar zu machen. Parallel zu jeder Probe wurde eine Isotypkontroll-Färbung durchgeführt um die spezifische Färbung von der unspezifischen Hintergrundfärbung, ausgelöst durch unspezifisch gebundene Antikörper, abgrenzen zu können.

Die Aufbewahrung der gefärbten Zellen bis zur anschließenden Messung erfolgte in FACS-Puffer und auf Eis, zur Fixierung der Färbung konnte FACS-Puffer und 2%-ige Formaldehydlösung zu gleichen Teilen auf die Zellen geschichtet werden und bei 4°C gelagert werden. So war eine Messung noch nach drei Tagen möglich.

Für die Apoptose-Färbung wurde der „Annexin V/FITC Kit“ (Bender MedSystems, Wien, Österreich) verwendet. Die Durchführung erfolgte nach den Angaben des

Herstellers. Die Apoptose ist ein genetisch regulierter Vorgang, mit dem Ziel, die Zellen zu eliminieren. Zunächst kommt es zur Verklumpung des Chromatins und zu einem Schrumpfen der Zelle. Im Anschluss stülpt sich die Zellmembran nach außen („blebbing“) womit Phosphatidylserin nach außen gelangt und mittels Annexin V, welches mit Fluoreszein-Isothiocyanat (FITC) konjugiert wurde, detektiert werden kann. Um die apoptotischen Zellen von den nekrotischen zu unterscheiden, wurde gleichzeitig noch eine Propidiumjodid-Färbung durchgeführt. Bei nekrotischen Zellen ist die Zellmembran durchlässig, so das Propidiumjodid, welches mit Phycoerythrin (PE) konjugiert wurde, in die Zelle eindringen und sich in die DNA einlagern kann.

3.4.2.7 Zellanreicherung durch magnetische Zellsortierung (MACS)

Die Methode der magnetischen Zellsortierung wurde in der vorliegenden Arbeit zur Anreicherung von CD11c⁺ Milzzellen genutzt, da diese nur etwa 3-5% der Gesamtzellen in der Milz ausmachen. Die Anreicherung wurde nach Herstellerprotokoll durchgeführt (CD11c Anreicherung, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach).

Zunächst wurden die Milzen aus C57BL/6-Mäusen herauspräpariert, grob zerkleinert und mittels 1 mg/ml Kollagenase (CellSystems GmbH, St. Katharinen) und 50 U/ml Desoxyribonuklease (Sigma, Taufkirchen) bei Raumtemperatur verdaut. Nach 25 min wurde 100 mM Ethylendiamintetraessigsäure-Lösung (Sigma, Taufkirchen) zur Inaktivierung der Kollagenase hinzugegeben, die Suspension durch ein Zellsieb (70 µm) filtriert und das Filtrat in Waschpuffer gewaschen, zentrifugiert und gezählt.

Nun wurden „MACS-N418-beads“ (1x10⁸ Zellen/400 µl Waschpuffer mit 100 µl beads), welche als Antikörper CD11c⁺ Zellen erkennen, mit den Zellen vermischt und bei 4°C für 15 min inkubiert. Anschließend wurde die Zellsuspension über eine positive Selektionssäule (LS⁺Säule) gegeben, die mit Eisenoxid markierten N418⁺-Zellen blieben in der Säule hängen, und konnten so von den nicht markierten Zellen getrennt werden. Die gewonnenen DZ wurden abschließend mit einem gegen den gebundenen CD11c Antikörper gerichteten und mit PE

konjugierten sekundären Antikörper für 30 min auf Eis inkubiert und mittels Durchflußzytometer in die CD11c⁺ und CD11c⁻ Fraktion unterteilt.

3.4.2.8 Histopathologische Untersuchung von Kryostatschnitten des ZNS

Gehirn und Rückenmark der getöteten Maus wurden aus dem Schädel und der Wirbelsäule freipräpariert und in toto in TissueTec (O.C.T.TM, Sakura, Zolterwonde, Niederlande) luftblasenfrei eingebettet, danach in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70°C gelagert.

Zum Nachweis von Leukozyteninfiltraten mit Hilfe von Antikörpern wurden Serienschnitte von etwa 10 µm Dicke am Kryostaten (Kryocut CM 2000, Leica, Wetzlar) angefertigt, auf Objektträger übertragen und bis zur Färbung bei -20°C aufbewahrt. Als Vorbereitung für die Färbung wurden die Objektträger bei Raumtemperatur etwa 30 min aufgetaut und getrocknet, anschließend die Schnitte mit einem Fettstift zur Abgrenzung umkreist und dann mit 4%igem Paraformaldehyd für 15 min fixiert. Nach Trocknung erfolgten alle weiteren Schritte in einer feuchten Kammer und wurden jeweils bei Raumtemperatur durchgeführt. Zur Vermeidung unspezifischer Bindungen wurden die Schnitte mit 1% BSA in PBS für etwa 10 min abgesättigt. Nach dreimaligem Waschen erfolgte die 30minütige Inkubation mit dem anti-CD45 und dem Pan-Laminin Antikörper. Nach einem weiteren Waschschrift wurden die mit einem Fluorochrom gekoppelten Sekundärantikörper Alexa555 und anti-Rabbit für 30 min auf die Schnitte gegeben. Abschließend wurden die Schnitte nach Einbettung in Fluoromount (21648, Serva, Heidelberg) im Fluoreszenzmikroskop betrachtet.

3.4.3 Spezielle Arbeitstechniken *in vivo*

3.4.3.1 Induktion der EAE

Zur Induktion der EAE in C57BL/6 Mäusen wurde in den in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Versuchen das MOG-Protein oder sein Peptid (MOG₃₅₋₅₅) mit Kompletten Freund'schen Adjuvans („complete Freund's adjuvans“, CFA; Sigma, Taufkirchen), welches 10 mg/ml hitzeinaktiviertes *Mycobacterium tuberculosis* (MT) enthielt, emulgiert. Jeder Maus wurde nach Einstich an der Schwanzwurzel ein Depot von 50 µl links und rechts der Medianen gesetzt. Die Dosis des MOG-Protein betrug somit pro Maus 50 µg. Das MOG-Peptid wurde in einer Konzentration von 100µM pro Tier eingesetzt. Gleichzeitig erhielten die Tiere 200 ng Pertussis Toxin (PT) in 100 µl PBS intraperitoneal injiziert. Diese Injektion wurde nach zwei Tagen nochmal wiederholt.

Die Mäuse erkrankten in der Regel zwischen dem neunten und 14. Tag. Klinisch zeigte sich die Erkrankung anhand fortschreitender Lähmungen. Zur besseren Dokumentation des Krankheitsverlaufes wurden die typischen Krankheits-symptome bestimmten Stärkegraden zugeordnet, so das eine Quantifizierung möglich war (Tab. 10).

Tab. 10: *Einteilung der klinischen Symptome der EAE*

Krankheitsgrad	Klinik
0	Keine Krankheitsanzeichen
1	Schwanz ist gelähmt
2	Schwanz ist gelähmt, Hinterfüße sind teilweise gelähmt
3	Komplette Hinterhandlähmung, Hinterhand fällt auf die Seite
4	Beginnende Lähmung der Vorderfüße
5	An EAE verstorbene Maus

Die Dosen der MOG-Antigene waren in der vorliegenden Arbeit so gewählt, das maximal Krankheitsgrad 3 erreicht wurde und die Tiere sich nach in der Regel 30 Tagen wieder vollständig von der Erkrankung erholt hatten.

3.4.3.2 Antigenbeladung von DZ und Injektion in C57BL/6-Mäuse

Ein Großteil der Versuche der vorliegenden Arbeit wurde wie folgt durchgeführt:

Es wurden vorwiegend weibliche Tiere des C57BL/6-Mausstamms verwendet. Für weiterführende Versuche wurden zusätzlich SJL-Mäuse, IL-10 defiziente Mäuse, MOG-TZR transgene Mäuse und IL-12 transgene Mäuse verwendet.

Variierend wurden zwischen sechs und zehn Tage alte, aus Knochenmark generierte DZ geerntet, aufgenommen und zentrifugiert (1200 rpm, 5 min). Das Zellpellet wurde in R10-Medium aufgenommen, die Zellen gezählt und auf 1×10^7 Zellen pro ml eingestellt. In einer 24-Loch Flachbodenplatte wurde eine Vertiefung mit 200 µg MOG-Protein als Antigen und TNF- α als Reifungsstimulator für die DZ in 1 ml Zellkulturmedium vorbereitet, 1 ml der Zellsuspension zugegeben und für vier Stunden bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

Im Anschluss wurden die Zellen sorgfältig abgeerntet. Die Zellsuspension wurde zentrifugiert, in kaltem PBS aufgenommen und auf eine Zellkonzentration von 4×10^6 DZ pro ml eingestellt. Die Lagerung bis zur Injektion erfolgte auf Eis.

Die Inkubation der DZ und die Injektion derselbigen erfolgte in der Regel dreimal im Abstand von zwei Tagen, mit dem Ziel der optimalen Immunisierung des jeweiligen Tieres.

Die Injektionen wurden mittels 1 ml Spritze (Braun, Melsungen) und Kanüle (0,4 x 19 mm Nr. 20, BD Pharmingen, Heidelberg), vorgenommen, dabei wurde jeweils ein Depot von 50 µl mit 2×10^5 DZ subkutan in beide Fußsohlen der Hinterbeine injiziert.

Zusätzlich wurde den Mäusen am ersten und dritten Tag in Anlehnung an das Protokoll zur Induktion der *aktiven* EAE jeweils 200 ng PT i.p. injiziert.

3.4.3.3 Blutserumgewinnung

Für die Blutentnahme wurden die Tiere durch Inhalation mit Diethylether (Roth, Karlsruhe) betäubt. Mit einer heparinisierten Glaskanüle (Brand, Wertheim) wurde nach vorsichtigem Vorlagern des Auges durch eine behutsame Drehbewegung

das Augenhintergrundgefäß traumatisiert, das Blut floss in ein bereitgestelltes steriles Reaktionsgefäß ab. Auf diese Weise konnten etwa 100 µl Vollblut pro Maus gewonnen werden. Das Gefäß wurde geschlossen und über Nacht bei Raumtemperatur belassen. Am nächsten Tag hatten sich die zellulären Bestandteile abgesetzt, so dass das Serum gewonnen werden konnte. Zur Zytokinbestimmung mittels ELISA (vgl. 3.4.2.4) wurde das Serum im Verhältnis von 1:1 mit PBS verdünnt.

4 Ergebnisse

Bisherige Untersuchungen der EAE zeigten, dass die Aktivierung autoreaktiver T-Zellen den entscheidenden Schritt zur Auslösung der Erkrankung darstellen. Da *in vivo* die antigenspezifische Aktivierung naiver T-Zellen ausschließlich über Dendritische Zellen (DZ) vermittelt wird, spielen diese vermutlich auch bei der EAE-Induktion eine herausragende Rolle.

Gegenstand der im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Experimente war es, diese Rolle der DZ im Geschehen der EAE zu eruieren.

4.1 Einfluss von MT und PT auf Dendritische Zellen

Im Folgenden wurde der Einfluss von hitzeinaktivierten *Mycobacterium tuberculosis* Lyophilisat (MT) und Pertussis Toxin (PT), beides sind wichtige Komponenten zur *aktiven* Induktion der EAE mit Komplettem Freund'schen Adjuvans („complete Freund's adjuvans“, CFA), auf DZ untersucht.

4.1.1 Knochenmarks-DZ Reifung

In vitro aus Knochenmarksvorläuferzellen generierte unreife DZ, wurden am sechsten Tag mit verschiedenen Konzentrationen von MT und PT für 24 Stunden inkubiert. Als Kontrolle blieb ein Teil der Zellkultur unbehandelt, ein anderer Teil wurde mit den klassischen DZ-Reifungsstimuli, TNF- α oder LPS, kultiviert. Nach Färbung mit fluoreszierenden Antikörpern konnte die Expression der DZ-Oberflächenmoleküle MHC-II und CD86 (B7-2) am Durchflußzytometer gemessen werden (Abb. 4).

Die Messung ergab, dass die Zugabe von MT und PT in Abhängigkeit von deren Konzentration zur Reifung der DZ führte.

Während die Population der unbehandelten Zellen zu 39% aus spontan reifen DZ bestand, lag der Anteil reifer DZ bei der mit 1 µg/ml PT und 10 µg/ml MT inkubierten Kultur bei 77%. MT und PT zeigten somit ein ähnliches Reifungsstimulusverhalten wie TNF-α oder LPS.

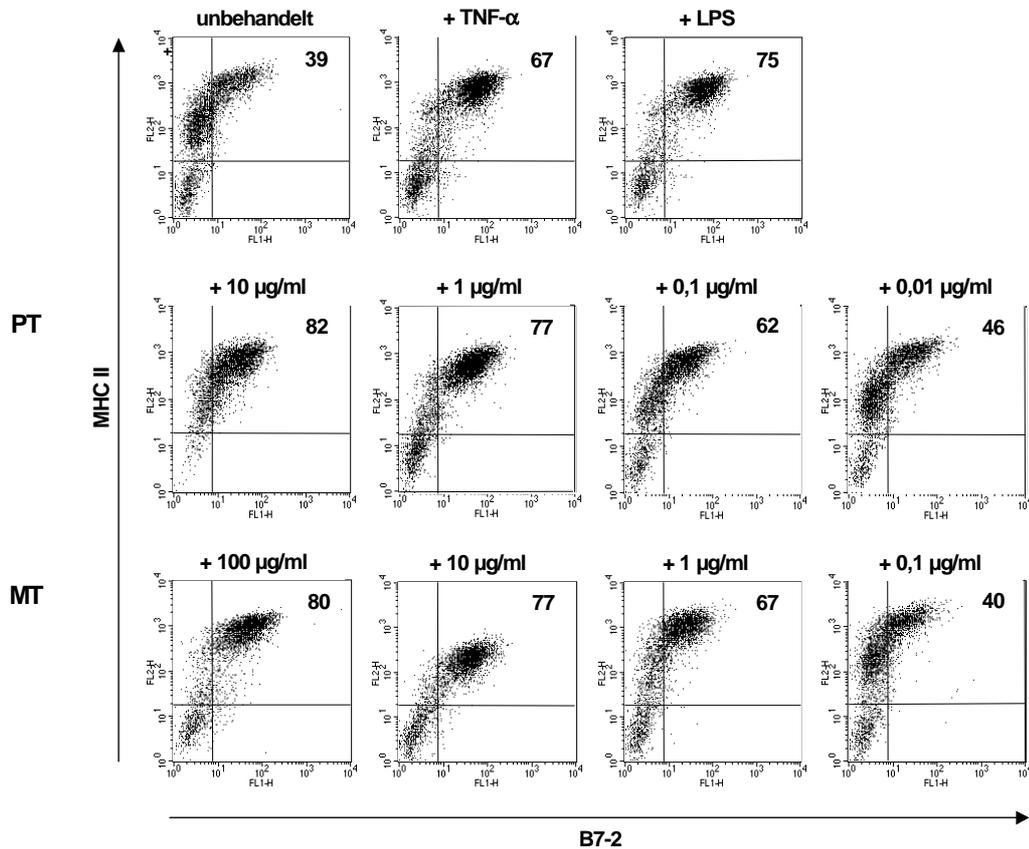


Abb. 4: **MT und PT induzieren konzentrationsabhängig die Reifung von DZ** Nach 24-stündiger Inkubation unreifer, aus Knochenmark generierter DZ mit unterschiedlichen Konzentrationen von MT und PT wurden diese für 30 min mit FITC markierten Antikörpern gegen MHC-II und CD86 gefärbt. Anschließend wurde die Expression der für reife DZ typischen Oberflächenmoleküle am Durchflußzytometer gemessen

Nach Inkubation der DZ mit 10 µg/ml PT bzw. 100 µg/ml MT konnte der Anteil der reifen DZ bis auf 80 % gesteigert werden.

Um den Einfluss von MT und PT auf die Lebensdauer der einzelnen DZ zu ermitteln, wurden, wie bereits im vorangegangenen Versuch, unreife DZ mit verschiedenen Konzentrationen MT und PT beladen und kultiviert. Nach sechs, 24 und 48 Stunden wurde neben der Färbung der DZ-Oberflächenmoleküle eine Apoptosefärbung mit Annexin V vorgenommen. Abbildung 5 zeigt die Färbung nach 24-stündiger Inkubation.

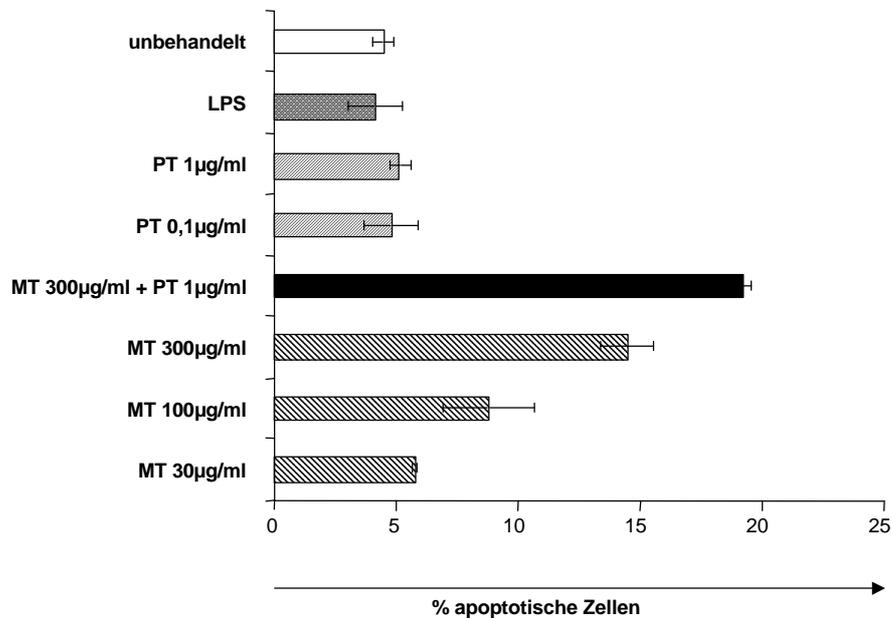


Abb. 5: **Während PT keinen Einfluss auf die Lebensdauer von DZ hat, induziert MT in hoher Konzentration die Apoptose in DZ** Für die Apoptosefärbung wurden die für 24 h mit unterschiedlichen Konzentrationen MT und PT inkubierten DZ für 15 min bei Raumtemperatur in Dunkelheit mit Annexin V gefärbt und direkt im Anschluss am Durchflußzytometer gemessen

Die Lebensdauer von DZ hat *in vivo* eine große Bedeutung; so beträgt die Zeitspanne zwischen Antigenaufnahme durch unreife DZ, die Wanderung in die T-Zellareale des drainierenden Lymphknotens, bis zur Präsentation des Antigens durch reife DZ, etwa 24 Stunden.

Die Färbung dokumentierte, dass PT keinen Einfluss auf die Lebensdauer der DZ hatte. Die Apoptoserate betrug nach 24 Stunden 5 %, welches vergleichbar mit der Apoptoserate der unbehandelten oder mit LPS beladenen DZ war.

MT dagegen induzierte in der hohen Konzentration von 300 µg/ml die Apoptose schon nach sechs Stunden. Nach 24 Stunden war sie auf 15 % angestiegen. Nur mit der niedrigsten Konzentration von 30 µg/ml MT konnten Werte, vergleichbar zur Apoptoseinduktion der unbehandelten oder mit LPS inkubierten DZ, erreicht werden.

Schlussfolgernd wurden in allen nachfolgenden Versuchen für die Inkubation von DZ PT in der Konzentration von 1 µg/ml und MT in der Konzentration von 50 µg/ml gewählt.

4.1.2 Zytokinprofil

Reife DZ sezernieren Zytokine, welche für die T-Zellaktivierung neben den Rezeptor-Liganden Paarungen eine wesentliche Rolle spielen. Um den Einfluss von MT und PT auf das Zytokinprofil der DZ zu untersuchen, wurden die Überstände der wie in den vorangegangenen Versuchen mit verschiedenen Konzentrationen von MT und PT inkubierten DZ nach 24 Stunden gewonnen. Mittels ELISA wurden die Zytokine IL-12p40, IL-12p70, IL-10 und TNF- α im Zellüberstand bestimmt (Abb. 6).

Die Inkubation mit niedrigen Konzentrationen von MT und PT induzierten eine geringe Zytokinproduktion der DZ. Die gewählten Konzentrationen von 1 µg/ml PT und 50 µg/ml MT induzierten dagegen eine starke Produktion der proinflammatorischen Zytokine TNF- α , IL-12p40 und dem ebenfalls für die T-Zellaktivierung relevanten Zytokin IL-12p70. Während mit PT inkubierte DZ kein

IL-10 sezernierten, konnte es im Überstand der mit 50 µg/ml MT inkubierten DZ gemessen werden.

Reife DZ produzieren Zytokine in der Regel in Abhängigkeit vom erkannten Antigen. Bereits bekannt ist, dass die Inkubation unreifer DZ mit TNF-α, LPS, CD40L, MT und bestimmten Viren zu einer verstärkten IL-12 Produktion der DZ und damit zu einer T-Helfer Typ 1 Polarisierung führt.

Die Inkubation Dendritischer Zellen mit PT und MT führt somit zu einer Aktivierung antigenspezifischer CD4⁺ T_H1-Zellen, MT induziert zusätzlich die Produktion des antiinflammatorischen Zytokins IL-10.

