

**Molekulare Mechanismen und zelluläre Kooperationen  
tolerogener Dendritischer Zellen bei der Experimentellen  
Autoimmun-Enzephalomyelitis**

Dissertation zur Erlangung  
des naturwissenschaftlichen Doktorgrades  
der Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von  
Carolin Brandl, geb. Geus  
aus Erlangen

Würzburg, 2010

Eingereicht am: 10. Juni 2010

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. Th. Dandekar

Gutachter: Prof. Dr. M. Lutz

Gutachter: Prof. Dr. R. Gross

Tag des Promotionskolloquiums: 21. Juli 2010

Doktorurkunde ausgehändigt am:

**Inhaltsverzeichnis:**

<b>1. Einleitung</b>	<b>-6-</b>
1.1. Das Immunsystem	-6-
1.1.1. Angeborenes Immunsystem	-6-
1.1.2. Adaptives Immunsystem	-7-
1.2. Die Milz	-8-
1.3. Marginalzonen B-Zellen	-10-
1.4. NKT-Zellen	-10-
1.5. Dendritische Zellen	-11-
1.5.1. Funktion von Dendritischen Zellen	-11-
1.5.2. Reifungsstadien von Dendritischen Zellen	-12-
1.6. Toleranz	-14-
1.7. Autoimmunität	-15-
1.7.1. Multiple Sklerose und Experimentelle Autoimmun- Enzephalomyelitis	-16-
1.7.2. Multiple Sklerose und Viruserkrankungen	-18-
1.7.3. Lipid-Antigene bei der Multiplen Sklerose	-19-
1.7.4. EAE-Protektion durch Injektion Dendritischer Zellen	-19-
1.8. Kostimulation und Koinhibition	-21-
1.8.1. B7-H1	-23-
<b>2. Fragestellung</b>	<b>-24-</b>
<b>3. Material und Methoden</b>	<b>-25-</b>
3.1. Medien, Puffer und Lösungen	-25-
3.2. Spezielle Reagenzien	-26-
3.2.1. Stimulantien und Zytokine	-26-
3.2.2. Peptide	-27-
3.2.3. Lipide	-27-
3.2.4. Fluoreszierende Partikel	-27-
3.3. Antikörper	-27-
3.4. Mausstämme	-28-
3.5. Zellkulturmethoden	-28-
3.5.1. Kultur von Zellen	-28-
3.5.2. Einfrieren und Auftauen von Zellen	-28-

3.5.3. Zellzählung und Vitalitätstest	-29-
3.5.4. Gewinnung von murinem GM-CSF	-29-
3.5.5. Färbung von Zellen mit CFSE	-29-
3.5.6. Knochenmark-Präparation	-29-
3.5.7. Generierung von Dendritischen Zellen	-30-
3.5.8. Präparation von Milz-Zellen	-30-
3.6. Immunologische Methoden	-30-
3.6.1. Fluoreszenzaktivierte Durchflusszytometrie (FACS)	-30-
3.6.2. Proliferationsmessung	-31-
3.6.2.1. CFSE-Verdünnung	-31-
3.6.2.2. [ <sup>3</sup> H]-Thymidin-Einbau	-31-
3.6.3. "Enzyme-linked-immunoabsorbent-assay" (ELISA)	-31-
3.6.4. "Mixed lymphocyte reaction" (MLR)	-32-
3.6.5. Restimulation von Milz-Zellen	-32-
3.6.6. Ko-Kultur von DZ mit NKT-Zell Hybridomen	-32-
3.7. Histologische Methoden	-32-
3.7.1. Herstellung von Gefrierschnitten	-32-
3.7.2. Färbung von Gefrierschnitten	-33-
3.8. Tierversuche	-33-
3.8.1. DZ-Injektion und EAE-Induktion	-33-
3.8.2. Masern-Infektion und EAE-Induktion	-34-
<b>4. Ergebnisse</b>	<b>-35-</b>
4.1. Einfluss des koinhibitorischen Moleküls B7-H1 auf das tolerogene Potential von DZ	-35-
4.1.1. Oberflächenmarker und stimulatorische Kapazität von DZ aus Wildtyp und B7-H1 <sup>-/-</sup> Mäusen	-35-
4.1.2. Tolerogenes Potential von WT und B7-H1 <sup>-/-</sup> DZ	-36-
4.1.3. Injektion von B7-H1 <sup>-/-</sup> DZ moduliert die T-Zell-Antwort in der Peripherie	-38-
4.1.4. Injektion von B7-H1 <sup>-/-</sup> DZ bewirkt die Produktion von protektiven Serum-Zytokinen	-39-
4.1.5. Produktion der Serum-Zytokine ist MOG-unabhängig	-40-
4.1.6. Serum-Zytokine werden von Typ II NKT-Zellen produziert	-41-
4.1.7. Typ II NKT-Zellen werden von DZ stimuliert und dieser	

Effekt wird über B7-H1 reguliert	-42-
4.2. Einfluss von Marginalzonen-B-Zellen auf die EAE-Protektion	-44-
4.2.1. Wanderung von intravenös injizierten DZ in die Milz	-44-
4.2.2. MZ-B-Zellen sind wichtig für die EAE-Protektion	-46-
4.3. Effekt von Glykolipiden auf DZ	-47-
4.3.1. Lipide bewirken DZ-Reifung	-48-
4.3.2. Lipid-gereifte DZ stimulieren T-Zellen	-49-
4.4. Einfluss von Masern-Virus auf EAE	-50-
4.4.1. EAE-Induktion in Masern-infizierten Tieren bewirkt deren Tod	-51-
<b>5. Diskussion</b>	<b>-52-</b>
5.1. B7-H1-Defizienz verstärkt das tolerogene Potential von DZ durch Aktivierung von Typ II NKT-Zellen	-52-
5.2. MZ-B-Zellen tragen zur EAE-Protektion bei	-56-
5.3. Lipid-Antigene reifen DZ, welche wiederum T-Zellen aktivieren können	-57-
5.4. Neues Mausmodell zur Untersuchung von Virus- Erkrankungen und EAE	-59-
<b>6. Zusammenfassung</b>	<b>-60-</b>
<b>7. Summary</b>	<b>-61-</b>
<b>8. Literaturverzeichnis</b>	<b>-62-</b>
<b>9. Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>-71-</b>
<b>10. Veröffentlichungen</b>	<b>-73-</b>
<b>11. Lebenslauf</b>	<b>-74-</b>

## **1. Einleitung**

### **1.1. Das Immunsystem**

Das Immunsystem schützt den Organismus vor Infektionen durch Mikroorganismen und Autoimmunität. Die Zellen des Immunsystems stammen von hämatopoetischen Stammzellen ab und differenzieren in die verschiedenen Komponenten des Immunsystems. Man kann zwischen der angeborenen und der adaptiven Immunantwort unterscheiden (1). Fehlgeleitete adaptive Immunantworten können zu Autoimmunität führen.

#### **1.1.1. Angeborenes Immunsystem**

Die angeborene Abwehr stellt die erste Verteidigung gegen Pathogene dar. Die erste Abwehr erfolgt dabei über die Körperepithelien, wie zum Beispiel die Schleimhäute des Atmungsepithels oder des Verdauungstraktes, welche eine Barriere gegen Erreger bilden. Zusätzlich werden eindringende Mikroorganismen durch einen niedrigen pH-Wert im Magen oder das Lysozym bekämpft, welches in der Tränenflüssigkeit oder im Speichel die Zellwand der Bakterien zersetzt. Wenn Pathogene diese Barrieren durchdringen, werden sie als „fremd“ erkannt und vom Immunsystem beseitigt (1).