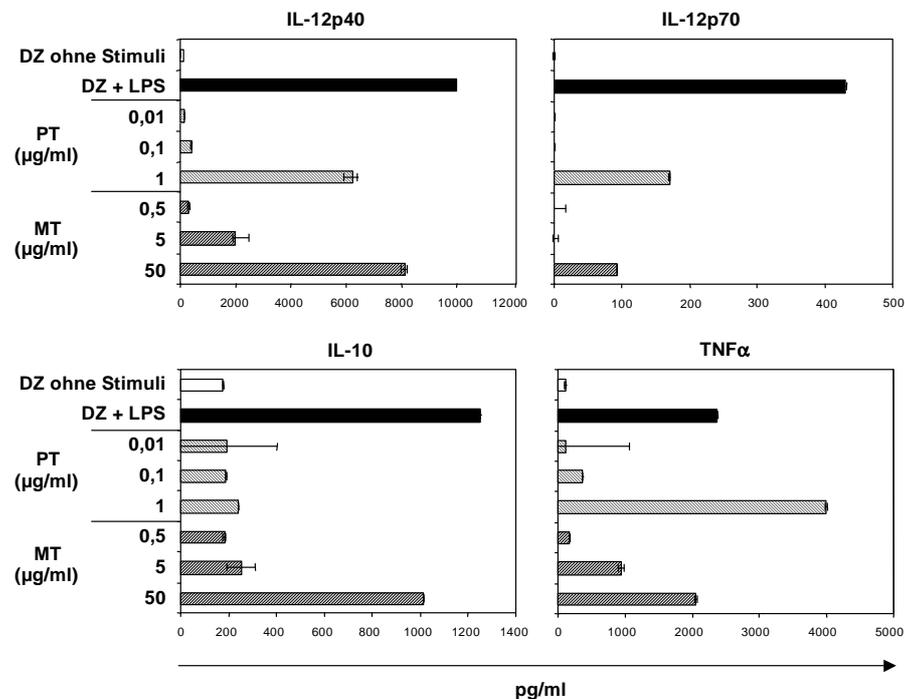


Abb. 6: **Starke IL-12p40 und TNF-α Produktion durch DZ nach Stimulierung mit PT oder MT**
 Acht Tage alte DZ wurden in einer 24-Loch Flachbodenplatte mit unterschiedlichen Stimuli kultiviert. Nach 24 h wurden die Zellen zentrifugiert und die Überstände im ELISA auf Zytokine untersucht. Mit 1µg/ml PT stimulierte DZ sezernierten hohe Mengen der inflammatorischen Zytokine IL-12p40 und TNF-α. Mit 50 µg/ml MT stimulierte DZ sezernierten ebenfalls hohe Mengen der beiden Zytokine, aber zusätzlich auch IL-10

4.1.3 T-Zellaktivierung

Um die T-Zellaktivierung gegen MT und PT als Antigene auch *in vivo* zu beurteilen, wurden mit MT oder PT stimulierte DZ syngenen Mäusen subkutan in die Fußsohlen injiziert. Nach neun oder 22 Tagen wurden die Tiere getötet, drainierende Lymphknoten herauspräpariert und die T-Lymphozyten mit titrierten Konzentrationen von MT oder PT in einer 96-Loch-Platte restimuliert. Durch Zugabe radioaktiv markierten Thymidins konnte die Proliferation der T-Zellen im Proliferationsassay gemessen werden.

Wie in Abbildung 7 erkennbar, war die Aktivierung MT-spezifischer T-Zellen etwa doppelt so stark wie die PT-spezifischer T-Zellen. Generell wurde aber mit beiden Stimulantien eine sehr starke Proliferation erreicht, wobei die *in vitro* restimulierten Lymphknotenzellen in Abhängigkeit vom titrierten Antigen proliferierten.

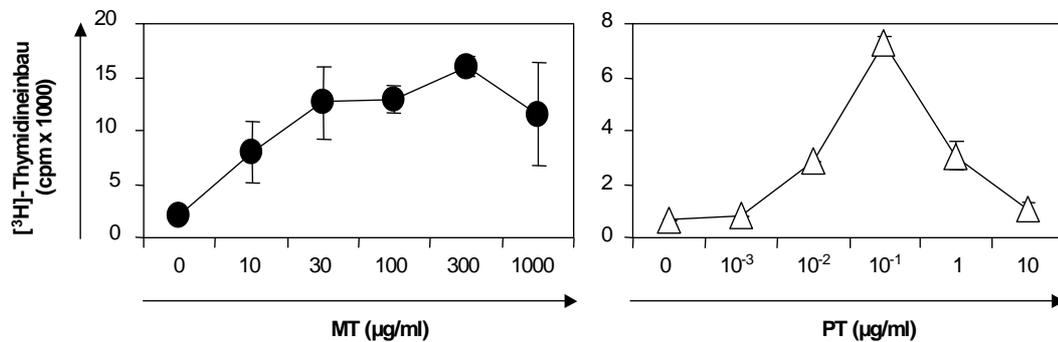


Abb. 7: **Deutliche Antigen abhängige T-Zellaktivierung nach vorheriger DZ-Immunisierung** Mit 50µg/ml MT oder 1µg/ml PT für 4 h inkubierte DZ wurden s.c. in die Fußsohlen von C57BL/6-Mäusen injiziert. Nach neun Tagen wurden die Tiere getötet, inguinale und popliteale Lymphknoten präpariert und die gewonnenen T-Lymphozyten mit titrierten Dosen von MT bzw. PT *in vitro* restimuliert. Anhand von Zugabe radioaktiv markierten Thymidins für 18 h konnte die deutliche Aktivierung der T-Zellen durch MT und PT im Proliferationsassay gemessen werden

4.2 Aktive EAE-Induktion mit Komplettem Freund'schen Adjuvans (CFA)

Bei der *aktiven* EAE-Induktion in C57BL/6-Mäusen wird aus CFA, MOG-Antigen und MT eine Emulsion hergestellt und den Tieren subkutan in die Schwanzwurzel injiziert. Zusätzlich wird an Tag null und zwei PT intraperitoneal injiziert und die Tiere anschließend täglich auf Krankheitssymptome kontrolliert.

4.2.1 Zytokinprofil und T-Zellaktivierung

Neun Tage nach EAE-Induktion mittels MOG-Protein, CFA und PT in C57BL/6-Mäusen zeigte ein Teil der Tiere erste klinische Anzeichen der EAE-Erkrankung in Form einer Schwanzlähmung, ein weiterer Teil war zu diesem Zeitpunkt noch ohne klinische Symptome. Um die Unterschiede in der T-Zellproliferation und im Zytokinprofil zwischen den zum gleichen Zeitpunkt immunisierten Gruppen zu eruieren und damit die Rolle verschiedener Faktoren während der Entstehung der Erkrankung zu verfolgen, wurden die Tiere beider Gruppen getötet, Lymphknoten und Milzen herauspräpariert und die Zellen mit MOG-Protein restimuliert (Abb. 8).

Die T-Zellproliferation beider Gruppen auf das MOG-Protein war in den Milzen gleich stark, in den Lymphknoten zeigte sich eine schwächere T-Zellantwort der erkrankten Tiere (Abb. 8).

Das Zytokinprofil der beiden Mäusegruppen unterschied sich in der Produktion von IL-2 und IL-4 kaum. Die Menge der Entzündungszytokine variierte jedoch zum Teil erheblich. Während die TNF- α Produktion der Milzzellen in beiden Gruppen gering war, zeigten sich in den Überständen der Lymphknotenzellen der noch nicht erkrankten Tiere dahingehend Unterschiede, dass die Gruppe der gesunden Tiere starke Mengen im Gegensatz zu der kranken Gruppe produzierte. Bei der IFN- γ Produktion zeigte sich folgende Verteilung: In dem T-Lymphozyten-Überstand der noch nicht erkrankten Gruppe konnten 60 ng/ml des inflammatorischen Zytokins IFN- γ gemessen werden, die Produktion der an der EAE erkrankten Gruppe betrug etwa die Hälfte. In den Überständen der Milzzellen

wurden 50 ng/ml des Zytokins gemessen, hier waren keine Unterschiede zwischen den Gruppen feststellbar. FLÜGEL et al. (2001) wiesen nach Ausbruch der EAE IFN- γ in hohen Mengen im ZNS nach, während in der Peripherie nur noch moderate Mengen dieses proinflammatorischen Zytokins vorhanden waren.

Das von regulatorischen T-Zellen produzierte Zytokin IL-10 konnte in den Überständen der T-Lymphozyten der erkrankten Gruppe nicht mehr nachgewiesen werden, in der gesunden Gruppe dagegen war IL-10 in den von den Lymphozyten produzierten Überständen vorhanden. Die Menge von IL-10 in den Milzüberständen war jeweils gering.

Schlussfolgernd spielt demnach das in hohen Mengen vorhandene Zytokin IFN- γ in der Auslösung und Erhaltung der EAE eine große Rolle, das regulatorische Zytokin IL-10 könnte als Gegenspieler agieren, mit dem Ziel, eine überschüssige Immunantwort abzuwehren.

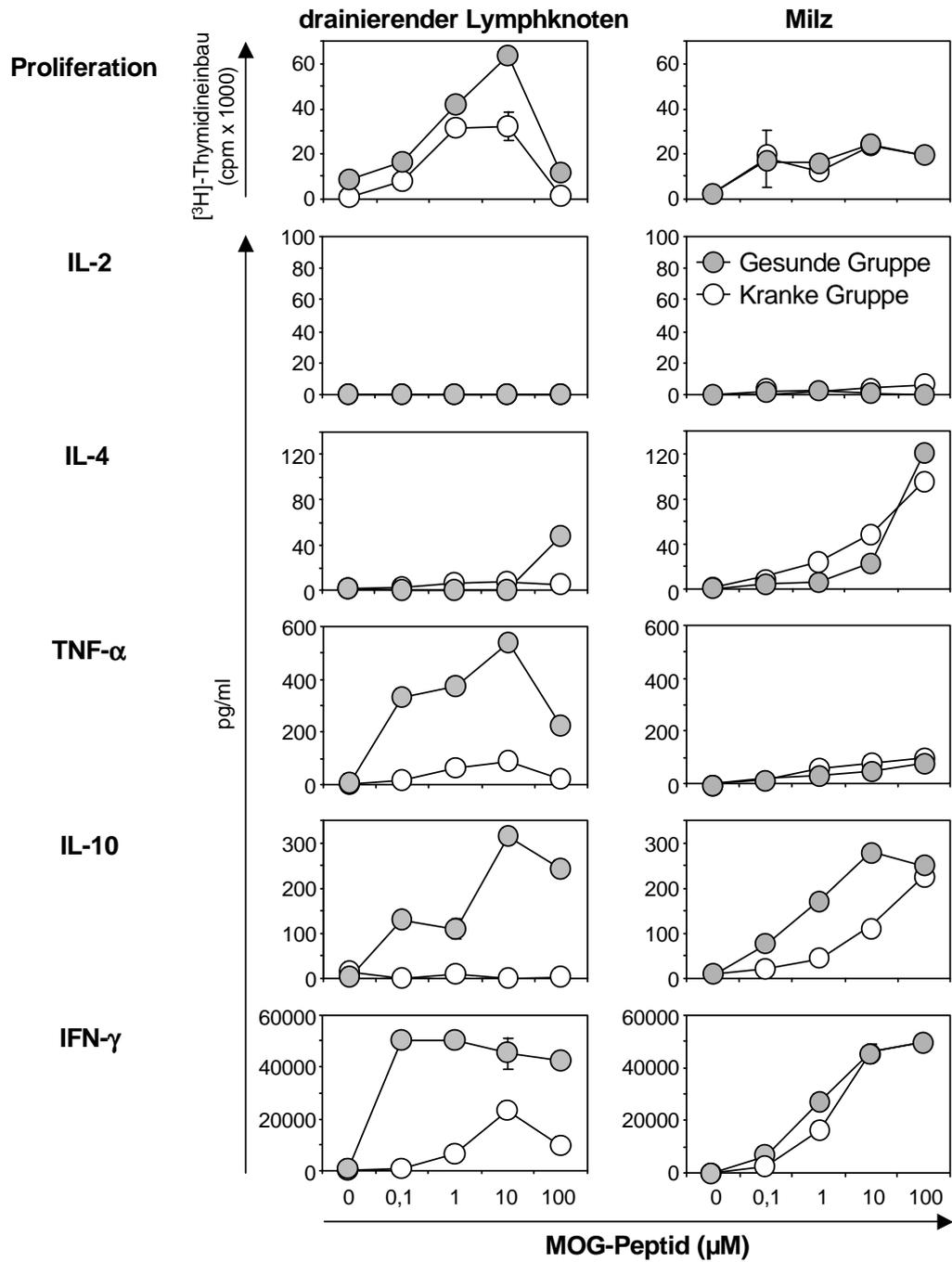


Abb. 8: **Starke IFN- γ und IL-10 Produktion bei der Gruppe der noch nicht an der EAE-erkrankten Tiere.** Die aktive EAE wurde in weiblichen C57BL-6 Mäusen nach dem bekannten Protokoll induziert. Nach neun Tagen war ein Teil der Tiere bereits erkrankt. Nach Tötung und anschließender Restimulation der T-Zellen aus Milz und drainierenden Lymphknoten *in vitro* wurden T-Zellproliferation und Zytokinprofil der gesunden und bereits erkrankten Tiere gegenübergestellt.

4.3 Versuch der EAE-Induktion durch Myelin-Antigen präsentierende DZ

Im dritten Teil der Versuche stand die Frage im Mittelpunkt, ob *in vitro* generierte DZ in der Lage sind, abhängig von verschiedenen Aktivierungsbedingungen nach Selbstantigenbeladung und Injektion die EAE auszulösen.

Eigene und innerhalb der Arbeitsgruppe durchgeführte Experimente zeigten, dass die Art der Injektion von mit Antigen beladenen DZ in Versuchstiere einen wesentlichen Einfluss im Hinblick auf die Immunantwort *in vivo* haben. So führten intravenöse und intraperitoneale Injektionen von mit MOG-Antigen beladenen DZ zu einer Toleranzinduktion. MENGES et al. (2002) zeigten, dass die Inkubation von DZ mit TNF- α und MOG₃₅₋₅₅-Peptid und deren wiederholte intravenöse Injektion nach anschließender EAE-Induktion die Mäuse vor der Erkrankung schützt. Kontrollmäuse, denen vorher keine DZ injiziert wurden, erkrankten dagegen. Innerhalb der Arbeitsgruppe zur Publikation eingereichte Arbeiten (VOIGTLÄNDER et al. 2006) gaben Hinweise auf die Induktion von Immunität nach subkutaner Injektion. So wurden DZ mit OVA-Antigen beladen und den Tieren s.c. injiziert. Dies führte zur Induktion einer T_H1-vermittelten Immunantwort mit starker Produktion der proinflammatorischen Zytokine IL-12p40, IL-12p70, TNF- α und IFN- γ . Maximale Mengen an IFN- γ konnten nach dreimaliger s.c. Injektion von inkubierten DZ im Zwei-Tage-Intervall erreicht werden. Um eine starke T_H1-Antwort *in vivo* zu induzieren und so dem initialen Entzündungsgeschehen der EAE möglichst nahe zu kommen, wurde in den folgenden Versuchen der subkutane Injektionsweg bei der Applikation von mit Selbstantigen beladenen DZ gewählt.

DZ agieren als natürliches Adjuvans und sind *in vivo* die einzigen Zellen mit der Fähigkeit, naive T-Zellen antigenspezifisch zu aktivieren, weshalb in den folgenden Versuchen in Anlehnung an die *aktive* EAE-Induktion mit CFA, DZ an die Stelle des CFA gesetzt wurden (Abb. 9). Dafür wurden DZ für vier Stunden mit TNF- α , LPS, PT oder MT gereift und zusätzlich mit MOG-Antigen inkubiert. Anschließend wurden diese DZ gewaschen, gezählt, in PBS aufgenommen und

weiblichen C57BL/6-Mäusen subkutan injiziert. Die so immunisierten Tiere wurden danach über einen Zeitraum von 30 Tagen auf Krankheitsanzeichen überwacht.

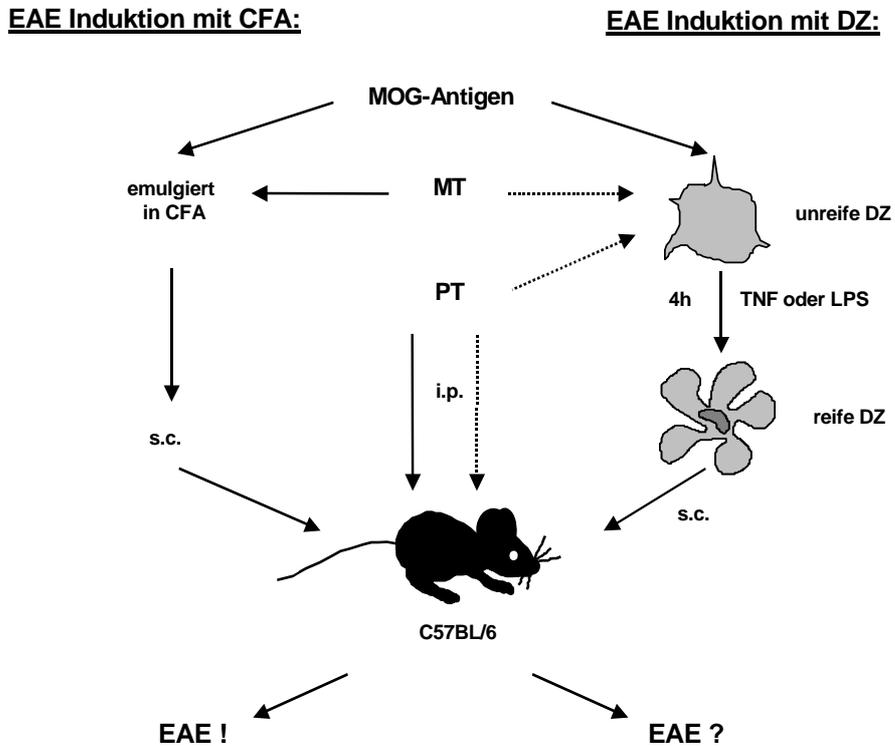


Abb. 9: *Unterschiede zwischen der aktiven EAE-Induktion mit CFA und der EAE-Induktion mit DZ. Die aktive EAE wird durch einmalige s.c. Injektion einer aus CFA, MOG-Antigen und MT bestehenden Emulsion in C57BL/6 Mäusen induziert. Dabei wird jeweils ein Depot von 50µl nach Einstich in die Schwanzwurzel rechts und links der Medianen gesetzt. Zusätzlich erfolgt an d 0 und d 2 eine i.p. Injektion von 200ng PT. Beim Versuch der Induktion der EAE mittels DZ wurde das CFA durch mit TNF-α oder LPS gereifte DZ ersetzt und diese s.c. dreimalig im Zwei-Tage-Intervall in die Fußsohlen der Versuchstiere injiziert. Teilweise wurde den Tieren ebenfalls an d 0 und d 2 eine i.p. Injektion von 200ng PT injiziert*

4.3.1 T-Zellaktivierung

Durch Stimulation der DZ mit TNF- α , LPS, MT oder PT und Inkubation mit MOG-Antigen entstanden reife DZ, die vermutlich das MOG-Antigen auf ihrer Oberfläche präsentierten. Um zu prüfen, ob eine T-Zellaktivierung gegen MOG auch *in vivo* möglich war, wurden die beladenen DZ zunächst einmalig subkutan in die Fußsohlen der Versuchstiere injiziert. In ersten Versuchen wurden die Tiere über 30 Tage auf Krankheitsanzeichen beobachtet. Nachdem sie keine klinischen Symptome einer EAE-Erkrankung zeigten, wurden die Immunisierungsversuche mit inkubierten DZ mehrfach wiederholt und die Tiere zu verschiedenen Zeitpunkten getötet um einen zeitlichen Ablauf der Immunantworten *in vivo* zu dokumentieren. Die Tiere wurden in verschiedenen Experimenten nach neun, 22 oder 30 Tagen nach Immunisierung getötet, inguinale und popliteale Lymphknoten und die Milzen herauspräpariert, und die aus den entnommenen Organen gewonnenen T-Zellen mit MOG-Antigen restimuliert. Die Proliferation nach antigenspezifischer Restimulation am 30. Tag ist in Abbildung 10 dargestellt.

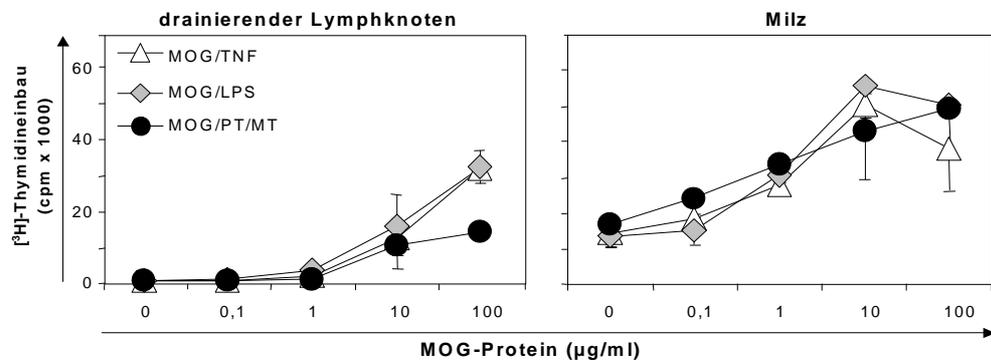


Abb. 10: **Starke T-Zellaktivierung am 30. Tag nach Immunisierung mit MOG-Protein inkubierten DZ in Abhängigkeit vom titrierten Antigen.** Nach dem im Rahmen dieser Arbeit erstellten Versuchsprotokolls wurden C57BL/6 Mäuse einmal mit MOG-Protein inkubierten DZ immunisiert. Nach 30 Tagen zeigten die Tiere keine klinischen Anzeichen einer EAE. Die Tiere wurden getötet und die Lymphozyten von Lymphknoten und Milzen mit titrierten Dosen MOG-Protein restimuliert und im Proliferationsassay gemessen

Hierbei zeigte sich eine von den verschiedenen gewählten Reifungsstimuli unabhängige Proliferation auf MOG. Die Proliferation war in der Milz stärker als in den Lymphknoten.

In weiteren Versuchen wurden die Versuchstiere dreimal im Abstand von zwei Tagen mit MOG inkubierten DZ immunisiert. Zwar konnte wieder keine EAE-Erkrankung ausgelöst werden, die MOG-spezifische T-Zellaktivierung war aber deutlich stärker als nach einmaliger Injektion. Abbildung 11 zeigt das Ergebnis 22 Tage nach Erstinjektion.

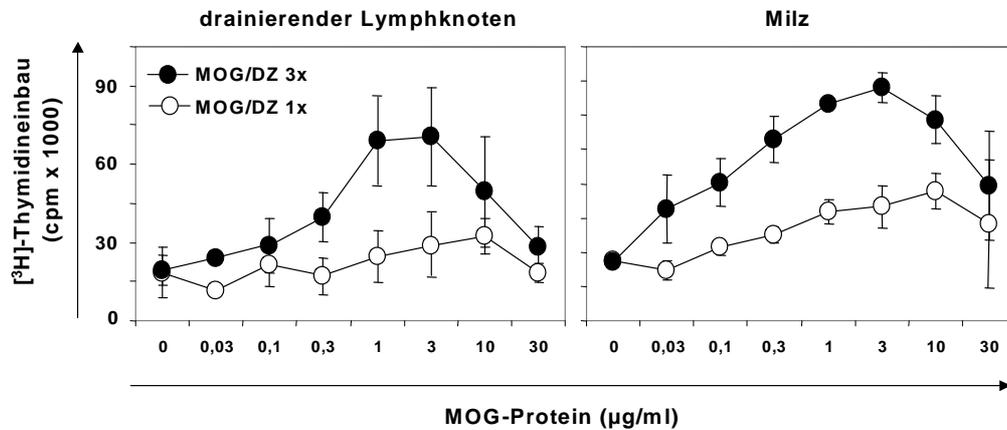


Abb. 11 **Starke MOG-spezifische T-Zellaktivierung nach dreimaliger s.c. Injektion von MOG/DZ.** C57BL/6-Mäuse wurden dreimal im Zwei-Tage-Intervall mit MOG-Protein inkubierten DZ s.c. injiziert. 22 Tage nach der ersten Injektion wurden die Tiere getötet, drainierende Lymphknoten und Milzen herauspräpariert und die Zellen antigenspezifisch restimuliert. Nach Zugabe von Thymidin erfolgte die Messung im Proliferationsassay.

Neben der MOG-Antigen abhängigen T-Zellproliferation wurde eine lokale Entzündungsreaktion am Injektionsort beobachtet (Abb. 12). So schwollen nach dreimaliger s.c. Injektion von MOG-Protein beladenen DZ die Mäusepfoten an. Am stärksten ausgeprägt war die Schwellung nach Injektion mit MT, PT und MOG-Protein inkubierten DZ. Die Dickenmessung der Pfoten mithilfe einer Mikrometerschraube ergab einen Durchschnittswert von 3,30 mm, die Messung gesunder Mäusepfoten naiver Mäuse ergab einen Durchschnittsmesswert von 2,30 mm. Die Injektion von MOG/LPS-DZ führte zu keiner Schwellung der Pfoten, die Messwerte waren vergleichbar mit denen naiver Mäuse.

Die lokale Entzündung ging 18 Tage nach der ersten Injektion allmählich zurück.



Abb. 12: Schwellung nach Injektion von MOG-Protein, MT und PT inkubierten DZ Fotografie von Mäusepfoten 16 Tage nach Erstinjektion mit inkubierten DZ. Die dreimalige Injektion von mit MOG-Protein, MT und PT inkubierten DZ führte zu einer starken Schwellung am Applikationsort. Die lokale Entzündung war bereits am fünften Tag sichtbar und blieb über den Zeitraum von zehn bis zwölf Tagen bestehen. Nach Injektion mit MOG-Protein, LPS oder TNF- α inkubierten DZ konnte nur eine sehr geringe Schwellung festgestellt werden

4.3.2 Zytokinprofil

Mit TNF- α und MOG-Protein inkubierte DZ wurden dreimal im Zwei-Tage-Intervall C57BL/6-Mäusen s.c. injiziert. Die Tiere wurden in verschiedenen Versuchen nach neun, 22 oder 30 Tagen getötet und die aus Lymphknoten und Milzen gewonnenen T-Lymphozyten mit titrierten Dosen des MOG-Proteins restimuliert. Die Zellüberstände wurden nach drei Tagen mittels ELISA auf Zytokine untersucht, die Zellen selbst im Proliferationsassay gemessen.

In Abbildung 13 ist neben der T-Zellproliferation, die wie in vorherigen Versuchen sehr stark war, ein Zytokinprofil von am neunten Tag restimulierten T-Lymphozyten dargestellt, welches eine eindeutige T_H1-Antwort dokumentiert. Die

Restimulation wurde zum Vergleich mit den Ergebnissen aus Abb. 8, welche T-Zellproliferation und Zytokinprofil neun Tage nach EAE-Induktion mit CFA zeigen, zum gleichen Zeitpunkt durchgeführt.

Als Ergebnis wurde eine hohe Produktion mit 10 ng/ml des Zytokins IFN- γ , welches von CD4⁺ T_H1-Zellen sezerniert wird, gemessen. Das in der Regel von T_H2-Zellen produzierte Zytokin IL-4 konnte gar nicht oder nur in geringen Mengen in den Zellüberständen nachgewiesen werden, IL-2, welches von aktivierten T-Zellen produziert wird, wurde ebenfalls nur in geringen Mengen nachgewiesen.

IL-10 war in hohen Mengen vor allem in den Überständen der restimulierten Milzzellen vorhanden. Dies weist auf eine Induktion von regulatorischen T-Zellen durch TNF- α /MOG-Protein inkubierte DZ hin.

Zusammenfassend aus allen Versuchen wurde eine starke Antigen-spezifische T-Zellaktivierung beobachtet. Die zu unterschiedlichen Zeitpunkten vorgenommenen Restimulationen dokumentierten einen zeitlichen Ablauf der Immunantworten, die sich am neunten Tag wie nach subkutaner Injektion zu erwarten, zunächst in einer erhöhten T-Zellaktivierung und Zytokinproduktion der drainierenden Lymphknotenzellen zeigten. An Tag 22 und Tag 30 verschob sich dies zugunsten der Milzzellen.

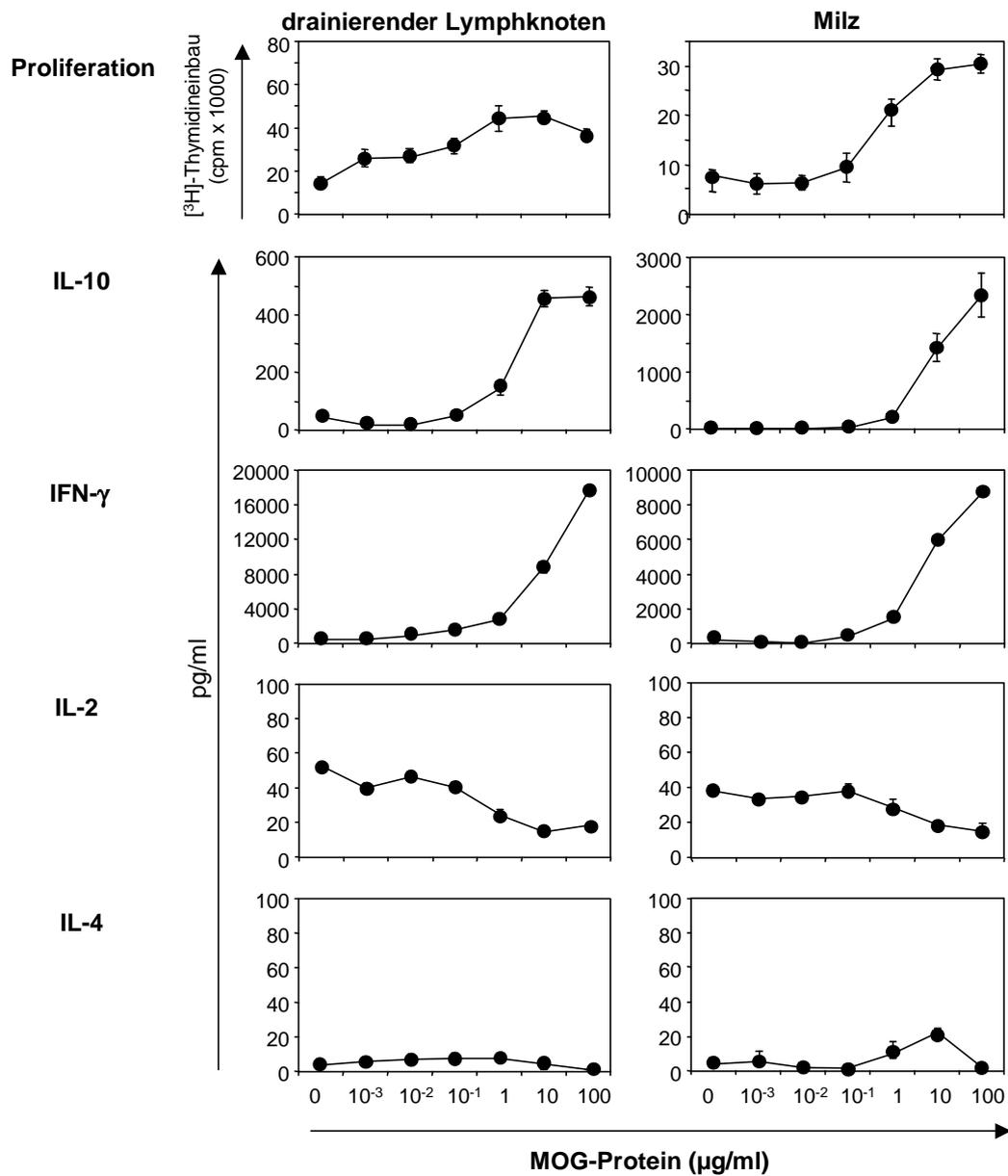


Abb. 13: **Restimulation von T-Zellen DZ-immunisierter Mäuse nach neun Tagen.** Mit MOG-Protein und TNF- α inkubierte DZ wurden dreimal im Zwei-Tage-Intervall s.c. in die Fußsohlen allogener Mäuse injiziert. Neun Tage später wurden die Tiere getötet, Milzen und drainierende Lymphknoten präpariert und die Lymphozyten mit titrierten Dosen MOG-Protein restimuliert. Die Zytokinproduktion konnte mittels ELISA, die Aktivierung MOG-spezifischer T-Zellen im Proliferationsassay bestimmt werden.

4.3.3 Aktive EAE-Induktion nach vorangegangener DZ-Immunisierung

Wie in den vorangegangenen Versuchen gezeigt, induzierten MOG-Antigen beladene DZ, die C57BL/6-Mäusen injiziert wurden, eine starke T-Zellproliferation, eine T_{H1} -Antwort und lokale Entzündungsreaktionen unabhängig vom jeweils eingesetzten Stimulus. Bisher konnten jedoch bei keinem Tier klinische Anzeichen einer EAE-Erkrankung diagnostiziert werden.

Um zu prüfen, ob die Immunisierung mit MOG-Antigen beladenen DZ überhaupt einen Einfluss, protektiven oder verstärkenden Charakters, im Geschehen der EAE hat, wurde im vorliegenden Versuch nach DZ-Immunisierung der Tiere die klassische EAE mit CFA und MOG-Peptid₃₅₋₅₅ zu zwei verschiedenen Zeitpunkten induziert.

Die *aktive* EAE wurde entsprechend der unter Punkt 3.4.3.1 beschriebenen Methode bei weiblichen Tieren des C57BL/6-Mausstammes induziert.

In Abbildung 14 a) kann anhand der Kurve der Kontrolltiere der normale EAE-Verlauf beobachtet werden. So begann nach ungefähr zehn Tagen die akute Krankheitsphase mit Lähmung des Schwanzes. Innerhalb von fünf Tagen wurde die gesamte Hinterhand von der Lähmung erfasst. Nach weiteren acht bis zehn Tagen erholten sich die Tiere wieder, die Krankheit ging in die chronische Phase über, in der nur noch partielle Lähmungen des Schwanzes zu beobachten waren.

Bei der EAE-Induktion acht Tage nach DZ-Immunisierung ist gut zu erkennen, dass die Erkrankung bei vorher mit $TNF-\alpha$ und MOG-Protein beladenen DZ immunisierten Mäusen anders verlief. Der Eintritt in die akute Phase der EAE war um vier Tage verzögert, dann jedoch erkrankte die gesamte Gruppe so stark, dass die Tiere nach 25 Tagen, dem eigentlichen Zeitpunkt des Rekonvaleszenz-Stadiums, aus ethischen Gründen euthanisiert werden mussten. Die Tiere, die mit LPS und MOG-Protein inkubierten DZ immunisiert worden waren, zeigten einen normalen EAE-Verlauf. Im Vergleich zu der Kontrollgruppe wurde die akute Phase jedoch eher erreicht und die Lähmungen waren stärker ausgeprägt.

In Abbildung 14 b) ist die EAE-Induktion fünf Monate nach DZ-Immunisierung dargestellt. Hier zeigt sich, dass die vorangegangenen DZ-Injektionen keinen

Einfluss mehr auf den EAE-Verlauf hatten. Die drei Kurven verlaufen nahezu parallel.

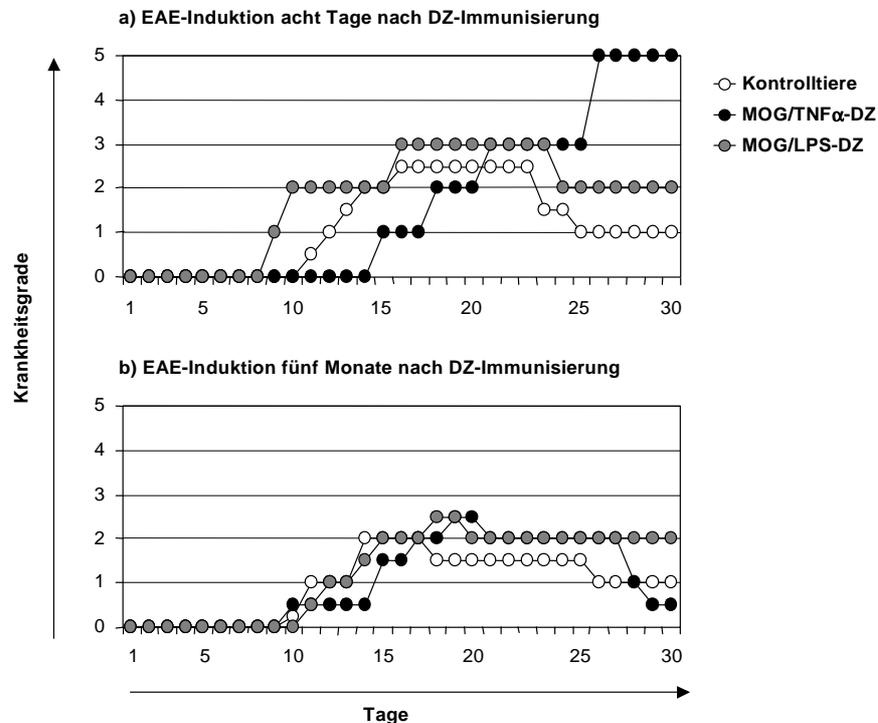


Abb. 14: **Verstärkung der EAE-Krankheitssymptome nach vorangegangener TNF- α /MOG-DZ-Immunisierung.** Die DZ-Immunisierung von C57BL/6 Mäusen erfolgte nach dem bekannten Protokoll. Nach a) acht Tagen und b) fünf Monaten wurde die aktive EAE induziert. Hierfür wurde eine Emulsion auf CFA/MT und MOG-Peptid s.c. und 200ng PT an d 0 und d 2 i.p. injiziert. Die Tiere wurden über einen Zeitraum von 30 Tagen täglich auf Krankheitsanzeichen kontrolliert

Diese Ergebnisse zeigen, dass durch subkutane Injektionen von DZ weder kurzfristig noch nach fünf Monaten Toleranz induziert wurde, wie es nach intravenösen Injektionen bereits gezeigt wurde (MENGES et al. 2002).

Dennoch reicht die induzierte Aktivierung von T_H1-Zellen und der IFN- γ Produktion nicht zur Induktion der EAE aus.

4.4 Gegenüberstellung von Unterschieden nach verschiedenen EAE-Induktionsverfahren

Letztendlich ließ sich feststellen, dass eine EAE-Erkrankung in C57BL/6-Mäusen nach Immunisierung mit MOG-Protein inkubierten DZ, nicht induzierbar war. Um Ursachen für das Nicht-Erkranken der DZ immunisierten Tiere zu finden, wurden im Folgenden die Ergebnisse der T-Zellaktivierung, des Zytokinprofils und der ZNS-Histologie von DZ-immunisierten Tieren und CFA-immunisierten Tieren zum direkten Vergleich nebeneinander gestellt. Dabei war eine Gruppe der CFA-immunisierten Tiere noch nicht erkrankt, eine andere Gruppe zeigte bereits klinische Symptome der EAE in Form einer Schwanzlähmung.

4.4.1 T-Zellaktivierung und Zytokinprofil

Abbildung 15 zeigt ein repräsentatives Experiment, welches die stärksten Unterschiede in T-Zellproliferation und Zytokinprofil von an der EAE erkrankten Tieren und noch nicht erkrankten Tieren, welche mittels CFA/MOG oder DZ/MOG immunisiert wurden, darstellt.

Die T-Zellproliferation war in der CFA-erkrankten Gruppe und der gesunden DZ-Gruppe mit 40000 cpm gleich, während bei den gesunden Tieren der CFA-Gruppe eine Proliferation von 60000 cpm gemessen werden konnte. Somit scheint eine Korrelation von Proliferation mit einer EAE-Erkrankung ausgeschlossen.

Gravierender waren die Unterschiede in der Sekretion der Zytokine IFN- γ und IL-10. Während die IFN- γ Sekretion der CFA-erkrankten Gruppe nur geringgradig höher war als in der DZ-Gruppe, war die der CFA-gesunden Gruppe mit bis zu 80000 pg/ml fast dreimal so stark. Die stärkste Produktion des regulatorischen Zytokins IL-10 konnte dagegen in der DZ-Gruppe gemessen werden, nur wenig schwächer war die Produktion in der CFA-gesunden Gruppe, und in der CFA-erkrankten Gruppe war IL-10 nicht mehr nachweisbar.

Daraus folgt, dass die Mengen des proinflammatorischen Zytokins IFN- γ wahrscheinlich ausreichend zur Induktion der EAE wären, die hohen Mengen des regulatorischen Zytokins IL-10 wahrscheinlich eine Erkrankung verhindern.

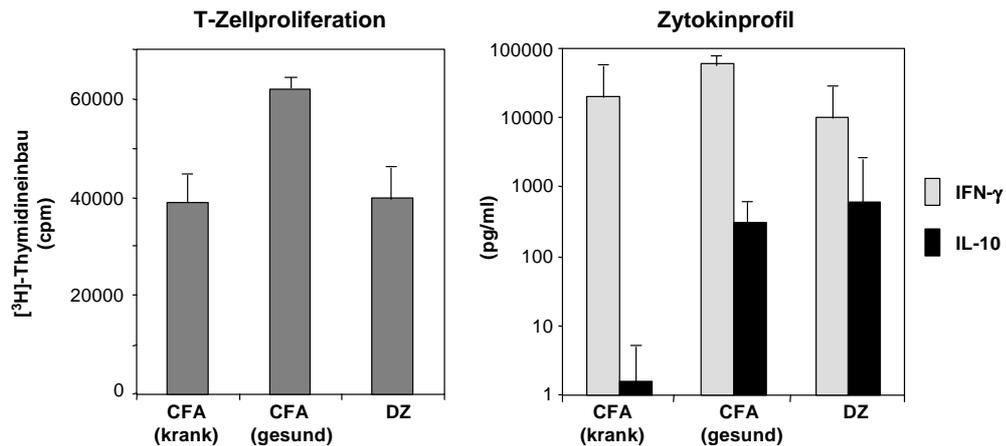


Abb. 15: **Unterschiede in T-Zellproliferation und Zytokinprofil von CFA/MOG und DZ/MOG immunisierten Mäusen.** Neun Tage nach Immunisierung mit CFA/MOG - ein Teil der Gruppe zeigte klinische Anzeichen der EAE in Form von Schwanzlähmung - der andere Teil der Gruppe war noch ohne klinische Symptome, oder DZ/MOG, wurden die Tiere getötet. Lymphknoten- und Milzzellen wurden mit MOG-Protein restimuliert und die Proliferation anhand des Einbaus radioaktiv markierten Thymidins im Proliferationsassay gemessen. Die Zellüberstände wurde mit ELISA auf Zytokine untersucht

4.4.2 ZNS Histologie

Durch immunhistologische Färbungen des ZNS EAE-kranker Tiere können Vorgänge im ZNS, wie z.B. eine Leukozyteninfiltration sichtbar gemacht werden. Um festzustellen, ob die Aktivierung der T-Zellen nach MOG/DZ-Immunisierung zu einem Einwandern ins ZNS führt, wurden die Mäuse zum Zeitpunkt der maximalen T-Zellproliferation und IFN- γ Produktion getötet und Kryostatschnitte von Hirnstamm und Rückenmark angefertigt. Als Vergleichsgruppen dienten naive Mäuse und EAE-kranker Mäuse. Zur Detektion von Leukozyten wurden die Schnitte mit Antikörpern gegen den Leukozytenmarker CD45 angefärbt und die Basalmembranen mit einem gegen das extrazelluläre Matrixprotein Laminin gerichteten Antikörper detektiert. Anschließend wurden beide mit einem sekundären Fluorochrom gekoppelten Antikörper sichtbar gemacht. In Abbildung 16 sind die Ergebnisse dargestellt. So konnten CD45⁺ Leukozyten in der Gruppe der nach CFA/MOG-Immunisierung EAE-erkrankten Tiere (Abb.16 a) sowohl im Subarachnoidalraum (Abb. 16 a, roter Pfeil), als auch im Perivaskulärraum (Abb. 16 a, weißer Pfeil zeigt ein venöses Gefäß) nachgewiesen werden, dieser war sogar durch die Masse der Zellen erweitert. Im angrenzenden Parenchym waren ebenfalls schon Leukozyten vorhanden. In der Gruppe der naiven Mäuse (Abb. 16 b) konnten nur ganz vereinzelt Leukozyten im Subarachnoidalraum sichtbar gemacht werden, im Perivaskulärraum waren keine vorhanden.

In Abbildung 16 c sind die Färbeschnitte der Gruppe der MOG/DZ immunisierten Tiere dargestellt. Es konnten Leukozyten in vermehrter Anzahl im Subarachnoidalraum detektiert werden, aber auch im Perivaskulärraum waren vereinzelt Leukozyten vorhanden. Hieraus ergibt sich die Schlussfolgerung, dass die durch MOG/DZ-Immunisierung aktivierten T-Zellen vermehrt zum ZNS wandern, andere Mechanismen jedoch, wie beispielsweise der durch Adhäsionsmoleküle vermittelte Eintritt, verwehrt bleiben.