Zum einen wird der Erreger von Makrophagen angegriffen, welche allgemein vorkommende Merkmale von Krankheitserregern über Rezeptoren auf ihrer Oberfläche erkennen. Sie eliminieren die Erreger durch Phagozytose und setzen Zytokine und Chemokine frei, was eine Entzündungsreaktion auslöst. Durch die Chemokine werden weitere Zellen wie Monozyten und neutrophile Zellen angelockt. Neutrophile Granulozyten können phagozytieren und Monozyten differenzieren am Entzündungsherd zu Makrophagen. Eine weitere Komponente der angeborenen Immunität ist das Komplementsystem. Darunter versteht man zahlreiche Proteine, die an die Oberfläche von Mikroorganismen binden und über eine Kaskade deren Tod auslösen. Das Komplementsystem kann zum einen durch Porenbildung die Lyse von Pathogenen bewirken, zum anderen kann die Oberfläche des Erregers durch Bindung der Komplementsystemproteine opsonisiert werden, was dazu führt, dass dieser durch Phagozyten beseitigt werden kann. Neben den Makrophagen und dem

Komplementsystem gibt es außerdem noch natürliche Killerzellen, welche Tumorzellen oder Veränderungen durch Virusbefall erkennen und anschließend in der Zielzelle Apoptose induzieren (1).

Viele Pathogene haben jedoch Strategien entwickelt, um der ersten Abwehr durch das angeborene Immunsystem zu entgehen. In diesem Fall kommen die Zellen des adaptiven Immunsystems zum Einsatz.

### **1.1.2. Adaptives Immunsystem**

Zum adaptiven Immunsystem gehören die B- und T-Lymphozyten, welche sich im Knochenmark bzw. im Thymus entwickeln. Diese Zellen haben antigenspezifische Rezeptoren und können somit Krankheitserreger spezifisch erkennen. Eine große Vielfalt von Rezeptoren wird durch Genumlagerungen während der Entwicklung der B- und T-Zellen gewährleistet. Dabei ist wichtig, dass jede Zelle nur eine Spezifität auf der Oberfläche trägt (1).

Die adaptive Immunantwort beginnt damit, dass ein Pathogen von einer unreifen dendritischen Zelle (DZ) durch Phagozytose aufgenommen und abgebaut wird. Die DZ wird dadurch aktiviert, wandert zu einem benachbarten Lymphknoten und reift zu einer antigenpräsentierenden Zelle (APZ). Makrophagen können auch als APZ wirken. APZ können B- und T-Zellen stimulieren, wenn diese den passenden antigenspezifischen B-Zell-Rezeptor (BZR) bzw. T-Zell-Rezeptor (TZR) auf der Oberfläche tragen. Für die Stimulation von B-Zellen ist gegebenenfalls noch die Hilfe von T-Helfer-Zellen nötig. Bei den T-Zellen kann man zwischen  $CD4^+$  und  $CD8^+$  T-Zellen unterscheiden. Die  $CD4^+$  Zellen werden auch als T-Helfer-Zellen bezeichnet, welche in Th1-, Th2- und Th17-Zellen differenzieren können. Diese haben unterschiedliche Aufgaben und produzieren dementsprechend verschiedene Zytokine. T-Zellen erkennen ihre Zielzelle, wenn diese das entsprechende Antigen im Zusammenhang mit einem MHC-Molekül trägt. Diese Moleküle sind spezialisierte Proteine, die Peptidfragmente auf die Zelloberfläche transportieren und dort präsentieren können. Man unterscheidet im Wesentlichen zwischen MHC Klasse I und Klasse II, welche verschiedene Antigene präsentieren. Die zytotoxischen  $CD8^+$  Zellen können Zielzellen, die auf ihrer Oberfläche Fragmente eines Pathogens in Verbindung mit einem MHC I Molekül tragen, durch Induktion von Apoptose beseitigen. Dies können Zellen sein, die von einem Virus oder einem intrazellulären

Erreger befallen sind.  $CD4^+$  Zellen können Zellen, die das spezifische Antigen mit einem MHC II Molekül auf der Oberfläche tragen, aktivieren. Th1- und Th2-Zellen regen B-Zellen dazu an, Antikörper zu produzieren und Th1-Zellen aktivieren außerdem Makrophagen. Die Aktivierung von B-Zellen durch die APZ bewirkt, dass diese zu Plasmazellen differenzieren. Diese haben die Aufgabe große Mengen von Antikörpern zu produzieren, welche dieselbe Spezifität wie der BZR haben. Antikörper sind Immunglobuline und sie bestehen aus zwei identischen schweren Ketten und zwei identischen leichten Ketten, welche über kovalente Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. An dem einen Ende des Antikörpers befindet sich die hochvariable Region, welche die Antigenbindungsstelle bildet. An dem anderen Ende befindet sich die Bindungsstelle für Komponenten des Komplementsystems. Antikörper können bakterielle Toxine neutralisieren, an Bakterienoberflächen binden und somit deren Aufnahme und Eliminierung durch Makrophagen erleichtern und sie können das Komplementsystem aktivieren (1).

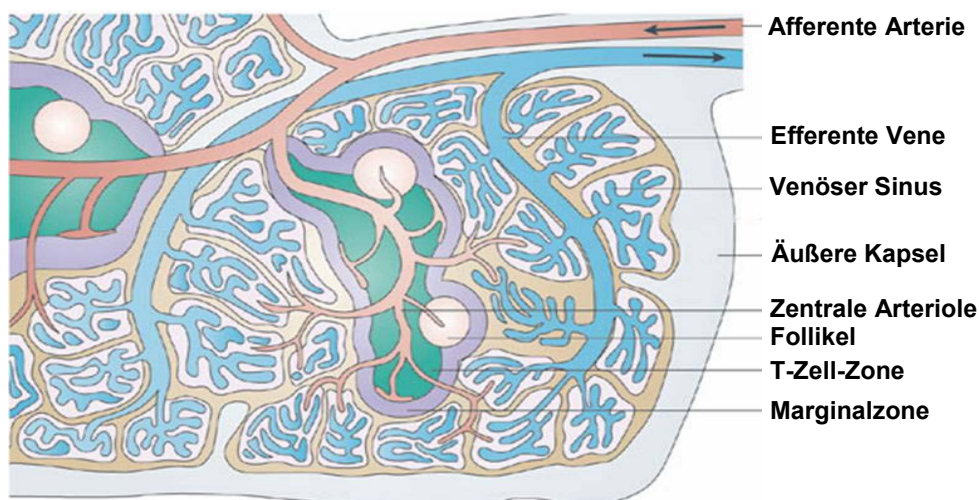
Eine besondere Fähigkeit des adaptiven Immunsystems ist das so genannte „immunologische Gedächtnis“. Es besteht aus Immunzellen die bereits eine Infektion abgewehrt haben. Sie können jahrelang im Organismus verweilen und bewirken, dass es bei erneuter Infektion mit demselben Pathogen zu einer schnelleren und wirksameren Reaktion kommt und führen somit zu einer andauernden Immunität (1).