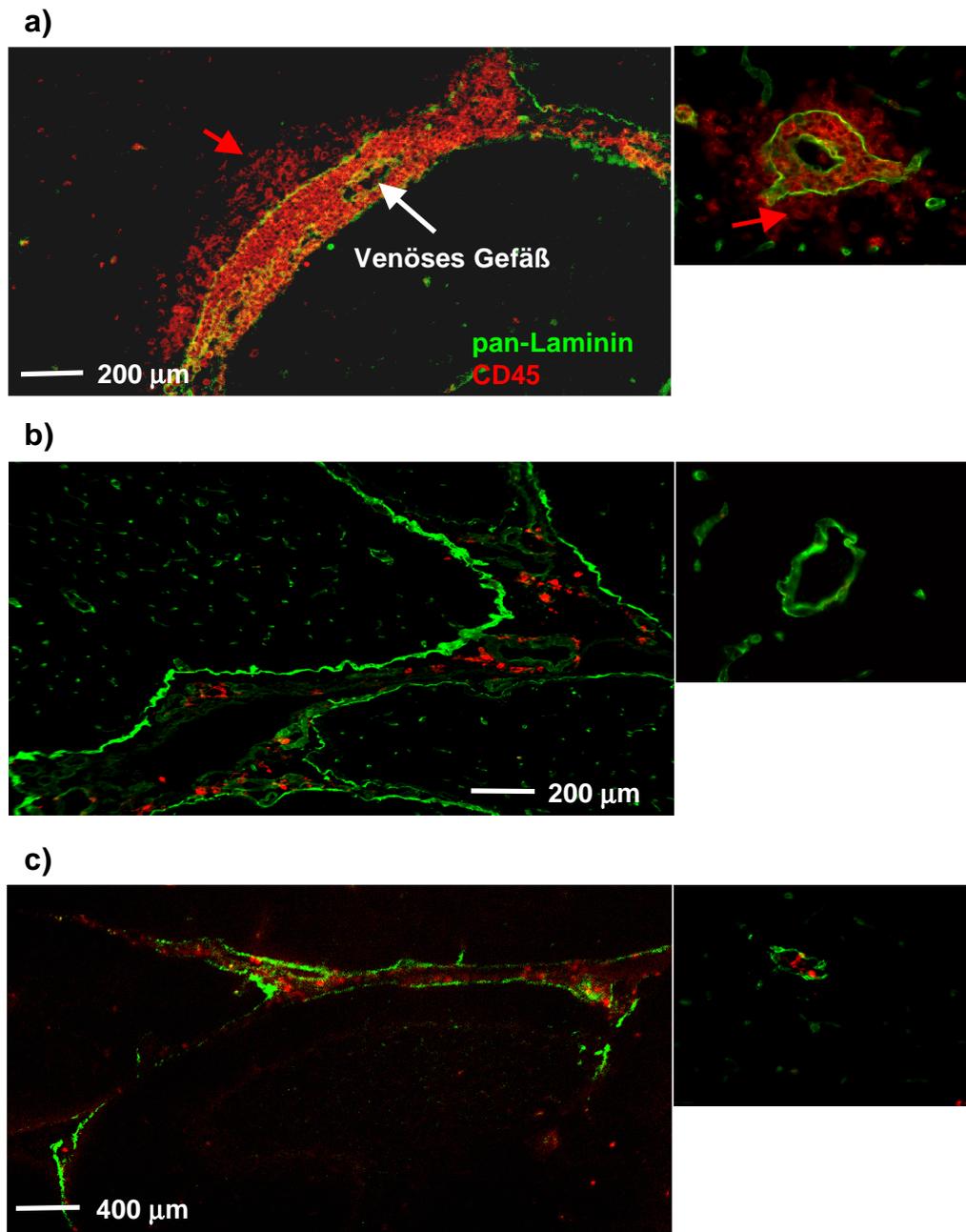


Abb. 16: *Immunhistologische Färbung von ZNS Kryostatschnitten von a) nach CFA/MOG-Immunsierung EAE-kranker Mäuse, b) naiver Mäuse und c) nach dreimaliger MOG/DZ-Immunsierung gesunder Mäuse. Nach Tötung der Tiere wurde das Gehirn unter besonderer Schonung von Stammhirn und angrenzendem Rückenmark präpariert und Frontalschnitte angefertigt. Die Färbung erfolgte mit einem anti-CD45-Ak Überstand und einem entsprechend mit Fluorochrom gekoppeltem Zweitantikörper. Die Darstellung der Basalmembranen wurde mit einem anti-Laminin Serum und einem entsprechendem Zweitantikörper verifiziert*

4.5 Weitere Versuchsansätze zur Induktion der EAE mittels DZ

Bei den vorangegangenen analysierten Unterschieden zwischen den Ereignissen während der *aktiven* EAE und der mittels DZ induzierten EAE fiel vor allem die unterschiedliche IL-10 Produktion auf. Während nach *aktiver* EAE-Induktion und folgender klinischer Erkrankung sehr hohe Mengen an IFN- γ , aber nur geringe Mengen des regulatorischen Zytokins IL-10 gemessen wurden, konnten nach DZ-Immunisierung dagegen deutlich geringere Mengen an IFN- γ , jedoch sehr hohe Mengen von IL-10 in den T-Zellüberständen nachgewiesen werden.

Im folgenden und abschließenden Versuchsteil sollten zum einen die Relevanz der analysierten Zytokine, zum Anderen aber auch weitere eventuell relevante Komponenten untersucht werden, mit dem Ziel, in MOG/DZ-immunisierten Mäusen eine EAE-Erkrankung zu induzieren.

4.5.1 Verstärkung der T_H1 Antwort

Ausgehend von der Annahme, dass zur Auslösung einer EAE-Erkrankung eine maximale T_H1-Immunantwort dominieren muss, wurden im Folgenden durch gezielte Beeinflussung der Zytokine und T-Zellen versucht, eine Verstärkung der T_H1-Antwort zu erreichen, um so eventuell eine klinische EAE-Erkrankung auszulösen.

4.5.1.1 Zusätzliche Injektionen von IL-12 oder IFN- γ

C57BL/6-Mäusen, die nach dem MOG/DZ-Immunisierungsprotokoll immunisiert wurden, injizierte man zusätzlich murines rekombinantes IL-12 oder IFN- γ intraperitoneal. Dabei wurde sowohl die Dosierung der einzelnen Substanzen in ihrer Stärke variiert, die höchste Konzentration einer einzelnen Applikation betrug 1 $\mu\text{g}/\text{Tier}$, als auch das Zeitintervall von einer Gabe auf bis zu sechs Injektionen im Abstand von zwei Tagen erhöht. Die Tiere wurden über einen Zeitraum von 30

Tagen auf für die EAE typische Krankheitsanzeichen beobachtet. Kein Tier zeigte während dieses Zeitraumes klinische Symptome.

4.5.1.2 T-Zellfrequenz

Um die Frequenz MOG-spezifischer T-Zellen zu erhöhen, wurden MOG-spezifische T-Zell Rezeptor-transgene Mäuse (MOG TZR-tg Mäuse) verwendet. Induziert man in ihnen die *aktive* EAE mittels CFA, erkranken sie wesentlich stärker als C57BL/6-Mäuse (BETTELLI et al. 2003)

Nach dem ausgearbeiteten DZ-Immunisierungsprotokoll wurden als Kontrollgruppe C57BL/6-Mäuse und MOG TZR-tg Mäuse desselben Alters mit MOG-Protein inkubierten DZ von C57BL/6-Mäusen dreimal im Abstand von zwei Tagen s.c. injiziert. Zusätzlich wurden PT Injektionen i.p. vorgenommen. Die Tiere wurden über einen Zeitraum von 30 Tagen auf Krankheitsanzeichen beobachtet. Keines der Tiere entwickelte klinische Anzeichen einer EAE-Erkrankung.

Die Versuche wurden mehrfach wiederholt und zur genauen Analyse ein Teil der Tiere am neunten Tag nach der Immunisierung getötet, Lymphknoten und Milzen herauspräpariert und die T-Zellen mit MOG-Protein restimuliert (Abb. 17).

Während die Proliferation der MOG TZR-tg Tiere in den drainierenden Lymphknoten wesentlich stärker war, zeigten die Milzzellen ein umgekehrtes Bild.

Die Anzahl der Zytokine wurde in den Zellüberständen mittels ELISA ermittelt. Dabei fiel vor allem auf, dass die IL-10 Produktion durch die MOG TZR-tg Zellen höher war. Auffallend war dieses Ergebnis im Lymphknoten, da dort weniger T-Zellen vorhanden waren, die IL-10 Produktion aber dennoch stärker war. Die Produktion der Zytokine IFN- γ , IL-2 und IL-4 war vergleichbar. Zusammenfassend war festzustellen, dass nur geringe Unterschiede in T-Zellaktivierung und Zytokinprofil bestanden, eine Krankheit aber in keinem Fall auszulösen war.

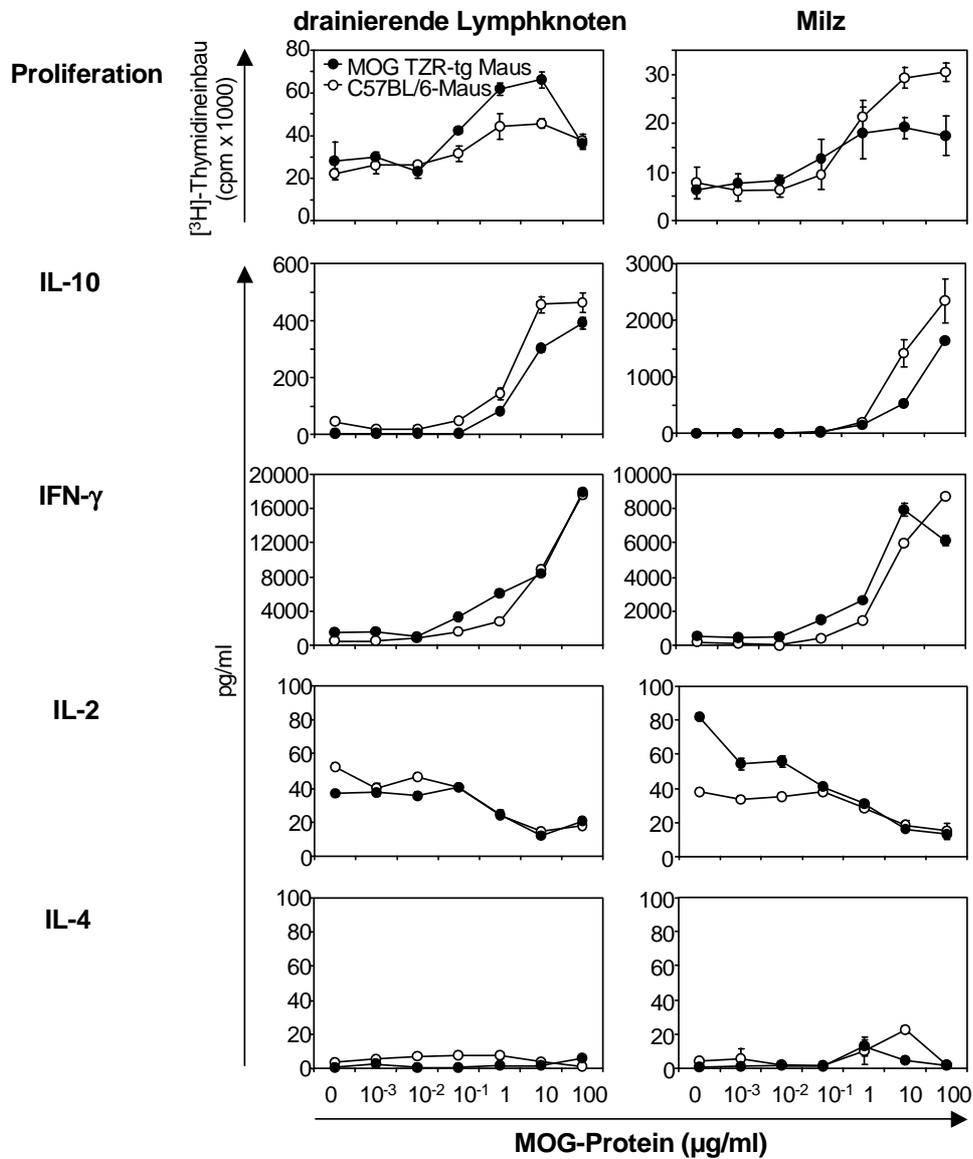


Abb. 17: Die dreimalige DZ/MOG-Immunisierung von C57/BL6-Mäusen und MOG spezifischen TZR-tg Mäusen führt zu einer vergleichbaren T-Zellproliferation und Zytokinprofil nach Restimulation mit MOG-Protein *in vitro*. Alle Tiere wurden mit MOG-Protein inkubierten DZ dreimal im Zwei-Tage-Intervall immunisiert. Zusätzlich wurden i.p. Injektionen mit PT an d0 und d2 vorgenommen. Nach neun Tagen wurden die Tiere getötet, Milzen und drainierende Lymphknoten präpariert und mit MOG-Protein restimuliert. Die Zytokinproduktion wurde mittels ELISA, die Aktivierung MOG-spezifischer T-Zellen im Proliferationsassay bestimmt

4.5.1.3 Regulatorische T-Zellen

Zur Zeit werden drei Populationen regulatorischer T-Zellen (T_R -Zellen) unterschieden, denen gemein die Immunsuppression ist.

Neben den natürlichen T_R -Zellen, welche durch die $CD4^+CD25^+$ T-Zellen repräsentiert werden und die unabhängig von Zytokinen ihre regulatorische Wirkung über direkten Zellkontakt vermitteln, existieren induzierbare T_R -Zellen, von denen sich Tr1 vor allem durch die Produktion von IL-10 und Th3 durch die Produktion von TGF- β nach oraler Toleranz auszeichnen (WU und WEINER, 2003).

Bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente konnten nach DZ-Immunsierung in den T-Zellüberständen regelmäßig hohe Mengen des Zytokins IL-10 nachgewiesen werden, welches auf die Induktion regulatorischer T-Zellen (Tr1) hinweist.

Im Folgenden sollten zum Einen durch Einsatz von IL-10-defizienten Mäusen die immunsupprimierende Wirkung der Tr1-Zellen ausgeschaltet werden, zum Anderen sollte durch Einsatz von PC61, einem anti-CD25-Antikörper, die $CD4^+CD25^+$ T_R depletiert werden.

Ziel war in beiden Fällen, durch Ausschalten aller regulatorischen Faktoren, nach DZ-Immunsierung die EAE Erkrankung in Mäusen auszulösen.

IL-10 defiziente Mäuse:

Knochenmarks-DZ aus C57BL/6-Mäusen wurden mit MOG-Protein inkubiert und IL-10 defizienten Mäusen injiziert. Einem Teil der Tiere wurde zusätzlich PT in der Dosis von 200 ng an Tag 0 und Tag 2 i.p. injiziert. Alle Tiere wurden für einen Zeitraum von 30 Tagen auf Krankheitsanzeichen beobachtet. Kein Tier zeigte in dieser Zeit klinische Anzeichen einer EAE-Erkrankung (Daten nicht gezeigt).

Depletion regulatorischer T-Zellen durch PC61:

C57BL/6-Mäusen wurde 1 mg PC61 i.p. injiziert. Nach vier Tagen wurde den Tieren Blut aus dem Augenhintergrund entnommen und dieses mittels FACS-Analyse auf CD25⁺ Zellen untersucht. Bei der Färbung von Zellen naiver Tiere waren etwa 5-10% CD4⁺CD25⁺ Zellen vorhanden, bei den mit PC61 behandelten Tiere waren keine CD4⁺CD25⁺ Zellen mehr vorhanden (Abb. 18). Das Ergebnis konnte noch am 43. Tag nach Injektion bestätigt werden.

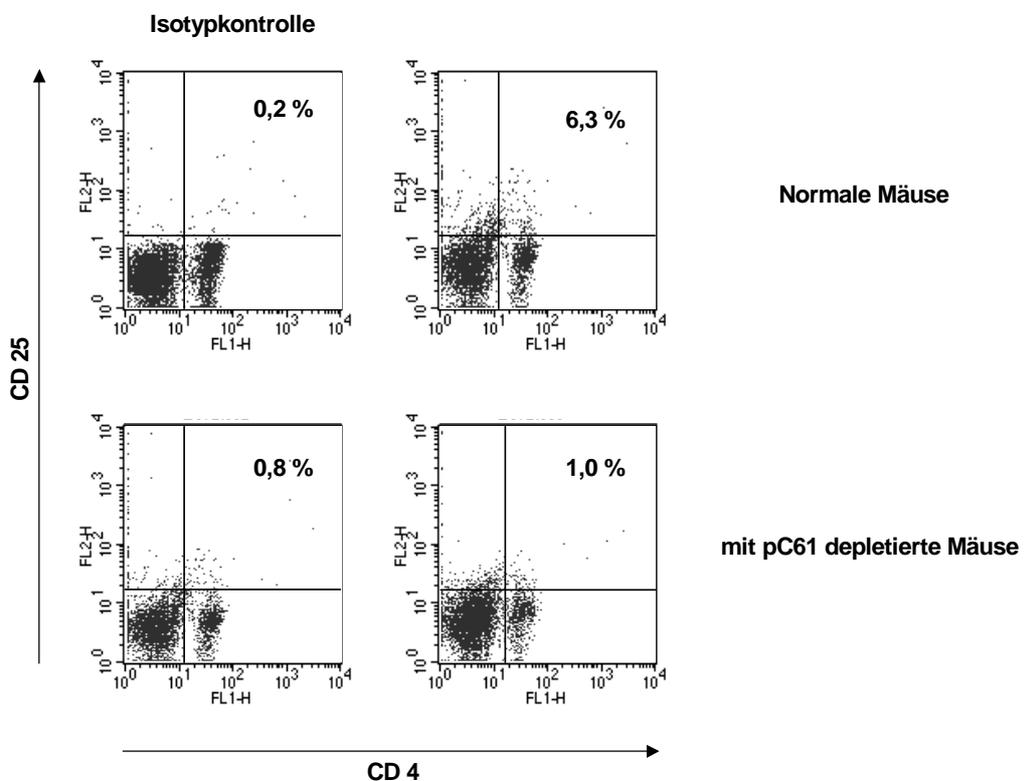


Abb. 18: **Depletion von CD4⁺CD25⁺ Zellen nach i.p. Injektion mit PC61.** Vier Tage nach i.p. Injektion mit 1 mg PC61 in C57BL/6-Mäusen wurde den Tieren Blut aus dem Augenhintergrund entnommen und die so gewonnenen Zellen für 30 min mit FITC und PE markierten Antikörpern gegen CD4 und CD25 gefärbt. Anschließend wurde die Expression der für natürliche regulatorische T-Zellen typischen Oberflächenmoleküle am Durchflußzytometer gemessen.

Vier Tage nach Injektion des PC61-Antikörpers und nachgewiesener vollständiger Depletion der regulatorischen CD4⁺CD25⁺ Zellen wurde den Tieren mit MOG-Protein inkubierte DZ s.c. injiziert und zusätzlich zwei PT Injektionen i.p. nach dem bekannten Protokoll durchgeführt. Die Tiere wurden über einen Zeitraum von 30 Tagen auf Krankheitsanzeichen beobachtet. Trotz Depletion der CD25⁺ Zellen entwickelten die Tiere während des gesamten Zeitraumes keine klinischen Anzeichen einer EAE-Erkrankung (Daten nicht gezeigt).

Schlussfolgernd ist demnach die Wirkung der regulatorischen T-Zellen allein nicht entscheidend für das Ausbleiben der EAE nach DZ-Immunisierung.

4.5.2 DZ Subtypen

Alle bisherigen Versuche wurden mit murinen CD8 α ⁻ Knochenmarks-DZ durchgeführt. Möglicherweise sind nach CFA-Immunisierung jedoch andere DZ-Subtypen an einer EAE-Induktion beteiligt. Es gibt Hinweise, dass CD8 α ⁻ DZ vermehrt die Entwicklung von T_H2 Immunantworten induzieren. CD8 α ⁺ DZ, welche aus der Milz gewonnen werden, forcieren dagegen eher T_H1 Antworten (RISSOAN et al. 1999; MALDONADO-LOPEZ et al. 1999; PULENDRAN et al. 1999).

LEGGE et al. (2002) isolierten verschiedene DZ-Typen aus der Milz. Während CD8 α ⁻ DZ regulatorische T-Zellen aktivierten und somit eine EAE-Erkrankung verhinderten, induzierten CD8 α ⁺ DZ, die über Nacht mit PLP-Peptid inkubiert und s.c. in SJL-Mäuse injiziert wurden, nach zusätzlicher intravenöser Injektion von Pertussis Toxin, die EAE in SJL-Mäusen.

4.5.2.1 Immunisierung mit CD8 α ⁺ DZ

In Anlehnung an das von LEGGE et al. (2002) erarbeitete Protokoll wurden die Milzen von naiven C57BL/6 Mäusen mittels Kollagenase und DNase verdaut, mit EDTA-Lösung gestoppt und die Zellen gezählt. Über eine Dichtegradientenzentrifugation wurden die DZ angereichert, mittels MACS konnten über magnetische Zellseparation die CD11c⁺ DZ gewonnen werden,

welche anschließend nach FACS-Färbung mittels magnetischer Zellsortierung in eine CD8 α^+ und eine CD8 α^- Fraktion aufgeteilt wurden.

Die CD8 α^+ DZ wurden im Anschluss nach dem ausgearbeiteten MOG/DZ-Immunisierungsprotokoll vier Stunden mit MOG-Protein und TNF- α bei 37°C inkubiert und einmalig subkutan in C57BL/6 Mäuse injiziert, während die CD8 α^- DZ verworfen wurden. Neben der subkutanen Injektion wurden an Tag 0 und 2 intraperitoneale PT Injektionen vorgenommen und die Tiere für 30 Tage auf Krankheitsanzeichen beobachtet.

Trotz einer hohen Reinheit nach Separation von bis zu 97% CD8 α^+ DZ konnte keine EAE mittels MOG-Protein inkubierten CD8 α^+ DZ in C57BL/6 Mäusen induziert werden.