### **1.2. Die Milz**

Die Milz dient als sekundäres lymphatisches Organ und hat deshalb einige wichtige Aufgaben bei der Immunantwort. Sie ist jedoch auch ein Filter für das Blut (2). Der Blutstrom gelangt über die Arterie in die rote Pulpa der Milz, welche einen offenen Blutkreislauf ohne Endothelien darstellt (3). Von dort gelangt das Blut über den Sinus in die Vene, welche das Blut wieder in den Körper zurück leitet. Der Sinus stellt eine besondere Struktur aus Endothel und speziellen Fasern dar (4), welche nur für frische Erythrozyten durchlässig sind (5). Ältere Erythrozyten werden somit aus dem Blutkreislauf herausgefiltert und in der roten Pulpa von Makrophagen verdaut. Dieser Prozess dient auch dem Recycling des Eisens vom Hämoglobin der Erythrozyten (6). In der roten Pulpa befinden sich auch die Antikörper-produzierenden Plasmazellen, welche nach ihrer Differenzierung aus der weißen in die rote Pulpa wandern (7). Die weiße Pulpa stellt das lymphatische Gewebe der Milz dar, welches für die adaptive



Immunantwort verantwortlich ist und B- und T-Zell-Bereiche enthält. In der T-Zell-Zone interagieren T-Zellen mit DZ und B-Zellen, wohingegen in den B-Zell-Follikeln die Expansion von aktivierten B-Zellen stattfindet (8). Eine besondere Struktur der Milz stellt die Marginalzone (MZ) dar, welche die weiße Pulpa umgibt (Abb. 1). Sie ist der Ort, an dem Zellen den Blutstrom verlassen und in die weiße Pulpa eintreten. Dieser Eintritt in die weiße Pulpa ist ein aktiver Prozess, der durch bestimmte Proteine reguliert wird (9). Gebildet wird die MZ aus verschiedenen Zelltypen, welche voneinander abhängig sind. Am äußeren Rand der MZ befinden sich die MZ Makrophagen, weiter innen befinden sich die MZ Metallophilen Makrophagen und dazwischen befinden sich die MZ B-Zellen und ein Subtyp von DZ (8). Nachdem das Blut auf dem Weg durch die Milz die MZ passiert, können dort Pathogene und lösliche Antigene erkannt werden. In der MZ der Milz werden angeborene und adaptive Immunantworten miteinander verknüpft. Zum einen werden Pathogene von den Makrophagen beseitigt, zum anderen können DZ und MZ B-Zellen nach Aktivierung in die weiße Pulpa wandern und dort  $CD4^+$  T-Zellen aktivieren und die Differenzierung von B-Zellen zu Plasmazellen stimulieren (10, 11). Es gibt auch Hinweise vom „anterior chamber associated immune deviation“ (ACAID)-Modell, welche belegen, dass es in der MZ der Milz zu einer Interaktion von APZ, MZ-B-Zellen und NKT-Zellen kommt (12). Bei diesem Modell wird durch Injektion eines Antigens in das Auge systemische Toleranz gegen dieses Antigen ausgelöst.



**Abbildung 1: Struktur der Milz**

von Mebius und Kraal (8), gedruckt mit Erlaubnis von Macmillan Publishers: Nature Reviews 5:606-616, copyright 2005

Die afferente Arterie verzweigt sich in die zentrale Arteriole in der weißen Pulpa. Die weiße Pulpa besteht aus T-Zell-Zone und B-Zell-Follikel und ist umrandet von der MZ. Die Arteriolen enden in der

roten Pulpa, wo das Blut wieder vom venösen Sinus aufgenommen wird und in die efferente Vene gelangt.

### 1.3. Marginalzonen-B-Zellen

MZ B-Zellen unterscheiden sich von follikulären B-Zellen aufgrund ihrer Oberflächenmarker (13). Sie zeigen eine starke Expression von IgM, CD1d, CD21 und CD22 und eine niedrige Expression von IgD, CD23 und B220. Das CD22-Molekül gehört zur „sialic acid binding immunoglobulin-like lectins“ (Siglec) Familie, es bindet an Sialinsäuren (14) und wirkt als negativer Regulator des B-Zell-Signals (15, 16). CD22<sup>-/-</sup> Mäuse zeigen eine Reduktion in der MZ B-Zell-Population (17). MZ B-Zellen sind darauf spezialisiert Pathogene im Blut zu detektieren und differenzieren daraufhin entweder zu Plasmazellen oder werden zu funktionellen APZ (18). Sie haben einen bereits voraktivierten Zustand mit einer hohen B7-1 und B7-2 Expression, was eine schnelle Reaktion gegen Pathogene ermöglicht. Aufgrund ihrer günstigen Lage in der MZ mit direktem Kontakt zum Blutstrom sind MZ B-Zellen fähig Pathogene im Blut schnell zu erkennen und zu beseitigen (19). MZ B-Zellen können nicht nur große Mengen an Antikörpern produzieren, sie interagieren auch mit vielen anderen Zelltypen. Sie können die Expansion von CD4<sup>+</sup> T-Zellen bewirken (10), sie können Antigene zu follikulären DZ transportieren (20) und sie interagieren mit NKT-Zellen. MZ B-Zellen exprimieren große Mengen des CD1d-Moleküls, welches von NKT-Zellen erkannt wird (21).

### 1.4. NKT-Zellen

NKT-Zellen werden dadurch charakterisiert, dass sie sowohl einen TZR als auch den NK1.1-Marker tragen, welcher für NK-Zellen typisch ist (22). NK1.1 wird jedoch nur in C57BL/6 Mäusen exprimiert und ist auch nicht auf allen NKT-Zellen vorhanden (23). Außerdem wird es nach Aktivierung herunterreguliert (24). NKT-Zellen können jedoch über CD1d-Tetramere identifiziert werden, da sie das CD1d-Molekül erkennen (25), welches dem MHC I Molekül ähnlich ist und Lipid-Antigene präsentiert (26). Das Glykolipid Antigen  $\alpha$ -Galactosylceramid, welches aus einem Meeresschwamm gewonnen wird, ist ein Stimulator von NKT-Zellen (27). Man kann verschiedene Typen von NKT-Zellen unterscheiden. Die klassischen (Typ I) NKT-Zellen exprimieren in Mäusen eine V $\alpha$ 14-J $\alpha$ 18 TZR  $\alpha$ -Kette und beim Menschen eine

V $\alpha$ 24-J $\alpha$ 18  $\alpha$ -Kette (28). Die nicht-klassischen (Typ II) NKT-Zellen können dagegen verschiedene TZR-Ketten auf der Oberfläche tragen. Diese Zellen wurden erstmals in MHC Klasse II defizienten Mäusen identifiziert, welche zwar keine MHC-abhängigen T-Zellen aber dennoch CD1d-abhängige, V $\alpha$ 14-J $\alpha$ 18-negative T-Zellen besitzen (29). NKT-Zellen sind, wie die MZ B-Zellen, für schnelle Immunantworten verantwortlich. Sie bewirken diese durch die Produktion von großen Zytokin-Mengen.

### **1.5. Dendritische Zellen**

#### **1.5.1. Funktion von Dendritischen Zellen**

DZ gehören, wie die Makrophagen und B-Zellen, zu den professionellen APZ des Immunsystems (30). DZ befinden sich in peripheren Geweben und reagieren dort auf eindringende Mikroorganismen. Sie können diese aufnehmen und anschließend enzymatisch verdauen. Es gibt verschiedene Mechanismen, die den DZ die Aufnahme von Pathogenen ermöglichen. Makropinozytose ist ein Rezeptor-unabhängiger Mechanismus um lösliche Antigene aufzunehmen (31). Apoptotisches Material wird von unreifen DZ unter anderem mithilfe von speziellen Integrinen aufgenommen (32). Makropinozytose und die Aufnahme von apoptotischen Zellen findet ständig statt, bewirkt jedoch keine Reifung der DZ. Um infektiöses Material von körpereigenem Material unterscheiden zu können, haben DZ spezielle Rezeptoren, welche konservierte Muster auf der Oberfläche von Krankheitserregern erkennen. Diese Muster werden als „pathogen-associated molecular pattern“ (PAMPs) und die dazugehörigen Rezeptoren als „antigen pattern recognition receptors“ (PRRs) bezeichnet. Ein Beispiel hierfür ist die Gruppe der so genannten „Toll-like Rezeptoren“ (TLR) (33). Diese erkennen bakterielle Bestandteile wie Lipopolysaccharid (LPS), RNA und DNA. TLR-Signale bewirken eine Reifung der DZ. Weitere wichtige Rezeptor-Familien sind die C-Typ-Lectine (34). Außerdem können DZ Mikroorganismen erkennen, wenn diese bereits von Antikörpern gebunden wurden. Die DZ erkennt dann den Antikörper mithilfe ihrer Fc-Rezeptoren (35). Das aufgenommene Material wird in der DZ prozessiert und Fragmente der Pathogene werden in Kombination mit MHC Molekülen auf der Zelloberfläche präsentiert (36). Extrazellulär aufgenommene Antigene, zum Beispiel extrazelluläre Bakterien, werden überwiegend auf MHC II präsentiert. Diese Mikroorganismen