4.5.2.2 Zusätzliche Injektionen von Pathogen Derivaten

Injektionen von LPS und CpG bewirken eine Verstärkung der Immunantwort dahingehend, dass sie DZ aktivieren (REIS E SOUSA und GERMAIN 1999; SEGAL et al. 2000). SACHER et al. (2002) zeigten, dass durch intraperitoneale CpG-Injektionen verursachte Entzündungen im Geschehen der T Zell-vermittelten Autoimmunhepatitis erst autoaggressive T-Zellen aktiviert wurden.

Im Folgenden wurden nach dem DZ-Immunisierungsprotokoll C57BL/6-Mäuse mit MOG-Antigen inkubierten Knochenmarks-DZ injiziert und zusätzlich an Tag 0, 2, 4 und 6 mit PBS, 10 μ g LPS oder 40 μ g CpG intraperitoneal injiziert. Zunächst wurden die Tiere über einen Zeitraum von 30 Tagen auf Krankheitsanzeichen beobachtet. Nachdem kein Tier klinische Anzeichen der EAE entwickelte, wurden die Versuche wiederholt und in Anlehnung an das von SACHER et al. (2002) ausgearbeitete Protokoll den Tieren zu verschiedenen Zeitpunkten Blut aus dem Augenhintergrund entnommen, daraus das Serum gewonnen und dieses im ELISA auf die Zytokine IL-10 und IFN- γ untersucht. Abbildung 19 zeigt das Serum-Zytokinprofil der Versuchstiere am 16. Tag nach Immunisierung. Während im Serum der zusätzlich mit PBS und LPS injizierten Tiere IL-10 in einer Konzentration von 90 bzw. 110 pg/ml nachgewiesen wurde, lag die Menge an IL-

10 im Serum der mit CpG injizierten Tiere unterhalb der Nachweisgrenze. IFN- γ war im Serum der Versuchstiere in nur geringen Mengen nachweisbar. Die stärkste Produktion wurde bei den zusätzlich mit LPS injizierten Tieren gemessen.

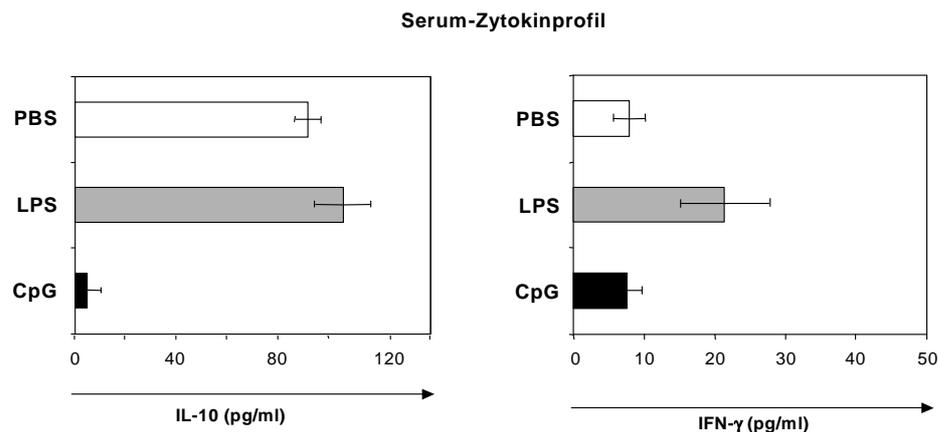


Abb. 19: *I.p.-Injektionen von CpG unterdrücken die IL-10 Produktion nach MOG/DZ-Immunsierung in C57BL/6-Mäusen.* Nach dem bekannten DZ-Immunsierungsprotokoll wurden C57BL/6-Mäuse dreimal im Abstand von zwei Tagen mit MOG/DZ immunisiert. Zusätzlich wurden beginnend an Tag 0 sechsmal im Zwei-Tage-Intervall entweder PBS, 10 μ g LPS/Tier oder 60 μ g CpG/Tier i.p. injiziert. Den Versuchstieren wurde am 16. Tag nach Betäubung mit Ether mittels einer heparinisierten Glaskapillare 100 μ l Blut aus dem Augenhintergrund entnommen. Nach Gewinnung des Serums wurde dieses mit PBS verdünnt und im ELISA auf die Zytokine IL-10 und IFN- γ untersucht

22 Tage nach Erstinjektion wurden zum Vergleich zu vorangegangenen Versuchen die Tiere getötet, Lymphknoten und Milzen herauspräpariert und die T Zellen mit MOG-Antigen *in vitro* restimuliert. Die Zellüberstände wurden im ELISA auf die bekannten Zytokine, die Zellen selbst nach Inkubation mit 3H-markierten Thymidin im Proliferationsassay gemessen. Dabei zeigte sich in den Zytokinproduktionen eine ähnliche Verteilung wie zuvor im Serum (Abb. 20).

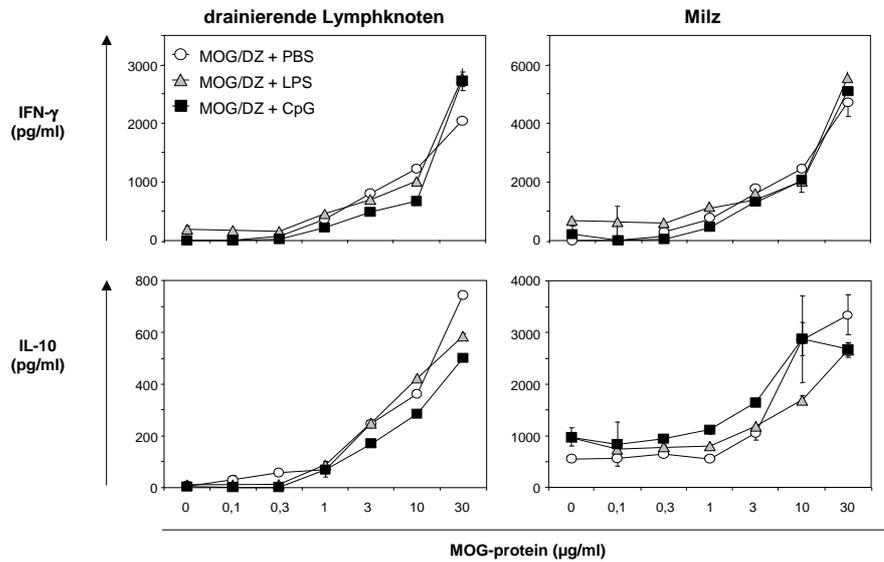


Abb. 20: *Nur geringe Steigerungen der IFN- γ Produktion und geringe Senkungen der IL-10 Produktion nach i.p. Injektionen von LPS und CpG in MOG/DZ immunisierten C57BL/6 Mäusen. MOG/DZ-immunisierte Mäuse wurden beginnend an d0 insgesamt 6 mal im Zwei-Tage-Intervall zusätzlich mit PBS, 10 μ g LPS/Tier oder 60 μ g CpG/Tier i.p. injiziert. Dabei wurde jeweils ein Volumen von 100 μ l pro Maus injiziert. 22 Tage nach der ersten Injektion wurden T-Zellproliferation und Zytokinprofil bestimmt*

So war die stärkste IFN- γ Produktion bei den LPS injizierten Tieren mit etwa 3000 pg/ml in den drainierenden Lymphknoten und 6000 pg/ml in den Milzen festzustellen, die Produktion der zusätzlich mit CpG injizierten Tiere war nur wenig geringer. Eine Steigerung der IFN- γ Produktion nach zusätzlichen Injektionen mit LPS oder CpG war demnach im Gegensatz zu mit PBS injizierten Tieren in geringem Umfang möglich.

Die Produktion von IL-10 konnte nach Injektion mit LPS oder CpG gesenkt werden, wobei im Gegensatz zu den PBS injizierten Tieren eine Senkung der Produktion um 200 pg/ml in den Lymphknoten und etwa 1000 pg/ml in den Milzen nach CpG Injektionen erreicht werden konnten. Allerdings zeigten sich die Zytokinverschiebungen nur in geringem Maße.

Beide Versuchsansätze führten nicht zur Ausbildung einer EAE-Erkrankung (Daten nicht gezeigt).

4.5.3 Zusätzliche Injektionen von Adjuvans

Nachdem die bisherigen erweiterten Versuchsansätze nicht die Induktion der EAE erreichen konnten, sollte als weitere wichtige Komponente in der *aktiven* EAE-Induktion das CFA untersucht werden. CFA wird bei der *aktiven* EAE Induktion mit MT, MOG-Antigen und PBS emulgiert und anschließend s.c. injiziert. Es hat einerseits eine Depotwirkung mit kontinuierlicher Abgabe der beinhaltenen Komponenten, andererseits aktiviert das Mineralölgemisch selbst Immunzellen wie Makrophagen und NKT-Zellen. Diese spielen bei der Demyelinisierung im ZNS und somit bei der Entwicklung der typischen Lähmungen während der EAE eine große Rolle.

Zusätzlich zu den subkutanen Injektionen von MOG-Protein inkubierten DZ nach dem bekannten Protokoll wurden 100 µl einer CFA/PBS-Emulsion an Tag 0 subkutan im Bereich der Schwanzwurzel als Depot appliziert. MOG-Antigen wurde der Emulsion nicht beigefügt. Zunächst wurden die Tiere über einen Zeitraum von 30 Tagen auf Krankheitsanzeichen beobachtet. Als innerhalb dieser Zeitspanne kein Tier die für die EAE typischen Krankheitssymptome zeigte, wurden in weiteren Versuchen die Mäuse zu verschiedenen Zeitpunkten (d9, d22 und d30) getötet, inguinale, popliteale Lymphknoten und Milzen herauspräpariert und mit MOG-Antigen restimuliert. Stellvertretend ist in Abb. 21 die Restimulation nach neun Tagen dargestellt.

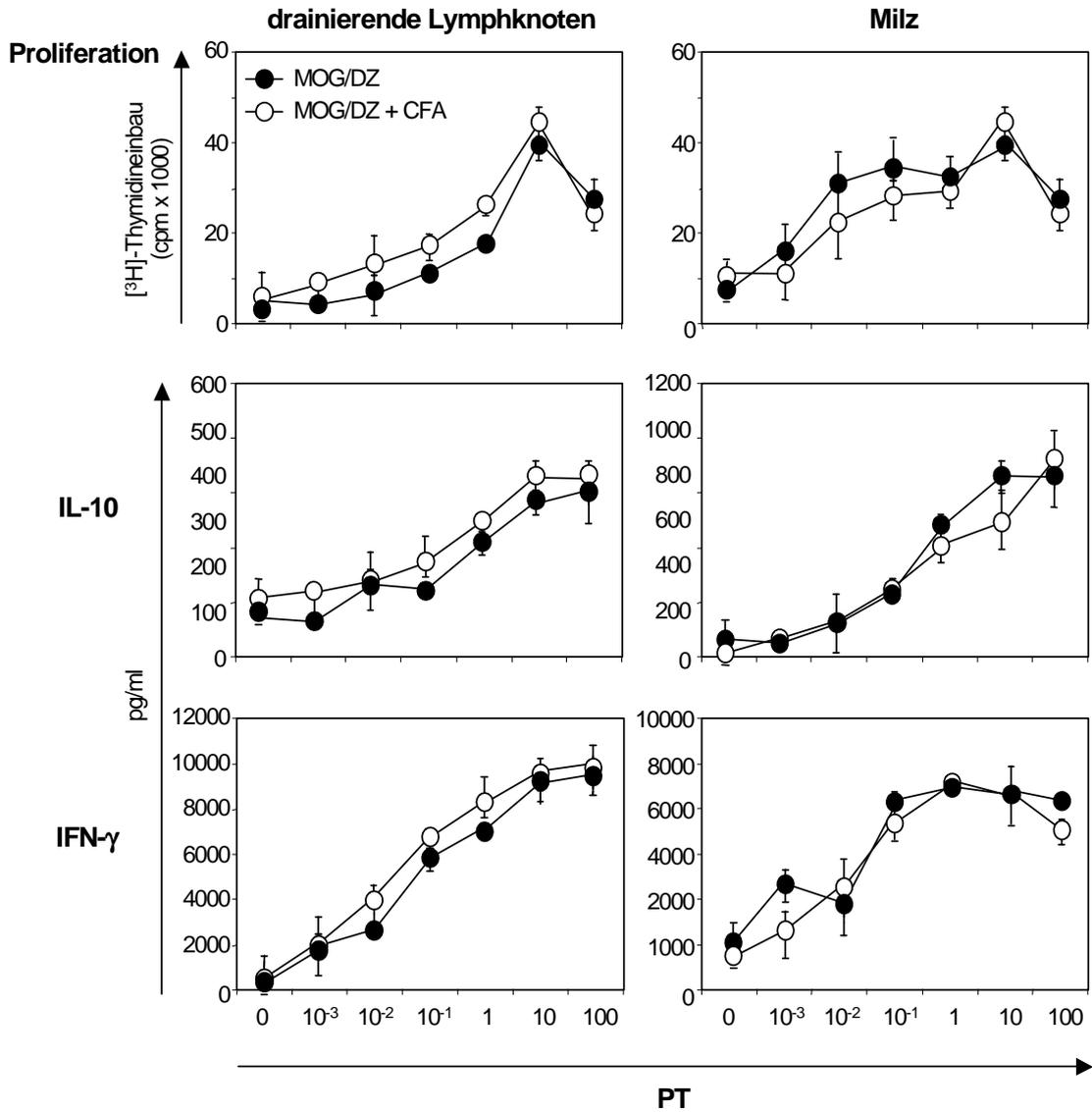


Abb. 21: **Zusätzliche s.c. Injektionen von CFA haben keinen Einfluss auf die Proliferation und das Zytokinprofil von T Zellen MOG/DZ-immunisierter Mäuse.** Knochenmarks-DZ wurden mit MOG-Protein inkubiert und C57BL/6 Mäusen nach dem bekannten Immunisierungsprotokoll dreimal s.c. injiziert. Zusätzlich wurde einer Mäusegruppe 100 µl einer CFA/PBS-Emulsion an d 0 s.c. im Bereich der Schwanzwurzel injiziert. Nach 9 Tagen wurden die Versuchstiere getötet, drainierende Lymphknoten und Milzen herauspräpariert und mit MOG-Protein restimuliert.

Die T-Zellantworten und Zytokinprofile waren zu allen Zeitpunkten vergleichbar mit den Ergebnissen der Restimulationen DZ-immunisierter Tiere. Eine Steigerung der T-Zellproliferation oder der IFN- γ Produktion konnte mit der zusätzlichen CFA-Injektion nicht erreicht werden, ebenso konnte keine klinische EAE-Erkrankung festgestellt werden.

4.5.4 Erhöhte Entzündung im Zielgewebe

Die Blut-Hirn-Schranke (BHS) im ZNS ist eine starke Barriere. Da nach MOG/DZ-Immunisierung zwar sehr hohe Mengen an MOG-spezifischen T-Zellen vorhanden sind, diese aber nicht in der Lage sind ins ZNS einzuwandern, wurden im vorliegenden Versuch IL-12p40/p35 doppelt transgene (IL-12 tg) Mäuse verwendet. Bei dieser Spezies transgenen Maus das heterodimere IL-12 im ZNS unter einem glia-spezifischen GFAP Promotor exprimiert. Im Alter von vier bis sechs Monaten entwickeln die Tiere spontan eine Meningoenzephalomyelitis mit perivaskulären und parenchymalen Entzündungen, an denen vorwiegend aktivierte T-Zellen und NK-Zellen beteiligt sind. Die Lokalisation betrifft vor allem das Kleinhirn, wo die höchste Astrozytendichte zu finden ist. Klinisch äußert sich diese Erkrankung in einer Ataxie der Hinterbeine (PAGENSTECHER et al. 2000).

Induziert man in IL-12 doppelt transgenen (IL-12 tg) Mäusen die *aktive* EAE, entwickeln die immunisierten Tiere wesentlich schneller eine mononukleäre Meningenzephalomyelitis als nicht immunisierte Tiere. Eine Verstärkung der klinischen Symptome im Vergleich zu nicht transgenen Tieren wird in der Regel nicht beobachtet.

In den im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Experimenten wurden in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Pagenstecher, Freiburg, 6 Wochen alte IL-12 tg Mäuse immunisiert. Nach dem bekannten Protokoll wurden mit MOG-Protein inkubierte DZ dreimal im Zwei-Tage-Intervall s.c. injiziert und zusätzlich PT an Tag 0 und Tag 2 i.p. injiziert. Vier Tage vorher wurde einem Teil der Tiere zur Depletion der CD4⁺CD25⁺ T-Zellen 1mg PC61 i.p. injiziert.

Die Mäuse wurden über einen Zeitraum von mehreren Wochen beobachtet. Zur Kontrolle wurden ebenfalls sechs Wochen alte C57BL/6-Mäuse immunisiert.

Keine Gruppe erkrankte an der EAE. Jedoch traten bei 50% der transgenen Tiere die für die IL-12 tg Mäuse spontan auftretenden typischen Ataxien der Hinterbeine bereits zehn Tage nach Immunisierung mit MOG-Protein inkubierten DZ auf. Gleichaltrige transgene Mäuse, denen keine DZ injiziert wurden, zeigten zu diesem Zeitpunkt noch keine Ataxien. Die Depletion der natürlichen regulatorischen T-Zellen schien keinen Einfluss zu haben.

Somit konnte die spontane Entwicklung der typischen Ataxien der transgenen Mäusen nach MOG/DZ-Immunisierung zwar beschleunigt werden, ein Zusammenbruch der Selbsttoleranz und damit die Auslösung der EAE wurde jedoch nicht erreicht (Daten nicht gezeigt).

4.5.5 Genetische Prädisposition

SJL-Mäuse sind die für die EAE-Erkrankung am besten untersuchte und empfänglichste Mauslinie nach Induktion mittels Proteolipid Protein (PLP) oder dessen Peptiden. PLP ist wie MOG ein Bestandteil der Myelinscheide im ZNS. Wie bereits beschrieben, induzierten LEGGE et al. (2002) nach Inkubation von CD8 α^+ DZ mit PLP-Peptid die EAE in SJL-Mäusen.

Die Immunisierung von C57BL/6 Mäusen mit MOG-inkubierten CD8 α^+ DZ im eigenen Versuch (siehe Punkt 4.5.2.1), führte nicht zur Ausbildung der EAE.

So wurden in diesem Versuch anstelle von C57BL/6 Mäusen weibliche Mäuse des SJL-Stammes verwendet. Knochenmarks-DZ wurden mit TNF- α und 100 μ g/ml PLP-Protein für vier Stunden inkubiert und anschließend SJL-Mäusen subkutan in die Hinterpfoten injiziert. Dies wurde am zweiten und vierten Tag wiederholt. Zusätzlich erhielten die Tiere am ersten und dritten Tag PT in der Konzentration von 200 ng/Tier. Die Tiere wurden anschließend jeden zweiten Tag über den Zeitraum von 30 Tagen auf Krankheitsanzeichen untersucht, entwickelten aber keine klinischen Symptome der EAE und erschienen über den gesamten Zeitraum gesund (Daten nicht gezeigt).

5 Diskussion

Im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit stand die Frage nach der Rolle von DZ im Geschehen der EAE, wobei besonderes Augenmerk der Fragestellung galt, ob *in vitro* generierte und mit MOG-Antigen inkubierte DZ nach subkutaner Injektion in der Lage sind, EAE in gesunden Mäusen zu induzieren.

Zusammenfassend aus Forschungen über die EAE in Mäusen ist der entscheidende Schritt die Aktivierung autoreaktiver T_H1-Zellen. Zudem spielt die genetische Prädisposition und damit die Wahl des geeigneten Mausstammes eine Rolle. Zur Überwindung der Blut-Hirn-Schranke im ZNS wirkt eine lokale Entzündung begünstigend. Die Schnittmenge dieser drei Faktoren scheint der Schlüssel zur Induktion von Autoimmunerkrankungen darzustellen.

In der vorliegenden Arbeit wurde hauptsächlich mit weiblichen Tieren des C57BL/6-Mausstammes gearbeitet, da die genetische Prädisposition für eine EAE-Erkrankung durch jahrelange Forschungen gesichert war. Als Myelinantigen wurde das ebenfalls für dieses Modell etablierte MOG-Protein gewählt, in einigen Versuchen wurde sein Peptid₃₅₋₅₅ verwendet, welches das relevante Epitop des MOG-Proteins für enzephalitogene T-Zellen darstellt (KERLERO DE ROSBO et al. 1995).

Schwerpunkt der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente war die Aktivierung MOG-spezifischer T_H1-Zellen mit dem Ziel eine EAE-Erkrankung auszulösen. In diesem Zusammenhang war die Untersuchung der Rolle von DZ und deren Subtypen von besonderem Interesse, da diese *in vivo* die einzigen APZ sind, mit dem Potential T-Zellen zu aktivieren (LUDEWIG et al. 1999).

Bei der *aktiven* EAE-Immunisierung mit Antigen in Mineralöl wird zusätzlich MT und PT injiziert, da die periphere T-Zellaktivierung durch Myelinantigene emulgiert in Adjuvans zur Überwindung der Blut-Hirn-Schranke und damit zur Auslösung der EAE nicht ausreicht (BRABB et al. 1997). Über welchen Mechanismus MT und PT dabei wirken ist noch nicht eindeutig geklärt.

In einer ersten Versuchsreihe erfolgte die Reifung aus Knochenmark generierten DZ mittels TNF- α und LPS, zusätzlich wurden MT und PT hinsichtlich ihres Einflusses auf unreife DZ untersucht. Dabei zeigte sich, dass sie ebenso wie TNF- α und LPS in der Lage waren, DZ zu reifen. Verschiedene Untersuchungen zeigen, dass die Inkubation unreifer DZ mit TNF- α , LPS, CD40L, MT und bestimmten Viren zu einer verstärkten IL-12 Produktion der DZ und damit zu einer T_H1-Polarisierung der Immunantwort führen (CELLA et al. 1997; RESCIGNO et al. 1997; BANCHEREAU und STEINMAN 1998; MACATONIA et al. 1989).

In eigenen Messungen konnte neben der Induktion von T_H1-Immunantworten durch PT und MT mit 50 μ g/ml MT die Sekretion des regulatorischen Zytokins IL-10 induziert werden. IL-10 wird unter anderem von DZ produziert und in Zusammenhang mit der Generierung induzierbarer T_R-Zellen gesehen. Mittlerweile scheint gesichert zu sein, dass T_R-Zellen durch die Produktion sogenannter regulatorischer Zytokine wie IL-10 und TGF- β überschießende Immunantworten verhindern können (UMETSU et al. 2002). Die Produktion von IL-10 in den durchgeführten Experimenten kann als mögliche Gegenreaktion zum Verhindern zu starker Immunantworten, wie bei der Induktion einer Autoimmunerkrankung, gewertet werden.