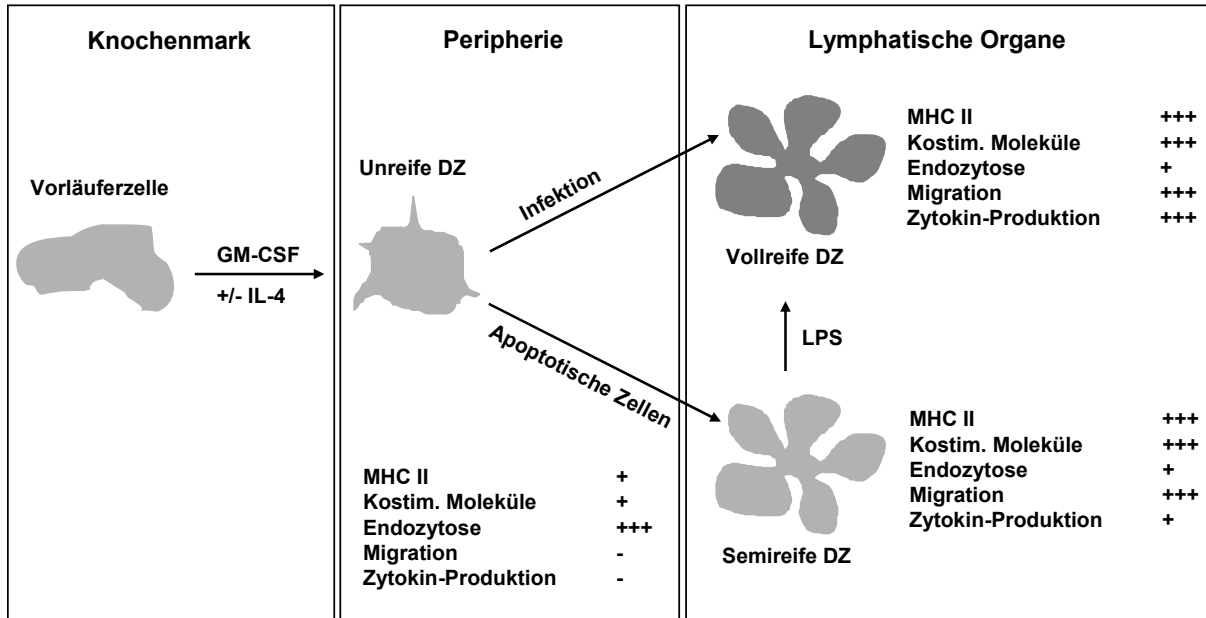
werden in Phagosomen oder Endosomen der DZ aufgenommen und dort durch Proteinase verdaut. Die Fragmente werden auf MHC II Moleküle geladen und zur Zelloberfläche transportiert. Manche Pathogene, zum Beispiel Viren, entgehen der Endozytose. Sie verschmelzen mit ihren Zielzellen und somit gelangt der Virusinhalt ins Zytoplasma. Sie werden direkt in der Zelle durch das Proteasom verdaut und auf MHC I Molekülen an die Oberfläche transportiert. Diese intrazellulären Antigene werden auf MHC I Molekülen präsentiert.  $CD4^+$  T-Zellen erkennen Antigene im Zusammenhang mit dem MHC II Molekül und  $CD8^+$  T-Zellen erkennen Antigene, die vom MHC I Molekül präsentiert werden. Es ist allerdings auch möglich, dass exogene Antigene auf MHC I Moleküle beladen werden und umgekehrt. Dieses Phänomen nennt man Kreuz-Präsentation (37). Dieser Mechanismus ist wichtig, damit bestimmte Antigene an  $CD4^+$  und  $CD8^+$  T-Zellen präsentiert werden können. Außerdem können DZ auch Lipid-Antigene über das CD1d-Molekül an NKT-Zellen präsentieren.

Wenn DZ im peripheren Gewebe ein Pathogen entdeckt und aufgenommen haben, wandern sie anschließend über die Lymphflüssigkeit in den drainierenden Lymphknoten, um das prozessierte Antigen an T-Zellen zu präsentieren und diese dadurch zu stimulieren. Die Wanderung der DZ wird durch Kontakt zu Komponenten der extrazellulären Matrix und durch Chemokine vermittelt, welche an den Rezeptor CCR7 auf der DZ binden (38, 39). DZ befinden sich in fast allen Organen und sind besonders stark in Haut und Mucosa vorhanden, wo es verstärkt zum Kontakt mit Pathogenen kommt (30). DZ haben je nach Reifungszustand unterschiedliche Aufgaben.

### **1.5.2. Reifungsstadien von Dendritischen Zellen**

DZ können nicht nur Immunantworten auslösen, indem sie T-Zellen stimulieren, sie können auch Toleranz induzieren (40, 41). Die Reaktion, die eine DZ bewirkt, hängt von ihrem Reifungszustand ab (42, 43). DZ im peripheren Gewebe befinden sich in einem unreifen Zustand. In diesem Zustand haben sie sehr gute phagozytotische Eigenschaften und zeigen eine niedrige Expression von kostimulatorischen und MHC Molekülen auf ihrer Oberfläche. Außerdem produzieren diese Zellen keine Zytokine und haben keine migratorischen Fähigkeiten. Eine unreife DZ ist dafür verantwortlich Antigene aufzunehmen und T-Zell-Anergie (siehe 1.6.) auszulösen. Diese Zellen sind

tolerogen, da sie der T-Zelle nur Antigene präsentieren können, jedoch kein kostimulatorisches Signal liefern, was zu Anergie führt (44). Durch Kontakt mit einem Reifungsstimulus, zum Beispiel einem Bakterium oder Virus, verändern sich die Oberfläche und die Eigenschaften der DZ. Vollständig gereifte DZ regulieren die Expression von MHC II Molekülen und von kostimulatorischen Molekülen (B7-1, B7-2) hoch. Damit können sie die beiden nötigen Signale zur Stimulation der T-Zellen liefern (siehe Abschnitt 1.8.). Außerdem produzieren sie verstärkt Zytokine. Diese Zellen nehmen nun keine Antigene mehr auf, sondern haben die Aufgabe in den Lymphknoten zu wandern und dort Antigene zu präsentieren und dadurch T-Zellen zu aktivieren. Diese DZ werden als immunogen bezeichnet. Zusätzlich zu diesen Reifungsstadien wurde die semireife DZ charakterisiert (43). Diese zeigt wie die vollreife DZ verstärkte Expression von kostimulatorischen Molekülen und MHC II. Im Gegensatz zu vollreifen DZ produzieren jedoch die semireifen DZ keine Zytokine. Diese DZ wirken ebenfalls tolerogen und können *in vitro* durch Reifung mit TNF- $\alpha$  generiert werden. Diese Zellen sind nicht vollständig gereift, können jedoch durch Stimulation mit LPS zu einer vollreifen, Zytokin-produzierenden DZ werden (45).



**Abbildung 2: Die Reifung von DZ und ihre Eigenschaften**

Aus Vorläuferzellen entwickeln sich unter Einwirkung von GM-CSF (Maus) und zusätzlich IL-4 (Mensch) unreife DZ. Diese exprimieren geringe Mengen an MHC II und kostimulatorischen Molekülen auf ihrer Oberfläche und betreiben in hohem Maße Endozytose. Durch eine Infektion erhalten sie ein Reifungs-Signal. Reife DZ betreiben weniger Endozytose, exprimieren mehr kostimulatorische Moleküle und präsentieren große Mengen an aufgenommenen Antigenen auf MHC II Molekülen. Außerdem produzieren sie Zytokine und können migrieren. DZ können auch

apoptotisches Zellmaterial aus dem Gewebe aufnehmen und erlangen dadurch einen semireifen Phänotyp. Diese DZ können ebenfalls migrieren, sie exprimieren kostimulatorische Oberflächenmoleküle und MHC II, sie produzieren jedoch keine Zytokine. Semireife DZ können durch einen Reifungsstimulus wie LPS weiter in vollreife DZ differenzieren.