Wir haben gezeigt, dass die Injektionsroute bei der Applikation von antigenpräsentierenden DZ in die Maus entscheidend für die Qualität der Immunantwort ist. Während i.v. oder i.p. injizierte DZ Toleranz induzierten (MENGES et al. 2002), lösten s.c. injizierte DZ dagegen eine Immunantwort aus (VOIGTLÄNDER et al. 2006). Da die Induktion einer Immunantwort für die vorliegende Arbeit erforderlich war, wurden mit TNF- α , LPS, MT oder PT kultivierte DZ s.c. in die Hinterpfoten der Versuchstiere injiziert. Bei der Restimulation zeigte sich in Abhängigkeit zur Konzentration eine starke antigenspezifische T-Zellproliferation mit eindeutigem T_H1-Zellprofil. Dabei stellte sich heraus, dass die dreimalige Injektion im Zwei-Tage-Intervall zu einer maximalen T_H1-Antwort führte, gemessen als Proliferation und IFN- γ Produktion - sie war sogar doppelt so stark wie nach einmaliger Injektion. Zusätzliche DZ-

Injektionen, welche darüber hinaus vorgenommen wurden, führten zu keiner weiteren Verstärkung mehr, was zum einen auf eine maximale T_H1 -Antwort hinweist, zum anderen auf das begrenzte Wanderungsvermögen von DZ in Lymphknoten zurückzuführen ist (MARTIN-FONTECHA et al. 2003).

GAUTAM und GLYNN (1989) zeigten schon früh, dass DZ *in vitro* prozessiertes MBP an T-Zellen präsentieren, weshalb in einer zweiten Versuchsreihe parallel zu den Reifungsstimuli MOG-Protein zur Zellkultur gegeben wurde. Unreife DZ sind prädestiniert zur Aufnahme von Protein-Antigen und der anschließenden intrazellulären Prozessierung (BANCHEREAU et al. 2000), weshalb dem Protein der Vorzug gegenüber dem Peptid₃₅₋₅₅ gegeben wurde. Nach s.c. Injektion der inkubierten DZ in C57BL/6-Mäuse wurde eine starke T-Zellproliferation mit Sekretion der typischen T_H1 -Zytokinen *in vivo* erreicht, klinische Anzeichen einer EAE-Erkrankung wurden allerdings in keinem Fall beobachtet. Zusätzliche i.p. Injektionen von 200 ng PT, in Anlehnung an die *aktive* EAE-Induktion, führten auch nicht zu einer Auslösung der EAE. Dies führte zu der Annahme, dass zum einen die induzierte MOG-spezifische T_H1 -Immunantwort nicht stark genug zum Auslösen von Autoimmunität war, zum anderen wurde die Sekretion des regulatorischen Zytokins IL-10 nachgewiesen, was auf eine Beteiligung von regulatorischen T-Zellen hinweist und eine Auslösung der EAE verhindern könnte. Allerdings könnte das Fehlen noch nicht berücksichtigter Faktoren Ursache für das Ausbleiben der EAE sein.

Untersuchungen von LEGGE et al. (2002) wiesen auf die Bedeutung der Subtypen von DZ bei der Induktion der EAE hin. So gelang der Forschergruppe die Induktion der EAE mit Myelinantigen inkubierten $CD8\alpha^+$ DZ, während identisch behandelte $CD8\alpha^-$ DZ keine Krankheitssymptome in den injizierten Tieren auslösten. Auf die Bedeutung der DZ-Subtypen in Hinblick auf die Qualität der induzierten Immunantwort weisen eine Vielzahl an Untersuchungen hin (RISSOAN et al. 1999, MALDONADO-LOPEZ et al. 1999, PULENDRAN et al. 1999). Während antigenpräsentierende $CD8\alpha^+$ DZ nach Injektion in syngene Mäuse eine T_H1 -

Antwort induzierten, konnte nach Injektion antigenpräsentierender CD8 α ⁻ DZ die Sekretion typischer T_H2-Zytokine nachgewiesen werden. MALDONADO-LOPEZ et al. (1999) sahen außerdem einen Zusammenhang zwischen der Sekretion von IL-12p70 durch die DZ-Subtypen und der induzierten Immunantwort. Hohe Mengen des T_H1-Antwort induzierenden Zytokins wurde von CD8 α ⁺ DZ sezerniert, CD8 α ⁻ DZ dagegen produzierten nur sehr geringe Mengen.

CD8 α ⁺ DZ wurden in eigenen Versuchen aus den Milzen von C57BL/6 Mäusen gewonnen und nach Inkubation mit den bekannten Reagentien s.c. in die Hinterpfoten der Versuchstiere injiziert. Zusätzlich wurde nach dem erweiterten Protokoll PT i.p. injiziert. Die Tiere wurden über einen Zeitraum von 30 Tagen auf klinische Anzeichen einer EAE-Erkrankung beobachtet. Diese konnte in keinem Fall nachgewiesen werden. Damit waren die von LEGGE et al. (2002) publizierten Ergebnisse in eigenen Versuchen nicht reproduzierbar.

Eigene Ergebnisse zeigen die Induktion einer starken T_H1-Immunantwort mit deutlicher Sekretion von IL-12 und IFN- γ nach DZ-Immunisierung nach dem bekannten Protokoll. Die Bedeutung von IL-12 als relevantes Zytokin zur Auslösung der EAE ist hinreichend bekannt und wird nicht allein durch die Resistenz IL-12 defizienter Mäuse gegen die EAE bewiesen (LEONARD et al. 1995, SEGAL et al. 1998).

Durch zusätzliche Injektionen von rekombinanten murinen IL-12 oder IFN- γ sollte die T_H1-Immunantwort maximiert werden. Hierfür wurden die Zytokine in der Konzentration von bis zu 1 μ g/Tier und Injektion i.p. injiziert, wobei die Injektionen auf sechsmal im Abstand von zwei Tagen gesteigert wurden. Allerdings blieb auch mit diesen zusätzlichen Injektionen eine klinische Erkrankung der Tiere aus. Die maximale MOG-spezifische T_H1-Antwort alleine ist nicht ausreichend zur Induktion der EAE-Erkrankung in Mäusen. Vielmehr scheinen noch andere Zellen oder Faktoren Einfluss zu nehmen.

Revolutionäre Forschungen von CUA et al. (2003) weisen auf die Bedeutung von IL-23 im Zusammenhang mit den Entzündungsvorgängen im ZNS während der EAE hin. Während p40 KO-Mäuse (BECHER et al. 2002) und p19 KO-Mäuse

resistent für die *aktive* EAE-induktion mit CFA waren, waren p35 KO-Mäuse dagegen besonders empfänglich (GRAN et al. 2002). Zudem war die Präsenz von IL-23 im Gegensatz zu IL-12 im ZNS zur Induktion der EAE ausschlaggebend (CUA et al. 2003).

Jüngste Studien belegen die Induktion von sogenannten T_H17-Zellen durch IL-23 – im Gegensatz zu T_H1-Zellen produzieren sie nicht IFN- γ , sondern die Zytokine IL-17A, IL-17F, IL-6 und TNF (LANGRISH et al. 2005; AGGARWAL et al. 2003), welche vor allem mit chronischen Entzündungen in Zusammenhang gebracht werden. Bei Multiple Sklerose Patienten und EAE-erkrankten Mäusen konnten IL-17 und TNF in hohen Mengen in den Zielorganen nachgewiesen werden (MATUSEVICIUS et al. 1999; LOCK et al. 2002). IL-17 konnte außerdem in Lymphozyten EAE-erkrankter Mäuse nachgewiesen werden (ZHANG et al. 2003). Während IFN- γ defiziente Mäuse hoch empfänglich für die EAE sind (FERBER et al. 1996; TRAN et al. 2000; WILLENBORG et al. 1996; WILLENBORG et al. 1999; BETTELLI et al. 2004), ist zum einen der Zeitpunkt des Krankheitsausbruches bei IL-17 defizienten Mäusen verzögert, zum anderen sind die klinischen Symptome wesentlich milder und die Tiere erholen sich deutlich schneller (KOMIYAMA et al. 2006).

Spätestens mit den jüngsten Veröffentlichungen von CUA et al. (2006) und HOFSTETTER et al. (2005) – beide Forschergruppen konnten mit der Neutralisierung von IL-23 bzw. IL-17 durch Einsatz von Antikörpern den Ausbruch der EAE verhindern, bzw. die klinischen Symptome deutlich abschwächen – scheint die Bedeutung von IL-12 und der T_H1-Zellen für die Induktion der EAE in Frage gestellt.

Von großem Interesse wären für weiterführende Arbeiten die Präsenz von IL-23, IL-17 und T_H17-Zellen nach DZ-Immunisierung, außerdem die Fragestellung, ob nach DZ-Immunisierung und zusätzlicher Injektion von IL-23 die EAE in C57BL/6-Mäusen auslösbar wäre. Innerhalb der Arbeitsgruppe unveröffentlichte Versuche zeigten, dass die Stimulation von BM-DZ nie zur Produktion von IL-23 führten. Welche DZ oder auch andere APZ dazu in der Lage sind, sollte untersucht werden.

LPS (*E.coli*) gilt als mikrobielle Substanz als eine der potentesten Induktoren von IL-12 in produzierenden Zellen. Ebenso induziert LPS hohe IFN- γ Level *in vivo* (PAPE et al. 1997; KHORUTS et al. 1998). PAGENSTECHER et al. (2000) konnten nach zweimaliger i.p. Injektion von 10 μ g LPS im Abstand von 16 h eine Induktion von IL-12p40 im ZNS nachweisen. Neben LPS induziert auch CpG-ODN die Produktion proinflammatorischer Zytokine durch DZ, Makrophagen, NK-Zellen und B-Zellen (VAN UDEN und RAZ 2000). SACHER et al. (2002) wiesen auf die zentrale Rolle von CpG im Geschehen der T-Zell-vermittelten Autoimmunhepatitis hin. So führten viermalige i.p. Injektionen von 40 μ g CpG-ODN im Abstand von zwei Tagen zu Entzündungen und daraufhin zur Induktion von autoaggressiven T-Zellen.

Die zusätzlich zur DZ-Immunisierung mehrmalig durchgeführten Injektionen von LPS oder CpG in eigenen Versuchen konnten jedoch nicht zur Auslösung einer klinischen Erkrankung in den Versuchstieren beitragen. Daraus folgt, dass die maximale T_H1-Antwort und die zusätzliche TLR-Stimulation von anderen APZ und Granulozyten nicht zur Auslösung der Autoimmunerkrankung ausreichen. Vielmehr scheinen noch andere Faktoren Einfluss zu haben.

Um die Anzahl MOG-spezifischer T-Zellen im Organismus zu erhöhen wurden in eigenen Versuchen MOG TZR-transgene Mäuse nach dem entwickelten DZ-Immunisierungsprotokoll injiziert. Eine EAE-Erkrankung konnte nicht ausgelöst werden, was ausgehend von der Tatsache, dass bei der *passiven* EAE alleine der Transfer autoaggressiver T_H1-Zellen die EAE in naiven Tieren induziert (WEKERLE et al. 1994) verwunderlich erscheint. Eine spontane Erkrankung, welche die Tiere gelegentlich zeigen (BETTELLI et al. 2003), wurde nach DZ-Immunisierung ebenfalls nicht beobachtet. Allerdings haben wir in allen unter gleichen Bedingungen durchgeführten Versuchen nach Restimulation neben einer starken T-Zellaktivierung und einem eindeutigen T_H1-Zytokinprofil hohe Mengen des regulatorischen Zytokins IL-10 gefunden, was unter anderem von DZ produziert wird und an der Generierung induzierbarer T_R-Zellen beteiligt ist. Regulatorische T-Zellen verhindern überschießende Immunantworten und

schiene in den durchgeführten Experimenten aufgrund der starken Präsenz die Induktion der EAE zu verhindern, weshalb in weiteren Versuchen IL-10 KO Mäuse eingesetzt wurden. Bei der Induktion der *aktiven* EAE mit CFA erkrankten IL-10 KO Mäuse innerhalb kürzester Zeit schwer und müssen euthanasiert werden.

An den bisherigen Versuchsbedingungen wurde demnach nur der Mausstamm geändert. Anstatt C57BL/6-Mäusen wurden nun IL-10 KO Mäuse mit MOG/DZ immunisiert und über den Zeitraum von 30 Tagen auf Krankheitsanzeichen beobachtet. Das Ausbleiben der Erkrankung führte zu dem Schluss, dass weitere regulatorische Faktoren Einfluss haben könnten.

Neben induzierbaren existieren natürliche T_R -Zellen, zu denen die $CD4^+CD25^+$ T-Zellen gehören. SHEVACH (2002) und KOHM et al. (2002) beschrieben den Transfer $CD4^+CD25^+$ T-Zellen vor Induktion einer T_H1 -vermittelten Autoimmunerkrankung. Diese war anschließend in ihrer Symptomatik deutlich abgeschwächt.

Die i.p.-Injektion von PC61, einem anti-CD25-AK, führte zur Blockierung der natürlichen regulatorischen $CD4^+CD25^+$ T-Zellen. Die DZ-Immunisierung nach bekanntem Protokoll erfolgte vier Tage nach Injektion von PC61, also erst nach vollständiger Depletion der regulatorischen Zellen. Die Depletion konnte insgesamt 43 Tage nachgewiesen werden und damit länger als von OLDENHOVE et al. (2003) beschrieben. Eine Erkrankung konnte in keinem Fall beobachtet werden, was den Schluss zulässt, dass regulatorische T-Zellen nicht entscheidend für das Ausbleiben der EAE sind.

Zwar stellt die Aktivierung autoreaktiver T_H1 -Zellen den initialen Schritt zur Induktion der EAE dar, am Entzündungsgeschehen selbst sind jedoch noch andere Immunzellen beteiligt. So wurden in Infiltrationsherden im ZNS von MS-Patienten oder EAE-kranken Tieren neben dominierenden T- und B-Zellen noch Makrophagen, Granulozyten und Mastzellen gefunden (MARTIN et al. 1992; KRÜGER et al. 1990). Aktivierte Makrophagen produzieren MMPs, die in Zusammenhang mit dem Zusammenbruch der BHS stehen (MALIK et al. 1996) und Myelinproteine verdauen (GIJBELS et al. 1993; CHANDLER et al. 1995).

Bruchstücke werden von den Makrophagen phagozytiert über MHC invadierenden T-Zellen präsentiert, womit der Entzündungsvorgang im ZNS aufrecht erhalten wird und noch weiter voranschreitet. Untersuchungen zeigten, dass die Depletion peripherer Makrophagen die Leukozyteninvasion ins ZNS blockierte und damit zu einer Abschwächung der klinischen Symptome während der EAE führte (HUITINGA et al. 1995; BAUER et al. 1995; TRAN et al. 1998). Ein weiterer Zelltyp, der mit der Öffnung der BHS in Zusammenhang gebracht wird, sind die Mastzellen (MZ). MZ sind bislang vor allem im Zusammenhang mit Allergien beschrieben worden, allerdings wurde ihre Existenz in MS-Demyelinisierungsherden bereits 1890 von NEUMAN nachgewiesen (NEUMAN 1890). DIMITRIADOU et al. (2000) fanden dreifache Mengen von MZ im Gehirn nach *aktiver* Induktion der EAE in Ratten, wobei die Wirkung auf die BHS von den vasoaktiven Aminen nach Degranulation ausgeht (ZHUANG et al. 1996; ESPOSITO et al. 2001). Die Hemmung von Histamin und Serotonin verzögerte die Entstehung der EAE (LINTHICUM 1982; DIMITRIADOU et al. 2000; PEDOTTI et al. 2001).

Bei der Zerstörung der Myelinscheide spielen unter anderem Autoantikörper, welche von Plasmazellen produziert werden, eine große Rolle. Ihre Wirkung wird über die Komplementaktivierung vermittelt (LININGTON et al. 1989).

Ob Makrophagen, MZ oder B-Zellen nach DZ-Immunisierung aktiviert werden, ist in eigenen Versuchen nicht untersucht worden. Da EAE in erster Linie von MOG-Peptid-spezifischen T_H1-Zellen abhängt, bestätigt durch die Möglichkeit der passiven EAE, kommt diesen Zelltypen eher sekundäre Bedeutung zu.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass eine Induktion der EAE nach DZ-Immunisierung nach dem im Rahmen dieser Arbeit erstellten Protokoll nicht induzierbar war. Nur wenigen Gruppen gelang die Induktion der EAE nach DZ-Immunisierung. DITTEL et al. (1999) induzierte die EAE in B10.PL-Mäusen nach Transfer naiver MBP-TCR CD4 T-Zellen und MBP-Peptid inkubierten DZ.

Wie schon beschrieben, hoben LEGGE et al. (2002) die Bedeutung von DZ-Subtypen für die Auslösung der EAE in Mäusen hervor. In eigenen Experimenten,

welche unter ähnlichen Versuchsbedingungen durchgeführt wurden, konnte keine EAE-Erkrankung induziert werden.

Beide Forscherteams arbeiteten jeweils mit anderen Mäusestämmen und anderen Myelin-Antigenen, was die Frage aufwirft, ob MOG-Protein und C57BL/6-Mäuse für die Induktion der EAE nach DZ-Immunisierung überhaupt geeignet sind? WEIR et al. (2001) konnten die Frage scheinbar beantworten. So gelang ihnen die Induktion der EAE in C57BL/6-Mäusen nach i.v. Injektion MOG inkubierter DZ. Die Tiere erkrankten erst nach zusätzlichen Injektionen von MT emulgiert in CFA und PT. In eigenen Versuchen konnten die Ergebnisse dieser Forschergruppe nicht reproduziert werden.

Die Induktion von Autoimmunität alleine durch Autoantigenpräsentierende DZ gelang bisher im Hepatitis- und Myokarditismodell (SACHER et al. 2002; ERIKSSON et al. 2003). Somit scheint der BHS eine besondere Bedeutung zuzukommen. Bei der *aktiven* EAE-Induktion findet ein Zusammenbruch der BHS statt. Leukozyten finden sich zunächst im Subarachnoidalraum, dann im Perivaskulärraum und anschließend im gesamten Parenchym.

In eigenen Versuchen konnten nach DZ-Immunisierung im Gegensatz zu naiven Mäusen vermehrt Leukozyten im Subarachnoidalraum nachgewiesen werden und sogar vereinzelt im Perivaskulärraum. Dieses Ergebnis spricht für ein Einwandern aktivierter T-Zellen nach MOG/DZ-Immunisierung ins ZNS, der Eintritt jedoch, der z.B. durch Adhäsionsmoleküle vermittelt wird, scheint verwehrt zu bleiben.

Um den Eintritt ins ZNS zu erleichtern, wäre eine lokale Entzündung im ZNS in Verbindung mit einem Zusammenbruch der BHS vorteilhaft. Ein Versuch diesem Anspruch gerecht zu werden, wurde durch DZ-Immunisierung IL-12p40/p35 doppelt transgener Mäuse erreicht. IL-12 tg Mäuse exprimieren IL-12 im ZNS (PAGENSTECHEER et al. 2000). Nach DZ-Immunisierung konnte im eigenen Versuch der Zeitpunkt der sich spontan entwickelnden typischen Ataxien erheblich verkürzt werden. Entwickelten die Tiere normalerweise im Alter von vier bis sechs Monaten Ataxien, konnten diese bereits zehn Tage nach MOG/DZ-Immunisierung beobachtet werden.

Demnach ist es also möglich nach DZ-Immunisierung autoreaktive T_H1-Zellen zu induzieren, welche nach Eintritt ins ZNS in der Lage sind Lähmungserscheinungen durch Schädigung der Myelinscheide hervorzurufen. IL-12 tg Mäuse exprimieren IL-12 im ZNS nur über Astrozyten, was bedeuten mag, dass die Anzahl der infiltrierenden autoreaktiven T_H1-Zellen zu gering zur Auslösung der EAE waren.

Interessant wäre die Fragestellung, ob die durch DZ-Immunisierung aktivierten T_H1-Zellen nach Zusammenbruch der BHS in der Lage wären, die EAE zu induzieren.

Um diesem Ziel näher zu kommen, wären Untersuchungen im Zusammenhang mit der Borna'schen Krankheit von Vorteil. Dieses neurotrope Virus erzeugt eine lymphozytäre Meningoenzephalitis mit Beteiligung von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen (BILZER et al. 1994; DESCHL et al. 1990). Eine EAE-Induktion in Borna kranken Mäusen nach DZ-Immunisierung wäre der endgültige Beweis für das Potential von DZ eine Autoimmunerkrankung nach Präsentation des Autoantigens an T-Zellen zu induzieren.

Insgesamt bleiben aufgrund der durchgeführten Experimente und der publizierten Arbeiten die genauen auslösenden Komponenten der EAE weiterhin unbekannt. Die vorliegenden Daten erlauben jedoch den Schluss, dass eine durch myeloide BM-DZ induzierte T_H1-Immunität gegen das MOG-Antigen nicht ausreicht, obwohl die passive EAE alleine durch den Transfer MOG-spezifischer T-Zellen induziert werden kann.

6 Zusammenfassung

Eva Cierpka

Die Rolle Dendritischer Zellen bei der Induktion der Experimentellen Autoimmun-Enzephalomyelitis

Institut für Immunologie, Veterinärmedizinische Fakultät, Universität Leipzig

Dermatologische Universitätsklinik Erlangen-Nürnberg

Eingereicht im September 2006

110 Seiten, 21 Abbildungen, 10 Tabellen, 168 Literaturangaben

Schlüsselworte: Dendritische Zellen, EAE, MOG, PT, MT, IL-12, IL-10

In dieser Arbeit werden Mäuse zur *aktiven* Induktion der Experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE) mit einem Myelinantigen s.c. immunisiert. Hierfür wird das Myelin Oligodendroglia Glykoprotein (MOG) in Komplettem Freund'schen Adjuvans (Complete Freund's adjuvans, CFA) mit zusätzlichen Anteilen hitzeinaktivierter Mykobakterien (*M. tuberculosis*, MT) emulgiert. Zusätzlich wird den Tieren Pertussis Toxin (PT) i.p. injiziert. Nach etwa zehn bis zwölf Tagen entwickeln die Tiere aufsteigende Lähmungserscheinungen. Die Aktivierung autoreaktiver T-Zellen stellt den initialen Schritt zur Auslösung der Autoimmunerkrankung dar. Da *in vivo* die antigenspezifische Aktivierung naiver T-Zellen ausschließlich über Dendritische Zellen (DZ) vermittelt wird, spielen DZ vermutlich auch bei der EAE-Induktion eine entscheidende Rolle.

Zur Charakterisierung der Aktivierungsbedingungen, unter welchen *in vitro* generierte DZ in der Lage sind, nach Antigenbeladung und Injektion die EAE auszulösen, wurden zunächst DZ aus Knochenmarksvorläuferzellen generiert und mit MT oder PT inkubiert. Dies führte zur Produktion proinflammatorischer Zytokine wie TNF und IL-12, zusätzlich wurde das regulatorische Zytokin IL-10 produziert. Die Beladung dieser DZ mit MOG und die anschließende Immunisierung von Mäusen durch s.c. Injektion resultierte in einer starken T_H1-

Immunantwort mit deutlicher Proliferation der CD4⁺ T-Zellen und massiver IFN- γ Produktion, jedoch dem Fehlen einer klinischen EAE. Die Untersuchung zeigte, dass eine primäre T-Zellantwort gegen das Myelinantigen induziert wurde, diese jedoch nicht zum Ausbruch von Autoimmunität ausreichte. Beim Vergleich der Immunisierung durch CFA mit der mittels DZ, wurden Unterschiede in der Menge der induzierten Zytokine bei gleicher Proliferation festgestellt. So konnten nach CFA-Immunisierung höhere Mengen des inflammatorischen Zytokins IFN- γ und deutlich niedrigere Mengen des regulatorischen Zytokins IL-10 im Vergleich zur DZ-Immunisierung gemessen werden. Die gesteigerte Produktion von IL-10 nach DZ-Immunisierung deutete auf die Induktion regulatorischer T-Zellen hin, die in der Lage sind, die T_H1-induzierte EAE komplett zu unterdrücken. Bemühungen, mit der gezielten i.p. Injektion von IFN- γ , IL-12, LPS oder CpG, die Produktion von IFN- γ zu steigern und IL-10 zu senken, gelangen zwar, führten jedoch nicht zur Induktion der EAE. Mit der Verwendung IL-10-gendefizienter Mäuse und der Depletion regulatorischer T-Zellen durch Verwendung des Antikörpers PC61 und der anschließenden DZ-Immunisierung wurde schließlich eine direkte Abhängigkeit der EAE-induktion von der Abwesenheit oder Inaktivität regulatorischer T-Zellen widerlegt.

Die Induktion von Autoimmunität nach DZ-Immunisierung gelang bisher im Hepatitis- und Myokarditismodell (SACHER et al. 2002; ERIKSSON et al. 2003), womit der Blut-Hirn-Schranke (BHS) als natürliche Barriere eine Sonderstellung zukommt. Die vorliegende Arbeit zeigt, dass die DZ-Immunisierung IL-12 transgener Mäuse die Entwicklung der typischen Ataxien nach zehn Tagen induzierte. Folglich werden nach DZ-Immunisierung autoreaktive T_H1-Zellen induziert, welche nach Eintritt ins ZNS in der Lage sind Lähmungserscheinungen durch Schädigung der Myelinscheide hervorzurufen.

Neuere Forschungsergebnisse, unter anderem von CUA et al. (2003) und Langrish et al. (2005), heben die Bedeutung von IL-23 und IL-17 für den Aktivierungsweg der EAE hervor. Zukünftige Untersuchungen hinsichtlich dieser Zytokine basierend auf dem hier entwickelten DZ-Immunisierungsmodell wären von Interesse.

7 Summary

Eva Cierpka

Role of dendritic cells in induction of experimental autoimmune encephalomyelitis

Institute of Immunology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Leipzig

Department of Dermatology, University of Erlangen-Nürnberg

Submitted in September 2006

110 pages, 21 figures, 10 tables, 168 references

Keywords: Dendritic Cells, EAE, MOG, PT, MT, IL-12, IL-10

For *active* induction of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) mice were immunised with Myelin Oligodendroglia Glykoprotein (MOG), emulsified in Complete Freund's adjuvans (CFA), adding heat-inactivated mycobacteria (*M. tuberculosis*, MT). Additionally animals were injected with pertussis toxin (PT) i.p. Ten to twelve days later animals develop an ascending paralysis. Activation of autoreactive T cells are the main factor for induction of autoimmune disease. *In vivo* the antigen-specific activation of naive T cells is mediated by Dendritic Cells (DC), so DC seem to be important for induction of EAE.

The aim of this study was to characterize the role of DC in induction of EAE, especially the activating conditions, important for DC to induce EAE after incubation with antigen and injection into mice.

Firstly bone-marrow derived DC were incubated with MT or PT, leading to a strong production of proinflammatory cytokines such as TNF and IL-12 and the regulatory cytokine IL-10. After that, these DC were incubated with MOG and injected s.c. into mice. This led to a strong T_H1-immune response as measured by CD4⁺ T cell proliferation and strong IFN- γ production, but without symptoms of EAE. This shows that a primary T-cell response directed against the myelin antigen was induced but it was not sufficient to lead to an onset of autoimmune reactions.

The comparison of CFA immunisation and immunisation with DC showed quantitative differences in cytokine production. After CFA immunisation higher levels of IFN- γ and lower levels of IL-10 in contrast to immunisation with DC was observed.

An immunisation with DC induced regulatory T cells, as shown by increased production of IL-10. Regulatory T cells are able to suppress T_H1 immunity, inducing EAE.

Additional i.p. injections of IFN- γ , IL-12, LPS or CpG were able to increase IFN- γ and decrease IL-10 production, but were unable to induce EAE.

For turning off all regulatory T cells, IL-10 deficient mice and mice treated with antibody PC61 were immunised with DC. Even these mice failed to develop EAE. To conclude, there is no influence of regulatory T cells on the induction of EAE.

Induction of autoimmunity after immunisation with DC was shown in hepatitis and myocarditis model (SACHER et al. 2002; ERIKSSON et al. 2003), indicating a special role of the blood-brain-barrier (BBB).

This study illustrates that the immunisation of IL-12 transgenic mice with DC induced the species-typical ataxie after ten days.

To conclude, immunisation with DC induced autoreactive T_H1 cells which are able to induce ataxy after their entry in the ZNS.

New studies show that IL-23 and IL-17 are essential in the development of EAE (CUA et al. 2003; Langrish et al. 2005). Further investigations of IL-23 and IL-17 during immunisation with DC will be interesting.

8 Literaturverzeichnis

Abbas AK. The control of T cell activation vs. tolerance. *Autoimmun Rev.* 2003 May; 2(3):115-8.

Adorini L, Gregori S, Magram J, Trembleau S. The role of IL-12 in the pathogenesis of Th1 cell-mediated autoimmune diseases. *Ann N Y Acad Sci.* 1996 Oct 31; 795:208-15.

Aggarwal S, Ghilardi N, Xie MH, de Sauvage FJ, Gurney AL. Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17. *J Biol Chem.* 2003 Jan 17; 278(3):1910-4.

Akira S. Toll-like receptors and innate immunity. *Adv Immunol.* 2001; 78:1-56.

Aloisi F, Penna G, Cerase J, Menendez Iglesias B, Adorini L. IL-12 production by central nervous system microglia is inhibited by astrocytes. *J Immunol.* 1997 Aug 15; 159(4):1604-12.

Asensio VC, Campbell IL. Chemokines in the CNS: plurifunctional mediators in diverse states. *Trends Neurosci.* 1999 Nov; 22(11):504-12.

Ban E, Dupre L, Hermann E, Rohn W, Vendeville C, Quatannens B, et al. CpG motifs induce Langerhans cell migration in vivo. *Int Immunol.* 2000 Jun; 12(6):737-45.

Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, et al. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol.* 2000; 18:767-811.

Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature.* 1998 Mar 19; 392(6673):245-52.

Bauer J, Huitinga I, Zhao W, Lassmann H, Hickey WF, Kijstra CD. The role of macrophages, perivascular cells, and microglial cells in the pathogenesis of experimental allergic encephalomyelitis. *Glia*. 1995 Dec; 15(4):437-46.

Becher B, Durell BG, Noelle RJ. Experimental autoimmune encephalitis and inflammation in the absence of interleukin-12. *J Clin Invest*. 2002 Aug; 110(4):493-7.

Bernard CCA, Mandel T, Mackay IR. Experimental models of human autoimmune disease: overview and prototypes. In: Rose NR, Mackay IR. *The Autoimmune Diseases II*. Academic Press San Diego. 1992; pp. 47-106.

Bettelli E, Pagany M, Weiner HL, Linington C, Sobel RA, Kuchroo VK. Myelin oligodendrocyte glycoprotein-specific T cell receptor transgenic mice develop spontaneous autoimmune optic neuritis. *J Exp Med*. 2003 May 5; 197(9):1073-81.

Bettelli E, Sullivan B, Szabo SJ, Sobel RA, Glimcher LH, Kuchroo VK. Loss of T-bet, but not STAT1, prevents the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med*. 2004 Jul 5; 200(1):79-87.

Billiau A, Matthys P. Modes of action of Freund's adjuvants in experimental models of autoimmune diseases. *J Leukoc Biol*. 2001 Dec; 70(6):849-60.

Bilzer T, Stitz L. Immune-mediated brain atrophy. CD8+ T cells contribute to tissue destruction during borna disease. *J Immunol*. 1994 Jul 15; 153(2):818-23.

Brabb T, Goldrath AW, von Dassow P, Paez A, Liggitt HD, Goverman J. Triggers of autoimmune disease in a murine TCR-transgenic model for multiple sclerosis. *J Immunol*. 1997 Jul 1; 159(1):497-507.

Bright JJ, Musuro BF, Du C, Sriram S. Expression of IL-12 in CNS and lymphoid organs of mice with experimental allergic encephalitis. *J Neuroimmunol*. 1998 Feb; 82(1):22-30.

Brombacher F, Kastelein RA, Alber G. Novel IL-12 family members shed light on the orchestration of Th 1 responses. *Trends Immunol.* 2003 Apr; 24(4):207-12.

Burnette WN. Bacterial ADP-ribosylating toxins: form, function, and recombinant vaccine development. *Behring Inst Mitt.* 1997 Feb; (98):434-41.

Cella M, Facchetti F, Lanzavecchia A, Colonna M. Plasmacytoid dendritic cells activated by influenza virus and CD40L drive a potent TH1 polarization. *Nat Immunol.* 2000 Oct; 1(4):305-10.

Cella M, Sallusto F, Lanzavecchia A. Origin maturation and antigen presenting function of dendritic cells. *Curr Opin Immunol.* 1997 Feb; 9(1):10-6.

Chandler S, Coates R, Gearing A, Lury J, Wells G, Bone E. Matrix metalloproteinases degrade myelin basic protein. *Neurosci Lett.* 1995 Dec 15; 201(3):223-6.

Chen Y, Kuchroo VK, Inobe J, Hafler DA, Weiner HL. Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis. *Science.* 1994 Aug 26; 265(5176):1237-40.

Chen Y, Langrish CL, McKenzie B, Joyce-Shaikh B, Stumhofer J, McClanahan T, et al. Anti-IL-23 therapy inhibits multiple inflammatory pathways and ameliorates autoimmune encephalomyelitis. *J Clin Invest.* 2006 May; 116(5):1317-26.

Chicha L, Jarrossay D, Manz MG. Clonal type I interferon-producing and dendritic cell precursors are contained in both human lymphoid and myeloid progenitor populations. *J Exp Med.* 2004 Dec 6; 200(11):1519-24.

Chiller JM, Skidmore BJ, Morrisson DC, Weigle WO. Relationship of the structure of bacterial lipopolysaccharides to its function in mitogenesis and adjuvanticity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1973 Jul; 70(7):2129-33.

Chu RS, Targoni OS, Krieg AM, Lehmann PV, Harding CV. CpG oligodeoxynucleotides act as adjuvants that switch on T helper 1 (Th1) immunity. *J Exp Med*. 1997 Nov 17; 186(10):1623-31.

Clements JM, Cossins JA, Wells GM, Corkill DJ, Helfrich K, Wood LM, et al. Matrix metalloproteinase expression during experimental autoimmune encephalomyelitis and effects of a combined matrix metalloproteinase and tumour necrosis factor-alpha inhibitor. *J Neuroimmunol*. 1997 Apr; 74(1-2):85-94.

Constantinescu CS, Frei K, Wysocka M, Trinchieri G, Malipiero U, Rostami A, et al. Astrocytes and microglia produce interleukin-12p40. *Ann N Y Acad Sci*. 1996 Oct 31; 795:328-333.

Cua DJ, Sherlock J, Chen Y, Murphy CA, Joyce B, Seymour B, et al. Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature*. 2003 Feb 13; 421(6924):744-8.

Cuzner ML, Gveric D, Strand C, Loughlin AJ, Paemen L, Opdenakker G, et al. The expression of tissue-type plasminogen activator, matrix metalloproteinases and endogenous inhibitors in the central nervous system in multiple sclerosis: comparison of stages in lesion evolution. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1996 Dec; 55(12):1194-204.

Deschl U, Stitz L, Herzog S, Frese K, Rott R. Determination of immune cells and expression of major histocompatibility complex class II antigen in encephalitic lesions of experimental Borna disease. *Acta Neuropathol (Berl)*. 1990; 81(1):41-50.

Dimitriadou V, Pang X, Theoharides TC. Hydroxyzine inhibits experimental allergic encephalomyelitis (EAE) and associated brain mast cell activation. *Int J Immunopharmacol*. 2000 Sep; 22(9):673-84.

Dittel BN, Visintin I, Merchant RM, Janeway CA. Presentation of the self antigen myelin basic protein by dendritic cells leads to experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol.* 1999 Jul 1; 163(1):32-9.

Eriksson U, Ricci R, Hunziker L, Kurrer MO, Oudit GY, Watts TH, et al. Dendritic cell-induced autoimmune heart failure requires cooperation between adaptive and innate immunity. *Nat Med.* 2003 Dec; 9(12):1484-90.

Esposito P, Gheorghe D, Kandere K, Pang X, Connolly R, Jacobson S, et al. Acute stress increases permeability of the blood-brain barrier through activation of brain mast cells. *Brain Res.* 2001 Jan 5; 888(1):117-27.

Ferber IA, Brocke S, Taylor-Edwards C, Ridgway W, Dinisco C, Steinman L, et al. Mice with a disrupted IFN-gamma gene are susceptible to the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *J Immunol.* 1996 Jan 1; 156(1):5-7.

Flügel A, Berkowicz T, Ritter T, Labeur M, Jenne DE, Zhaoxia L, et al. Migratory activity and functional changes of green fluorescent effector cells before and during experimental autoimmune encephalomyelitis. *Immunity.* 2001 May; 14(5):547-60.

Gautam AM, Glynn P. Lewis rat lymphoid dendritic cells can efficiently present homologous myelin basic protein to encephalitogenic lymphocytes. *J Neuroimmunol.* 1989 Apr; 22(2):113-21.

Gijbels K, Masure S, Carton H, Opdenakker G. Gelatinase in the cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis and other inflammatory neurological disorders. *J Neuroimmunol.* 1992 Nov; 41(1):29-34.

Gijbels K, Proost P, Masure S, Carton H, Billiau A, Opdenakker G. Gelatinase B is present in the cerebrospinal fluid during experimental autoimmune encephalomyelitis and cleaves myelin basic protein. *J Neurosci Res.* 1993 Nov 1; 36(4):432-40.

Gillessen S, Carvajal D, Ling P, Podlaski FJ, Stremlo DL, Familletti PC, et al. Mouse interleukin-12 (IL-12) p40 homodimer: a potent IL-12 antagonist. *Eur J Immunol.* 1995 Jan; 25(1):200-6.

Glabinski AR, Ransohoff RM. Sentries at the gate: chemokines and the blood-brain-barrier. *J Neurovirol.* 1999 Dec; 5(6):623-34.

Goetzl EJ, Banda MJ, Leppert D. Matrix metalloproteinases in immunity. *J Immunol.* 1996 Jan 1; 156(1):1-4.

Gong J, Stenger S, Zack JA, Jones BE, Bristol GC, Modlin RL, et al. Isolation of mycobacterium-reactive CD1-restricted T cells from patients with human immunodeficiency virus infection. *J Clin Invest.* 1998 Jan 15; 101(2):383-9.

Gran B, Zhang GX, Yu S, Li J, Chen XH, Ventura ES, et al. IL-12p35 deficient mice are susceptible to experimental autoimmune encephalomyelitis: evidence for redundancy in the IL-12 system in the induction of central nervous system autoimmune demyelination. *J Immunol.* 2002 Dec 15; 169(12):7104-10.

Groux H, O'Garra A, Bigler M, Rouleau M, Antonenko S, de Vries JE, et al. A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature.* 1997 Oct 16; 389(6652):737-42.

Ha SJ, Lee CH, Lee SB, Kim CM, Jang KL, Shin HS, et al. A novel function of IL-12p40 as a chemotactic molecule for macrophages. *J Immunol.* 1999 Sep 1; 163(5):2902-8.

Hawiger D, Inaba K, Dorsett Y, Guo M, Mahnke K, Rivera M, et al. Dendritic cells induce peripheral T cell unresponsiveness under steady state conditions in vivo. *J Exp Med.* 2001 Sep 17; 194(6):769-79.

Heinzel FP, Hujer AM, Ahmed FN, Rerko RM. In vivo production and function of IL-12 p40 homodimers. *J Immunol.* 1997 May 1; 158(9):4381-8.

Hickey WF, Hsu BL, Kimura H. T-lymphocyte entry into the central nervous system. *J Neurosci Res.* 1991 Feb; 28(2):254-60.

Hickey WF. Migration of hematogenous cells through the blood-brain barrier and the initiation of CNS inflammation. *Brain Pathol.* 1991 Jan; 1(2):97-105.

Hochrein H, O'Keeffe M, Wagner H. Human and mouse plasmacytoid dendritic cells. *Hum Immunol.* 2002 Dec; 63(12):1103-10.

Hofstetter HH, Shive CL, Forsthuber TG. Pertussis Toxin modulates the immune response to neuroantigens injected in incomplete Freund's adjuvant: Induction of Th1 cells and experimental autoimmune encephalomyelitis in the presence of high frequencies of Th2 cells. *J Immunol.* 2002 Jul 1; 169(1):117-25.

Hofstetter HH, Ibrahim SM, Koczan D, Kruse N, Weishaupt A, Toyka KV, et al. Therapeutic efficacy of IL-17 neutralization in murine experimental autoimmune encephalomyelitis. *Cell Immunol.* 2005 Oct; 237(2):123-30.

Hopkins SJ, Rothwell NJ. Cytokines and the nervous system. I: Expression and recognition. *Trends Neurosci.* 1995 Feb; 18(2):83-8.

Huitinga I, Ruuls SR, Jung S, van Rooijen N, Hartung H-P, Dijkstra CD. Macrophages in T cell line-mediated, demyelinating, and chronic relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis in Lewis rats. *Clin Exp Immunol.* 1995 May; 100(2):344-51.

Inaba K, Inaba M, Romani N, Aya H, Deguchi M, Ikehara S, et al. Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J Exp Med.* 1992 Dec 1; 176(6):1693-702.

Inaba K, Turley S, Iyoda T, Yamaide F, Shimoyama S, Reis e Sousa C, et al. The formation of immunogenic major histocompatibility complex class II-peptide ligands in lysosomal compartments of dendritic cells is regulated by inflammatory stimuli. *J Exp Med.* 2000 Mar 20. 191(6):927-36.

Jaksits S, Kriehuber E, Charbonnier AS, Rappersberger K, Stingl G, Maurer D. CD34+ cell-derived CD14+ precursor cells develop into Langerhans cells in a TGF-beta-1-dependent manner. *J Immunol.* 1999 Nov 1; 163(9):4869-77.

Janeway CAT, P. *Immunologie*, second Edn. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg-Berlin-Oxford. 1997.

Kaisho T, Akira S. Dendritic-cell function in Toll-like receptor- and MyD88-knockout mice. *Trends Immunol.* 2001 Feb; 22(2):78-83.

Kato K, Shimozato O, Hoshi K, Wakimoto H, Hamada H, Yagita H, et al. Local production of the p40 subunit of interleukin 12 suppresses T-helper 1-mediated immune responses and prevents allogeneic myoblast rejection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 Aug 20; 93(17):9085-9.

Kearney ER, Pape KA, Loh DY, Jenkins MK. Visualization of peptide-specific T cell immunity and peripheral tolerance induction in vivo. *Immunity.* 1994 Jul; 1(4):327-39.

Kerlero de Rosbo N, Mendel I, Ben-Nun, A. Chronic relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis with a delayed onset and an atypical clinical course, induced in PL/J mice by myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG)-derived peptide: preliminary analysis of MOG T cell epitopes. *Eur J Immunol.* 1995 Apr; 25(4):985-93.

Khoruts A, Mondino A, Pape KA, Reiner SL, Jenkins MK. A natural immunological adjuvant enhances T cell clonal expansion through a CD28-dependent, interleukin (IL)-2-independent mechanism. *J Exp Med.* 1998 Jan 19; 187(2):225-36.

Kohm AP, Carpentier PA, Anger HA, Miller SD. Cutting edge: CD4+ CD25+ regulatory T cells suppress antigen-specific autoreactive immune responses and central nervous system inflammation during active experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol.* 2002 Nov 1; 169(9):4712-6.

Komiyama Y, Nakae S, Matsuki T, Nambu A, Ishigame H, Kakuta S, et al. IL-17 plays an important role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol.* 2006 Jul 1; 177(1):566-73.

Krüger PG, Bo L, Myhr KM, Karlsen AE, Taule A, Nyland HI, et al. Mast cells and multiple sclerosis: a light and electron microscopic study of mast cells in multiple sclerosis emphasizing staining procedure. *Acta Neurol Scand.* 1990 Jan; 81(1):31-6.

Kuhn R, Lohler J, Rennick D, Rajewsky K, Muller W. Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell.* 1993 Oct 22; 75(2):263-74.