### 1.6. Toleranz

Von Toleranz spricht man, wenn gegen ein bestimmtes Antigen keine Immunreaktion ausgelöst wird. Dabei unterscheidet man zwischen der zentralen Toleranz, welche in Thymus und Knochenmark entsteht, und der peripheren Toleranz, welche im peripheren Gewebe entsteht. Zentrale Toleranz bedeutet, dass Zellen während ihrer Entwicklung auf ihre Selbstreaktivität geprüft und dementsprechend selektioniert werden (46). Im Thymus werden nahezu alle körpereigenen Antigene von Endothelzellen exprimiert (47). Die T-Zell-Vorläufer wandern durch den Thymus und binden an diese präsentierten Antigene. Bindet ein Rezeptor sehr gut an diese Antigene muss die entsprechende Zelle durch Apoptose beseitigt werden. Diesen Vorgang nennt man negative Selektion. Es kann jedoch vorkommen, dass autoreaktive Zellen dieser Selektion entgehen und in die Peripherie gelangen.

Um diese Zellen zu eliminieren sind weitere Mechanismen der peripheren Toleranz nötig. Diese können in fünf verschiedene Kategorien unterteilt werden: Ignoranz, Anergie, Deletion, Immundeviation und Regulation/Suppression (42). Von Ignoranz spricht man, wenn ein Antigen zwar in peripheren Organen exprimiert wird, jedoch nicht ins Blut oder in sekundäre lymphatische Organe gelangt und nicht von APZ präsentiert werden kann. Somit sind die entsprechenden T-Zellen ignorant für ihr Antigen.

Anergie tritt dann ein, wenn eine T-Zelle zwar ihr Antigen auf einem MHC Molekül einer APZ erkennt, aber kein zusätzliches kostimulatorisches Signal über CD28 erfolgt (48). Nur reife, nicht jedoch unreife DZ, exprimieren die kostimulatorischen Moleküle B7-1 und B7-2 (siehe Abschnitt 1.5.2.), welche an CD28 auf der T-Zelle binden und somit das zweite Aktivierungssignal für die T-Zelle liefern. Für eine vollständige T-Zell-Aktivierung sind TZR-Signal und Kostimulation nötig (siehe Abschnitt 1.8.). Anergische T-Zellen regulieren CTLA-4 hoch, welches ein negatives Signal vermittelt und mit 10fach höherer Affinität als CD28 an die kostimulatorischen Moleküle B7-1 und B7-2 bindet (49). Trifft diese anergische T-Zelle erneut auf eine

kompetente APZ, welche B7-1 und B7-2 exprimiert, kommt es über CTLA-4 zu einem inhibitorischen Signal für diese Zelle (50).

Durch mangelnde Kostimulation kann es auch zu Deletion kommen (51). Dabei werden autoreaktive Zellen durch Induktion von Apoptose abgetötet. Dies geschieht durch Interaktion von Fas (CD95) auf den T-Zellen mit Fas-L(CD95L), welcher von vielen Zellen im peripheren Gewebe exprimiert wird. Zur Deletion von aktivierten T-Zellen durch die Fas/Fas-L Interaktion kann es jedoch auch kommen, wenn eine Immunantwort beendet werden soll. Dies nennt man „activation induced cell death“ (AICD) (52, 53).

Wie bereits im Abschnitt 1.1.2. erwähnt wurde, gibt es mehrere T-Helfer-Antworten, welche von unterschiedlichen T-Zellen durchgeführt werden. Diese unterscheiden sich durch ihre Zytokin-Produktion. Th1-Zellen produzieren überwiegend  $\text{IFN-}\gamma$  und differenzieren unter Einwirkung von IL-12 aus naiven T-Zellen. Th2-Zellen produzieren die Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13. Th1 und Th2 Antworten schließen sich aufgrund der unterschiedlichen Zytokine gegenseitig aus und hemmen sich gegenseitig. Diesen Mechanismus bezeichnet man als Immundeviation.

Ein weiterer Mechanismus der peripheren Toleranz ist die Regulation/Suppression. Dabei spielen regulatorische T-Zellen (Treg) und myeloische Suppressorzellen eine Rolle, welche Immunantworten unterdrücken können (54). Bei den Tregs kann man mehrere Subtypen unterscheiden. Zum einen gibt es die natürlich vorkommenden  $\text{CD4}^+\text{CD25}^+\text{FoxP3}^+$  Tregs, welche meist über Zellkontakt-abhängige Mechanismen wirken (55), zum anderen gibt es induzierbare Tregs, welche hauptsächlich über die Zytokine IL-10 (Tr1) (56) oder  $\text{TGF-}\beta$  ( $\text{T}_{\text{H}3}$ ) wirken (57, 58). Alle Tregs haben gemeinsam, dass sie zwar ein TZR-Signal benötigen, jedoch sind ihre hemmenden Eigenschaften antigen-unabhängig.

Bei den vielen Möglichkeiten um Toleranz zu erzeugen, kommt es oft zu einer Kombination von mehreren der hier erwähnten Mechanismen.

### **1.7. Autoimmunität**

Autoimmunreaktionen kommen zustande, wenn trotz der zahlreichen Toleranzmechanismen autoreaktive Zellen entstehen, welche körpereigene Antigene als „fremd“ erkennen und somit eine Immunantwort gegen diese Antigene bewirken.

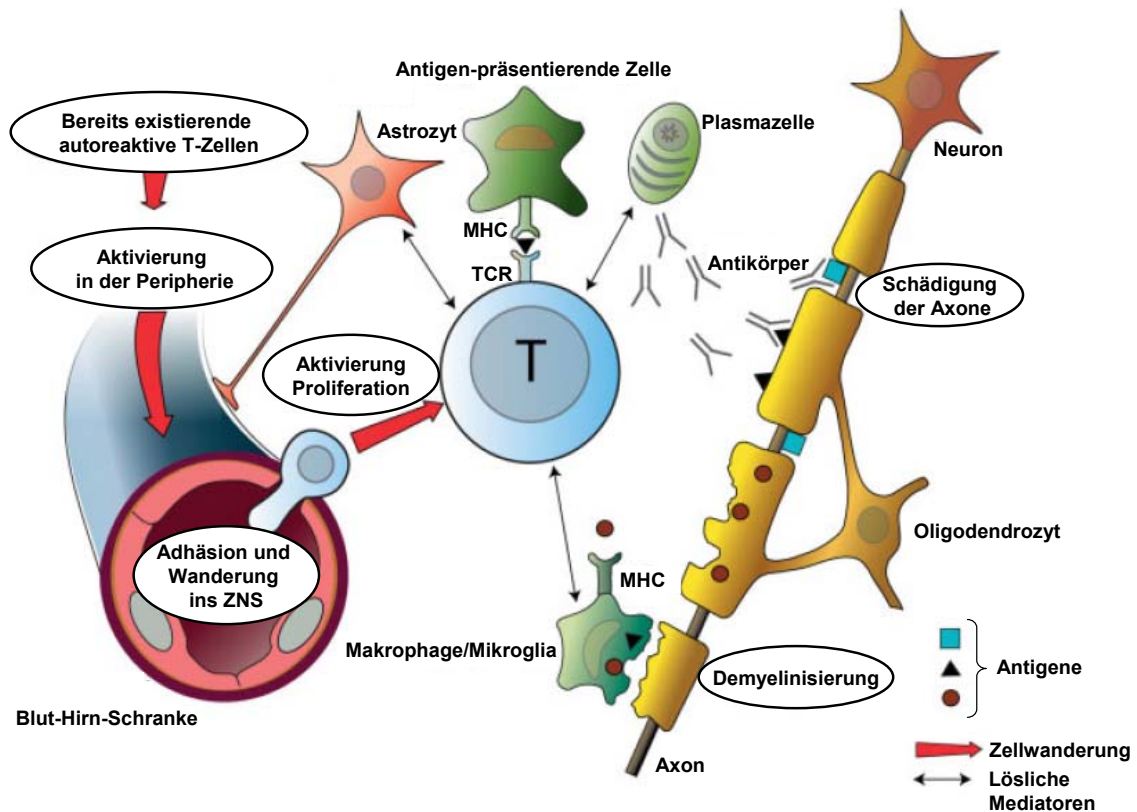
Dies hat Autoimmunerkrankungen zur Folge, in deren Verlauf körpereigene Zellen vom Immunsystem attackiert werden.