Langrish CL, Chen Y, Blumenschein WM, Mattson J, Basham B, Sedgwick JD, et al. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation *J Exp Med.* 2005 Jan 17; 201(2): 233-40.

Larsen CP, Steinman RM, Witmer-Pack M, Hankins DF, Morris PJ, Austyn JM. Migration and maturation of Langerhans cells in skin transplants and explants. *J Exp Med.* 1990 Nov 1; 172(5):1483-93.

Lee SJ, Benveniste EN. Adhesion molecule expression and regulation on cells of the central nervous system. *J Neuroimmunol.* 1999 Aug 3; 98(2):77-88.

Legge KL, Gregg RK, Maldonado-Lopez R, Li L, Caprio JC, Moser M, et al. On the Role of Dendritic Cells in Peripheral T Cell Tolerance and Modulation of Autoimmunity. *J Exp Med.* 2002 Jul 15; 196(2):217-27.

Leonard JP, Waldburger KE, Goldman SJ. Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis by antibodies against interleukin 12. *J Exp Med.* 1995 Jan 1; 181(1):381-6.

Leonard JP, Waldburger KE, Goldman SJ. Regulation of experimental autoimmune encephalomyelitis by interleukin-12. *Ann N Y Acad Sci.* 1996 Oct 31; 795:216-26.

Linington C, Morgan BP, Scolding NJ, Wilkins P, Piddlesden S, Compston DA. The role of complement in the pathogenesis of experimental allergic encephalomyelitis. *Brain*. 1989 Aug; 112(4):895-911.

Linthicum DS, Munoz JJ, Blaskett A. Acute experimental autoimmune encephalomyelitis in mice. I. Adjuvant action of *Bordetella pertussis* is due to vasoactive amine sensitisation and increased vascular permeability of the central nervous system. *Cell Immunol*. 1982 Nov 1; 73(2):299-310.

Lock C, Hermans B, Pedotti R, Brendolan A, Schadt E, Garren H, et al. Gene-microarray analysis of multiple sclerosis lesions yields new targets validated in autoimmune encephalomyelitis. *Nat Med*. 2002 May; 8(5):500-8.

Ludewig B, Odermatt B, Ochsenbein AF, Zinkernagel RM, Hengartner H. Role of dendritic cells in the induction and maintenance of autoimmune diseases. *Immunological Reviews*. 1999 Jun; 169:45-54.

Lutz MB, Kukutsch N, Ogilvie AL, Rössner S, Koch F, Romani N, et al. An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. *Journal of Immunological Methods*. 1999 Feb 1; 223(1):77-92.

Lutz MB. T-Zell-Toleranz durch unreife Dendritische Zellen und die neue Rolle von IL-4 als indirektes T-Helfer-Typ 1 Zytokin. *Immunologie Aktuell*. 2000 Mai; 1:54-55.

Ma X, Aste-Amezaga M, Trinchieri G. Regulation of interleukin-12 production. *Ann N Y Acad Sci*. 1996 Oct 31; 795:310-8.

Macatonia SE, Hosken NA, Litton M, Vieira P, Hsich SC, Culpepper JA, et al. Dendritic cells produce IL-12 and direct the development of Th1 cells from naive CD4+ T cells. *J Immunol*. 1995 May 15; 154(10):5071-9.

Macatonia SE, Taylor PM, Knight SC, Askonas BA. Primary stimulation by dendritic cells induces antiviral proliferative and cytotoxic T cell responses in vitro. *J Exp Med*. 1989 Apr 1; 169(4):1255-64.

Maeda A, Sobel RA. Matrix metalloproteinases in the normal human central nervous system, microglial nodules, and multiple sclerosis lesions. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1996 Mar; 55(3):300-9.

Maldonado-Lopez R, De Smedt T, Michel P, Godfroid B, Pajak C, Heirman C, et al. CD8 α^+ and CD8 α^- subclasses of dendritic cells direct the development of distinct T helper cells in vivo. *J Exp Med.* 1999 Feb 1; 189(3):587-92.

Malik N, Greenfield BW, Wahl AF, Kiener PA. Activation of human monocytes through CD40 induces matrix metalloproteinases. *J Immunol.* 1996 May 15; 156(10):3952-60.

Manz MG, Traver D, Akashi K, Merad M, Miyamoto T, Engleman EG, et al. Dendritic cell development from common myeloid progenitors. *Ann N Y Acad Sci.* 2001 Jun; 938:167-173.

Manz MG, Traver D, Miyamoto T, Weissman IL, Akashi K. Dendritic cell potentials of early lymphoid and myeloid progenitors. *Blood.* 2001 Jun 1; 97(11):3333-41.

Marrack P, Kappler J, Kotzin BL. Autoimmune disease: why and where it occurs. *Nat Med.* 2001 Aug; 7(8):899-905.

Martin R, McFarland HF, McFarlin DE. Immunological aspects of demyelination diseases. *Annu Rev Immunol.* 1992; 10:153-187.

Martin-Fontecha A, Sebastiani S, Höpken UE, Ugucioni M, Lipp M, Lanzavecchia A, et al. Regulation of dendritic cell migration to the draining lymph node: Impact on T lymphocyte traffic and priming. *J Exp Med.* 2003 Aug 18; 198(4):615-21.

Mason D. A very high level of crossreactivity is an essential feature of the T-cell receptor. *Immunol Today.* 1998 Sep; 19(9):395-404.

Mattner F, Fischer S, Guckes S, Jin S, Kaulen H, Schmitt E, et al. The interleukin-12 subunit p40 specifically inhibits effects of the interleukin-12 heterodimer. *Eur J Immunol.* 1993 Sep; 23(9):2202-8.

Matusevicius D, Kivisakk P, He B, Kostulas N, Ozenci V, Fredrikson S, et al. Interleukin-17 mRNA expression in blood and CSF mononuclear cells is augmented in multiple sclerosis. *Mult Scler*. 1999 Apr; 5(2):101-4.

Medzhitov R, Janeway C Jr. Innate immunity. *N Engl J Med*. 2000 Aug 3; 343(5):338-44.

Medzhitov R, Janeway CA. Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. *Science*. 2002 Apr 12; 296(5566):298-300.

Medzhitov R. Toll-like receptors and innate immunity. *Nature Rev Immunol*. 2001 Nov; 1(2):135-45.

Menges M, Rössner S, Voigtländer C, Schindler H, Kukutsch NA, Bogdan C, et al. Repetitive injections of dendritic cells matured with tumor necrosis factor alpha induce antigen-specific protection of mice from autoimmunity. *J Exp Med*. 2002 Jan 7; 195(1):15-21.

Moser M, Murphy KM. Dendritic cell regulation of TH1-TH2 development. *Nat Immunol*. 2000 Sep; 1(3):199-205.

Mu HH, Sewell WA. Regulation of DTH and IgE responses by IL-4 and IFN-gamma in immunized mice given pertussis toxin. *Immunology*. 1994 Dec; 83(4):639-45.

Mutis T, Cornelisse YE, Ottenhoff TH. Mycobacteria induce CD4+ T cells that are cytotoxic and display Th1-like cytokine secretion profile: heterogeneity in cytotoxic activity and cytokine secretion levels. *Eur J Immunol*. 1993 Sep; 23(9):2189-95.

Nakano H, Yanagita M, Gunn MD. CD11c(+) B220(+) Gr-1(+) cells in mouse lymph nodes and spleen display characteristics of plasmacytoid dendritic cells. *J Exp Med*. 2001 Oct 15; 194(8):1171-8.

Neuman J. Über das Vorkommen der sogenannten 'Mastzellen' bei pathologischen Veränderungen des Gehirns. Virchows Arch Pathol Anat. 1890; 122:378-380.

Nikolic T, Dingjan GM, Leenen PJ, Hendriks RW. A subfraction of B220(+) cells in murine bone marrow and spleen does not belong to the B cell lineage but has dendritic cell characteristics. Eur J Immunol. 2002 Mar; 32(3):686-92.

Noseworthy JH, Lucchinetti C, Rodriguez M, Weinshenker BG. Multiple sclerosis. N Engl J Med. 2000 Sep 28; 34(13):938-52.

O'Connor KC, Bar-Or A, Hafler DA. The neuroimmunology of multiple sclerosis: possible roles of T and B lymphocytes in immunopathogenesis. J Clin Immunol. 2001 Mar; 21(2):81-92.

Ohashi PS. T-cell signalling and autoimmunity: molecular mechanisms of disease. Nat Rev Immunol. 2002 Jun; 2(6):427-38.

Oldenhove G, De Heusch M, Urbain-Vansanten G, Urbain J, Maliszewski C, Leo O, et al. CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells control Th1 responses to foreign antigens induced by mature DCs *in vivo*. J Exp Med. 2003 Jul 21; 198(2):259-66.

Oldstone MB. Molecular mimicry and immune-mediated diseases. FASEB J. 1998 Oct; 12(13):1255-65.

Oppmann B, Lesley R, Blom B, Timans JC, Xu Y, Hunte B, et al. Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12. Immunity. 2000 Nov; 13(5):715-25.

Owens T, Renno T, Taupin V, Krakowski M. Inflammatory cytokines in the brain: does the CNS shape immune responses? Immunol Today. 1994 Dec; 15(12):566-71.

Owens T, Tran E, Hassan ZM, Krakowski M. Immune cell entry to the CNS-a focus for immunoregulation of EAE. Res Immunol. 1998 Nov-Dec; 149(9):781-9.

Pagenstecher A, Lassmann S, Carson MJ, Kincaid CL, Stalder AK, Campbell IL. Astrocyte-Targeted Expression of IL-12 induces active cellular immune responses in the central nervous system and modulates experimental allergic encephalomyelitis. *J Immunol*. 2000 May 1; 164(9):4481-92.

Pagenstecher A, Stalder AK, Kincaid CL, Volk B, Campbell IL. Regulation of matrix metalloproteinases and their inhibitor genes in lipopolysaccharide-induced endotoxemia in mice. *Am J Pathol*. 2000 Jul; 157(1):197-210.

Pape KA, Khoruts A, Mondino A, Jenkins MK. Inflammatory cytokines enhance the in vivo clonal expansion and differentiation of antigen-activated CD4⁺ T cells. *J Immunol*. 1997 Jul 15; 159(2):591-8.

Pedotti R, Mitchell D, Wedemeyer J, Karpuj M, Chabas D, Hattab EM, et al. An unexpected version of horror autotoxicus: anaphylactic shock to a self-peptide. *Nat Immunol*. 2001 Mar; 2(3):216-22.

Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu MY, Huffel CV, Du X, et al. Defective LPS signalling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science*. 1998 Dec 11; 282(5396):2085-8.

Pulendran B, Smith JL, Caspary G, Brasel K, Pettit D, Marakovsky E, et al. Distinct dendritic cell subsets differentially regulate the class of immune response in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999 Feb 2; 96(3):1036-41.

Reis e Sousa C, Germain RN. Analysis of adjuvant function by direct visualization of antigen presentation in vivo: endotoxin promotes accumulation of antigen-bearing dendritic cells in the T cell areas of lymphoid tissue. *J Immunol*. 1999 Jun 1; 162(11):6552-61.

Reis e Sousa C. Toll-like receptors and dendritic cells: for whom the bug tolls. *Semin Immunol*. 2004 Feb; 16(1):27-34.

Rescigno M, Winzler C, Delia D, Mutini C, Lutz M, Ricciardi-Castagnoli P. Dendritic cell maturation is required for initiation of the immune response. *J Leukoc Biol.* 1997 Dec; 61(4):415-21.

Ridet JL, Malhotra SK, Privat A, Gage FH. Reactive astrocytes: cellular and molecular cues to biological function. *Trends Neurosci.* 1997 Dec; 20(12):570-7.

Rissoan MC, Soumelis V, Kadowaki N, Grouard G, Briere F, de Waal Malefyt R, et al. Reciprocal control of T helper cell and dendritic cell differentiation. *Science.* 1999 Feb 19; 283(5405):1183-6.

Roake JA, Rao AS, Morris PJ, Larsen CP, Hankins DF, Austyn JM. Dendritic cell loss from nonlymphoid tissues after systemic administration of lipopolysaccharide, tumor necrosis factor, and interleukin 1. *J Exp Med.* 1995 Jun 1; 181(6):2237-47.

Romani N, Stingl G, Tschachler E, Witmer MD, Steinman RM, Shevach EM, et al. The Thy-1-bearing cell of murine epidermis. A distinctive leukocyte perhaps related to natural killer cells. *J Exp Med.* 1985 Jun 1; 161(6):1368-83.

Ryan M, McCarthy L, Rappuoli R, Mahon BP, Mills KH. Pertussis toxin potentiates Th1 and Th2 responses to co-injected antigen: adjuvant action is associated with enhanced regulatory cytokine production and expression of the co-stimulatory molecules B7-1, B7-2 and CD28. *Int Immunol.* 1998 May; 10(5):651-62.

Sacher T, Knolle P, Nichterlein T, Arnold B, Hämmerling AJ, Limmer A. CpG-ODN-induced inflammation is sufficient to cause T-cell-mediated autoaggression against hepatocytes. *Eur J Immunol.* 2002 Dec; 32(12):3628-37.

Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol.* 1995 Aug 1; 155(3):1151-64.

Sallusto F, Cella M, Danieli C, Lanzavecchia A. Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the

major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *J Exp Med*. 1995 Aug 1; 182(2):389-400.

Samore MH, Siber BR. Pertussis toxin enhanced IgG1 and IgE responses to primary tetanus immunization are mediated by interleukin-4 and persist during secondary responses to tetanus alone. *Vaccine*. 1996 Mar; 14(4):290-7.

Schuler G, Steinman RM. Murine epidermal Langerhans cells mature into potent immunostimulatory dendritic cells in vitro. *J Exp Med*. 1985 Mar 1; 161(3):526-46.

Schwartz RH, Mueller DL, Jenkins MK, Quill H. T-cell clonal anergy. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 1989; 54 Pt 2:605-10.

Segal BM, Chang JT, Shevach EM. CpG oligonucleotides are potent adjuvants for the activation of autoreactive encephalitogenic T cells in vivo. *J Immunol*. 2000 Jun 1; 164(11):5683-8.

Segal BM, Dwyer BK, Shevach EM. An interleukin (IL)-10/IL-12 immunoregulatory circuit controls susceptibility to autoimmune disease. *J Exp Med*. 1998 Feb 16; 187(4):537-46.

Shevach EM. CD4⁺ CD25⁺ suppressor T cells: more questions than answers. *Nat Rev Immunol*. 2002 Jun; 2(6):389-400.

Shive CL, Hofstetter H, Arredondo L, Shaw C, Forsthuber TG. The enhanced antigen-specific production of cytokines induced by pertussis toxin is due to clonal expansion of T cells and not to altered effector functions of long-term memory cells. *Eur J Immunol*. 2000 Aug; 30(8):2422-31.

Shortman K, Liu YJ. Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nature Rev Immunol*. 2002 Mar; 2(3):151-61.

Stalder AK, Pagenstecher A, Yu NC, Dincaid C, Chiang CS, Hobbs MV, et al. Lipopolysaccharide-induced IL-12 expression in the central nervous system and cultured astrocytes and microglia. *J Immunol*. 1997 Aug 1; 159(3):1344-51.

Steinman L. Multiple sclerosis: A coordinated immunological attack against myelin in the central nervous system. *Cell*. 1996 May 3; 85(3):299-302.

Steinman RM, Inaba K, Turley S, Pierre P, Mellman I. Antigen capture, processing, and presentation by dendritic cells: recent cell biological studies. *Hum Immunol*. 1999 Jul; 60(7):562-7.

Takeda K, Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol*. 2003; 21:335-376.

Thornton AM, Shevach EM. CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *J Exp Med*. 1998 Jul 20; 188(2):287-96.

Tran EH, Hoekstra K, van Rooijen N, Dijkstra CD, Owens T. Immune invasion of the central nervous system parenchyma and experimental allergic encephalomyelitis, but not leukocyte extravasation from blood, are prevented in macrophage-depleted mice. *J Immunol*. 1998 Oct 1; 161(7):3767-75.

Tran EH, Prince EN, Owens T. IFN-gamma shapes immune invasion of the central nervous system via regulation of chemokines. *J Immunol*. 2000 Mar 1; 164(5):2759-68.

Trapp BD, Bö L, Mörk S, Chang A. Pathogenesis of tissue injury in MS lesions. *J Neuroimmunol*. 1999 Jul 1; 98(1):49-56.

Trinchieri G. Cytokines acting on or secreted by macrophages during intracellular infection (IL-10, IL-12, IFN-gamma). *Curr Opin Immunol*. 1997 Feb; 9(1):17-23.

Trinchieri G. Immunobiology of Interleukin-12. *Immunologic Research*. 1998; 17(1-2):269-78.

Trupp M, Belluardo N, Funakoshi H, Ibanez CF. Complementary and overlapping expression of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF), c-ret proto-

oncogene, and GDNF receptor-alpha indicates multiple mechanisms of trophic actions in the adult rat CNS. *J Neurosci*. 1997 May 15; 17(10):3554-67.

Turley SJ, Inaba K, Garrett WS, Ebersold M, Unternaehrer J, Steinman RM, et al. Transport of peptide-MHC class II complexes in developing dendritic cells. *Science*. 2000 Apr 21; 288(5465):522-7.

Umetsu DT, McIntire JJ, Akbari O, Macaubas C, DeKruyff RH. Asthma: an epidemic of dysregulated immunity. *Nat Immunol*. 2002 Aug; 3(8):715-20.

Van Uden J, Raz E. Introduction to immunostimulatory DNA sequences. *Springer Semin Immunopathol*. 2000; 22(1-2):1-9.

Vella AT, Mitchell T, Groth B, Linsley PS, Green JM, Thompson CB, et al. CD28 engagement and proinflammatory cytokines contribute to T cell expansion and long-term survival in vivo. *J Immunol*. 1997 May 15; 158(10):4714-20.

Voigtländer C, Rössner S, Cierpka E, Theiner G, Wiethe C, Menges M, et al. Dendritic cells matured with TNF can be further activated in vitro and in vivo thereby converting their tolerogenicity into immunogenicity. *J Immunother*. 2006 Jul-Aug; 29(4):407-15.

Weir CR, Nicolson K, Backstrom BT. Experimental autoimmune encephalomyelitis induction in naive mice by dendritic cells presenting a self-peptide. *Immunol Cell Biol*. 2002 Feb; 80(1):14-20.

Wekerle H, Kojima K, Lannes-Vieira J, Lassmann H, Linington C. Animal models. *Ann Neurol*. 1994; 36 suppl:47-53.

Wekerle H. Immune pathogenesis of multiple sclerosis. Brain autoimmune reactivity and its control by neuronal function. *Mult Scler*. 1998 Jun; 4(3):136-7.

Willenborg DO, Fordham S, Bernard CC, Cowden WB, Ramshaw IA. IFN-gamma plays a critical downregulatory role in the induction and effector phase of myelin

oligodendrocyte glycoprotein-induced autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol.* 1996 Oct 15; 157(8):3223-7.

Willenborg DO, Fordham SA, Staykova MA, Ramshaw IA, Cowden WB. IFN-gamma is critical to the control of murine autoimmune encephalomyelitis and regulates both in the periphery and in the target tissue: a possible role for nitric oxide. *J Immunol.* 1999 Nov 15; 163(10):5278-86.

Windhagen A, Newcombe J, Dangond F, Strand C, Woodroffe MN, Cuzner ML, et al. Expression of costimulatory molecules B7-1 (CD80), B7-2 (CD86), and interleukin 12 cytokine in multiple sclerosis lesions. *J Exp Med.* 1995 Dec 1; 182(6):1985-96.

Wingerchuk DM, Lucchinetti CF, Noseworthy JH. Multiple sclerosis: current pathophysiological concepts. *Lab Invest.* 2001 Mar; 81(3):263-81.

Wu HY, Weiner HL. Oral Tolerance. *Immunol Res.* 2003; 28(3):265-84.

Yong T, Meininger A, Linthicum DS. Enhancement of histamine-induced vascular leakage by pertussis toxin in SJL/J mice but not BALB/c mice. *J Neuroimmunol.* 1993 Jun; 45(1-2):47-52.

Zal T, Volkman A, Stockinger B. Mechanisms of tolerance induction in major histocompatibility complex class II-restricted T cells specific for a blood-borne self-antigen. *J Exp Med.* 1994 Dec 1; 180(6):2089-99.

Zhang GX, Gran B, Yu S, Li J, Siglienti I, Chen X, et al. Induction of experimental autoimmune encephalomyelitis in IL-12 receptor- β 2-deficient mice: IL-12 responsiveness is not required in the pathogenesis of inflammatory demyelination in the central nervous system. *J Immunol.* 2003 Feb 15; 170(4):2153-60.

Zhuang X, Silverman AJ, Silver R. Brain mast cell degranulation regulates blood-brain barrier. *J Neurobiol.* 1996 Dec; 31(4):393-403.

Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Schuler für die Beschäftigung als wissenschaftliche Mitarbeiterin und für die Möglichkeit zur Durchführung der Promotion an der dermatologischen Klinik bedanken.

Meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Alber danke ich herzlich für die positive Unterstützung, die ausgezeichnete Betreuung und die kritische Durchsicht des Manuskriptes.

Ich danke meinem Betreuer und Chef PD Dr. Manfred Lutz für die Überlassung des spannenden Themas, die stets gern gewährte Unterstützung und die ausgezeichnete Betreuung. Vor allem aber danke ich ihm für die durchweg freundschaftliche Zusammenarbeit und seiner ansteckenden Begeisterung für die Wissenschaft.

Des weiteren möchte ich mich bei Prof. Dr. Axel Pagenstecher und Dr. Tjalf Ziemssen für die gelungene Kooperation bedanken.

Weiterhin danke ich allen wissenschaftlichen Mitarbeitern der Dermatologischen Klinik für Ihre Unterstützung, insbesondere Frau Dr. Gabi Theiner für die gute Zusammenarbeit und Ihre Hilfe bei der Durchführung der praktischen Versuchen.

Außerdem möchte ich mich noch bei den Mitarbeitern des Nikolaus-Fiebiger-Zentrums zum einen für die Nutzung des FACS-sorters, zum anderen für die Möglichkeit der Anfertigung und Färbung der Kryostatschnitte bedanken, wobei ich mich an dieser Stelle auch bei Jens Hänig bedanken möchte.