### **1.7.1. Multiple Sklerose und Experimentelle Autoimmun-Enzephalomyelitis**

Ein Beispiel für eine Autoimmunerkrankung ist Multiple Sklerose (MS). Es handelt sich dabei um eine Krankheit des zentralen Nervensystems (ZNS), bei der autoreaktive Zellen die Myelinscheide der Nervenzellen zerstören. In Nord-Europa und Nord-Amerika ist die Wahrscheinlichkeit an MS zu erkranken 1 zu 1000, weltweit sind 1,5 bis 2 Millionen Menschen betroffen und dabei tritt die Krankheit zwei- bis dreimal häufiger bei Frauen auf (59).

Man geht davon aus, dass unter anderem erbliche Faktoren für die Entstehung von MS verantwortlich sind, da Studien gezeigt haben, dass es einen Zusammenhang zwischen MS und bestimmten MHC-Genen gibt (60, 61). MS wird dadurch ausgelöst, dass autoreaktive T-Zellen aktiviert werden und die Blut-Hirn-Schranke (BHS) passieren. Die BHS bildet bei gesunden Menschen eine Barriere zwischen dem Blutkreislauf und dem ZNS. Sie wird hauptsächlich aus Endothelzellen und „Tight junctions“ gebildet und ist selektiv durchlässig für Ionen, Moleküle und Zellen (62). Infektionen, zum Beispiel mit HIV, können zu einer Schädigung der BHS führen (63). Ist die BHS geschädigt, können autoreaktive Zellen ins ZNS gelangen und dort Schaden verursachen. Bei der Entstehung von MS werden autoreaktive T-Zellen zunächst in der Peripherie aktiviert. Wenn die Zellen ins ZNS gelangt sind, können sie dort ihr Antigen erkennen und werden erneut aktiviert. Daraufhin produzieren sie Zytokine, welche wiederum Mikroglia aktivieren und weitere inflammatorische Zellen anlocken. Außerdem werden die Plasmazellen zur Produktion von autoreaktiven Antikörpern angeregt. Die aktivierten Makrophagen/Mikroglia und Myelin-spezifische Antikörper bewirken die Zerstörung der Myelinscheide und somit die Schädigung der Axone (59, 64) (Abb. 3).





**Abbildung 3: Übersicht der Entstehung von MS**

Modifiziert nach Hohlfeld (59), Multiple sclerosis: human model for EAE?, European Journal of Immunology, 2009, 39:2036-2039, copyright Wiley-VCH Verlag GmbH & Co KGaA, gedruckt mit Erlaubnis, Erklärung siehe Text

Zunächst ging man davon aus, dass  $\text{IFN-}\gamma$ -produzierende  $\text{CD4}^+$  T-Zellen (Th1-Zellen) die Krankheit auslösen. Mittlerweile weiß man jedoch, dass die kürzlich entdeckten IL-17-produzierenden Th17 Zellen ebenfalls an der Pathogenese von MS beteiligt sind (65). Th17 Zellen vermitteln zum einen die Immunabwehr gegen zahlreiche Erreger, zum anderen sind sie auch bei der Entwicklung von Autoimmunerkrankungen beteiligt. Wichtige Regulatoren der Th17-Differenzierung sind der Transkriptionsfaktor  $\text{ROR}\gamma\text{t}$  (66) und die Zytokine  $\text{TGF-}\beta$ , IL-6, IL-21, IL-23 (67). In MS Patienten konnte eine verstärkte IL-23-Produktion durch DZ nachgewiesen werden, was eine mögliche Erklärung für die Expansion von Th17 Zellen in MS-Patienten liefert (68). Zusätzlich zu den  $\text{CD4}^+$  T-Zellen konnten in den Läsionen von MS-Patienten auch  $\text{CD8}^+$  T-Zellen gefunden werden (69, 70). B-Zellen sind ebenfalls an der Schädigung der Axone beteiligt, indem sie Auto-Antikörper produzieren (71). Die Behandlung mit dem monoklonalen Antikörper Rituximab, welcher an CD20 bindet und dadurch B-Zellen depletiert, bewirkt eine Verbesserung der Krankheitssymptome (72). Es gibt drei Arten von Läsionen bei MS-Patienten. In

der einen dominieren T-Zellen und Makrophagen, in der anderen kommen hauptsächlich Antikörper und Teile des Komplementsystems vor und in der dritten sind Sauerstoff- und Stickstoffoxid-Radikale vorhanden (73).

Ein Maus-Modell zur Erforschung von MS ist die Experimentelle Autoimmun-Enzephalomyelitis (EAE). Dabei gibt es zum einen die passive und zum anderen die aktive EAE. Die passive EAE wird durch die Injektion von *in vitro* aktivierten enzephalitogenen T-Zellen ausgelöst. Die aktive EAE wird durch Injektion von Myelin-Antigenen, zum Beispiel Myelin Basisches Protein (MBP) oder Myelin Oligodendrozyten-Glykoprotein (MOG), induziert. Das Peptid wird dabei mit Kompletten Freudschen Adjuvant gemischt, welches inaktivierte Mykobakterien enthält. Durch die Mykobakterien werden DZ und Makrophagen aktiviert, welche durch die Produktion von IL-12 eine Th1- und Th17-Reaktion auslösen (74). Zur Verstärkung der Reaktion wird Pertussis-Toxin injiziert, da es die Permeabilität der BHS erhöht (75). Die EAE zeigt viele Gemeinsamkeiten mit MS, unter anderem die Zerstörung der Myelinscheide, die Läsionen in Gehirn und Rückenmark und die Antikörper in ZNS und Zerebrospinalflüssigkeit (76). Sie ist ein gut untersuchtes Modell für eine menschliche Autoimmun-Erkrankung und aufgrund dieses experimentellen Systems wurden bereits therapeutische Ansätze für die Behandlung von MS entwickelt (77).

### **1.7.2. MS und Viruserkrankungen**

Zusätzlich zu dem genetischen Zusammenhang mit dem MHC-Lokus scheint es auch einen Zusammenhang zwischen MS und Viruserkrankungen zu geben (78-82). Dieser Zusammenhang kann mit der so genannten „Mimikry-Hypothese“ erklärt werden (83), welche besagt, dass Virusproteine, die körpereigenen Proteinen strukturell ähnlich sind, autoreaktive T-Zellen aktivieren können. Es gibt beispielsweise zahlreiche Studien, die darauf hindeuten, dass eine Infektion mit Epstein-Barr Virus (EBV) mit einem hohen MS-Risiko assoziiert ist (84-86). In MS-Patienten kann eine erhöhte Menge an Antikörpern gegen EBV im Blut und der Zerebrospinalflüssigkeit nachgewiesen werden (87-90). Außerdem zeigen Patienten verstärkte T-Zell-Antworten gegen EBV-Antigene (87, 91, 92). In Blut und Zerebrospinalflüssigkeit von MS-Patienten können auch erhöhte Mengen an Masern-Antikörpern festgestellt werden (78). Es gibt auch einen Zusammenhang zwischen

Masern-Infektionen und anderen neurodegenerativen Krankheiten. Bei Kindern, die im Alter von weniger als 2 Jahren eine Masern-Infektion erlitten haben, ist das Risiko an der neurodegenerativen Erkrankung subakute sklerosierende Panenzephalitis (SSPE) zu erkranken 1 zu 10.000 (93).

### **1.7.3. Lipid-Antigene bei der Multiplen Sklerose**

Die Myelinscheide der Nervenzellen, welche bei der MS-Erkrankung von autoreaktiven Zellen attackiert wird, besteht zu 70% aus Lipiden (94). Es gibt zahlreiche Arbeiten, die darauf hindeuten, dass es während der MS zu T-Zell-Antworten oder Antikörper-Reaktionen gegen diese Lipide kommt (95-97). Es wurden T-Zellen aus MS-Patienten isoliert, welche reaktiv für Glykolipide waren und diese kamen bei MS-Patienten in größerer Menge vor als bei gesunden Menschen (98). Untersuchungen der Zerebrospinalflüssigkeit von MS-Patienten haben ergeben, dass darin Antikörper gegen Myelin-Lipide wie Sulfatid, Sphingomyelin, asialo-GM1, GM1 und 3 $\beta$ -hydroxy-5 $\alpha$ -cholestan-15-one (eine oxidierte Form von Cholesterol) vorhanden waren (94). Im Serum von EAE-Mäusen wurden ebenfalls Lipid-spezifische Antikörper gegen Sulfatid, asialo-GM1 und Cerebrosid gefunden. Außerdem führte die Zugabe von Sulfatid in das EAE-Adjuvant zu einer Verschlechterung der EAE-Symptome. Dasselbe war der Fall, wenn den Mäusen Sulfatid-spezifische Antikörper verabreicht wurden. Es gibt jedoch auch gegensätzliche Daten, die zeigen, dass durch die intraperitoneale Injektion von Sulfatid die EAE verhindert werden kann, indem nicht-invariante NKT-Zellen stimuliert werden (99). Möglicherweise hängt die Immunmodulation, die durch das Lipid ausgelöst wird, von der Injektionsstelle ab.

### **1.7.4. EAE-Protektion durch Injektion Dendritischer Zellen**

Mäuse können durch Injektion von DZ, welche mit dem MOG-Peptid beladen wurden, vor EAE geschützt werden. Dabei spielt der Reifezustand der DZ eine Rolle. Semireife DZ, welche mit TNF stimuliert wurden, sind in der Lage die EAE zu verhindern. Unreife oder vollständig mit LPS und CD40 gereifte DZ können dies jedoch nicht. Bereits eine TNF-DZ-Injektion bewirkt eine Verbesserung der EAE-Symptome und drei Injektionen führten zur vollständigen Protektion der Tiere (100).

Die DZ schützen peptid-spezifisch vor der EAE, da unbeladene DZ oder DZ, welche mit Ovalbumin (OVA)-Peptid beladen wurden, keinen Einfluss auf den EAE-Verlauf haben. Dabei ist es wichtig, dass die DZ-Injektion intravenös erfolgt, da die Zellen nur in diesem Fall tolerogen wirken. Durch subkutane Injektion werden die DZ immunogen und können nicht mehr vor EAE schützen (45).

Nach der Injektion von TNF-DZ konnte im Überstand von Milz-Zellen, die mit MOG-Peptid restimuliert wurden, überwiegend IL-10 festgestellt werden. Dagegen wurde nach Injektion der LPS/CD40-DZ hauptsächlich IFN- $\gamma$  produziert. Nach Sortierung der Milz-Zellen in CD4<sup>+</sup> und CD11c<sup>+</sup> Zellen wurde festgestellt, dass das IL-10 von den CD4<sup>+</sup> T-Zellen hergestellt wurde. Somit werden durch die intravenöse Injektion von TNF-gereiften und MOG-beladenen DZ peptid-spezifische CD4<sup>+</sup> T-Zellen aktiviert, welche IL-10 produzieren. Die Protektion vor der EAE hängt jedoch nur teilweise von IL-10 ab, da ein anti-IL-10 Antikörper den protektiven Effekt der DZ nur teilweise aufheben konnte (100).

Einen weiteren Beitrag zur EAE-Protektion liefern die Th2-Zytokine IL-13 und IL-4, welche von CD4<sup>+</sup> T-Zellen und NKT-Zellen produziert werden (101). Es konnte gezeigt werden, dass CD1d<sup>-/-</sup> Mäuse, welche weder Typ I noch Typ II NKT-Zellen besitzen, nicht durch Injektion von TNF-DZ vor der EAE geschützt werden konnten. Dasselbe war der Fall bei J $\alpha$ 281<sup>-/-</sup> Mäusen, welche keine Typ I NKT-Zellen bilden. Wenn diesen J $\alpha$ 281<sup>-/-</sup> Mäusen jedoch Typ I NKT-Zellen injiziert wurden, konnte die EAE wieder durch die DZ verhindert werden, was zeigt, dass diese dabei eine Rolle spielen. Der EAE-Verlauf in TNF-DZ-injizierten CD1d<sup>-/-</sup> Mäusen war stärker als bei J $\alpha$ 281<sup>-/-</sup> Mäusen, was darauf hindeutet, dass Typ II NKT-Zellen ebenfalls nötig für die Protektion sind (101).

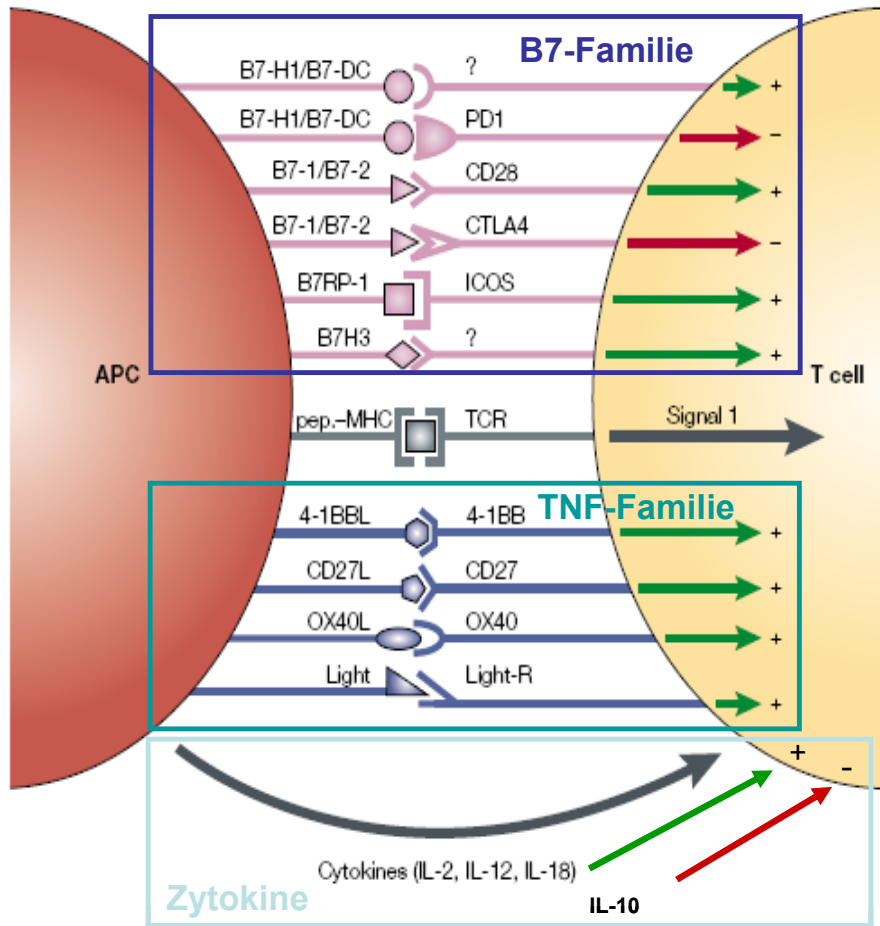
Es ist wichtig, dass die DZ CD1d auf ihrer Oberfläche tragen, damit sie NKT-Zellen stimulieren können. CD1d-defiziente DZ können die EAE nicht verhindern. Die Injektion der TNF-DZ induziert die Zytokine IL-4 und IL-13, welche bereits zwei Stunden nach der 3. Injektion im Serum nachweisbar sind. Die Tatsache, dass diese Zytokine nicht von CD1d-defizienten DZ induziert werden können deutet darauf hin, dass diese von NKT-Zellen produziert werden. Es konnten jedoch in der Milz auch CD4<sup>+</sup> T-Zellen nachgewiesen werden, welche nach der DZ-Injektion IL-4 und IL-13 produzierten. Die IL-4 und IL-13 produzierenden T-Zellen waren bei Injektion von TNF-DZ in J $\alpha$ 281<sup>-/-</sup> Mäuse reduziert. Dies deutet darauf hin, dass die NKT-Zellen wichtig sind um die Zytokin-Produktion der T-Zellen zu bewirken. In IL-4R $\alpha$ <sup>-/-</sup> Mäusen,

welche nicht auf IL-4 und IL-13 reagieren können (102), konnte keine vollständige EAE-Protektion erreicht werden (101). Die von T- und NKT-Zellen gebildeten Th2-Zytokine IL-4 und IL-13 sind außerdem wichtig für die Induktion von CD4<sup>+</sup> IL-10 produzierenden T-Zellen, da in IL-4R $\alpha$ <sup>-/-</sup> Tieren nach der TNF-DZ-Injektion kein protektives IL-10 gebildet wurde (101).

MHC II<sup>-/-</sup> DZ konnten die EAE ebenfalls nicht verhindern. Außerdem konnten nach MHC II<sup>-/-</sup> DZ-Injektion im Serum keine NKT-Zell-Zytokine und in der Milz kein IL-10 nachgewiesen werden. Dies zeigt, dass die Stimulation der NKT-Zellen über CD1d alleine nicht ausreichend ist, da ohne die Stimulation von T-Zellen durch MHC keine NKT-Zell- und T-Zell-Zytokine produziert werden und somit keine EAE-Protektion möglich ist. Die semireife DZ muss also über das MHC-Molekül in Verbindung mit dem MOG-Peptid mit der T-Zelle und über das CD1d-Molekül in Verbindung mit einem Lipid-Antigen mit der NKT-Zelle interagieren, um diese Zellen zu aktivieren und dadurch eine vollständige EAE-Protektion zu erreichen. Dabei ist es wichtig, dass ein und dieselbe DZ mit T- und NKT-Zellen in Kontakt tritt, da eine Mischung aus MHC II<sup>-/-</sup> DZ und CD1d<sup>-/-</sup> DZ, wo die Signale an T- und NKT-Zellen von zwei verschiedenen DZ kommen, nicht zur Protektion fähig war (101). Die von CD4<sup>+</sup> T-Zellen und NKT-Zellen produzierten Tr1 (IL-10) und Th2 (IL-4 und IL-13) Zytokine bewirken eine Blockade der EAE, welche über Th1 und Th17 Zellen vermittelt wird.

### **1.8. Kostimulation und Koinhibition**

Für effiziente T-Zell Aktivierung und Generierung von Effektorzellen sind zwei Signale nötig. Zum einen das T-Zell-Rezeptor-Signal, welches dadurch zustande kommt, dass der TZR einen Peptid-MHC-Komplex auf der APZ erkennt. Zum anderen sind kostimulatorische Signale zwischen Oberflächenmolekülen der APZ und der T-Zelle nötig (49). Es gibt zahlreiche solcher Signal-Moleküle auf APZ und T-Zellen (Abb. 4). Diese können in die B7-Familie, die TNF-Familie und die Zytokine unterteilt werden. Abbildung 4 zeigt eine Übersicht über die verschiedenen Moleküle, die teilweise stimulierende und teilweise inhibitorische Signale an die T-Zelle vermitteln können. Die Zytokine beeinflussen ebenfalls die T-Zell-Differenzierung und entscheiden über die Polarisierung der T-Zell-Antwort.



**Abbildung 4: Kostimulatorische und koinhibitorische Oberflächenmoleküle**

Modifiziert nach Pardoll (49), gedruckt mit Erlaubnis von Macmillan Publishers: Nature Reviews 2:227-238, copyright 2002

Die kostimulatorischen und koinhibitorischen Moleküle lassen sie sich in die B7-Familie, die TNF-Familie und die Zytokine unterteilen. B7-1 und B7-2 können an das stimulatorische Molekül CD28 oder auch an das inhibitorische Molekül CTLA-4 binden. B7-H1 und B7-DC haben sowohl stimulatorische als auch inhibitorische Eigenschaften auf die T-Zelle. Das inhibitorische Signal wird vermutlich über PD-1 vermittelt. Der stimulatorische Ligand für B7-H1 und B7-DC auf den T-Zellen ist noch unbekannt. Mehrere Mitglieder der TNF-Familie, welche von der APZ exprimiert werden, liefern kostimulatorische Signale für T-Zellen indem sie an den entsprechenden Liganden der TNF-Rezeptor-Familie auf der T-Zelle binden. Zytokine entscheiden über die Polarisierung der Immunantwort, indem sie die Differenzierung der T-Zellen beeinflussen.

### 1.8.1. B7-H1

B7-H1 (PD-L1, CD274) gehört zur B7-CD28 Familie der kostimulatorischen Moleküle und es ist auf vielen Zell-Typen exprimiert, darunter T-Zellen, B-Zellen, Monozyten, DZ und nicht-hämatopoetische Zellen (103, 104). Ein Interaktionspartner von B7-H1 ist „programmed cell death-1“ (PD-1). Dieser ist exprimiert auf aktivierten CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen, B-Zellen, NKT-Zellen und auf Monozyten (105-107). Außerdem interagiert B7-H1 mit CD80 (B7-1) und möglicherweise mit weiteren bisher unbekanntem Molekülen auf T-Zellen (108-110).

Es gibt gegensätzliche Befunde für die Funktion der B7-H1/PD-1 Interaktion. Zum einen gibt es Studien, die zeigen, dass die Interaktion zwischen B7-H1 und PD-1 zur Aktivierung und Proliferation von T-Zellen beiträgt (111). Zum anderen gibt es Belege dafür, dass sich die B7-H1/PD-1 Interaktion hemmend auf die Proliferation und Zytokin-Produktion von T-Zellen auswirkt (104, 108).

Die Tatsache, dass B7-H1 auf vielen Geweben exprimiert ist, deutet darauf hin, dass es an der Regulation von selbst-reaktiven T- und B-Zellen und somit an der Einschränkung von Autoimmunerkrankungen beteiligt ist. Außerdem ist es wichtig für die Regulation von Entzündungsreaktionen und für die Einschränkung von Immunfunktionen in der Peripherie (112-115).

Im EAE-Modell wurde der Effekt von B7-H1 bereits ausführlich untersucht. B7-H1<sup>-/-</sup> Mäuse zeigen eine stärkere EAE als WT-Mäuse, die Krankheit beginnt bei diesen Tieren früher und die Symptome sind heftiger (116). Außerdem bewirkt eine Blockade von B7-H1 oder PD-1 mithilfe von Antikörpern eine erhöhte Empfänglichkeit für EAE und einen stärkeren Verlauf (117, 118).

### **2. Fragestellung**

Aus Vorarbeiten in der Arbeitsgruppe war bekannt, dass tolerogene, TNF-gereifte DZ die EAE-Entwicklung in Mäusen verhindern können, wenn diese vor der EAE-Induktion intravenös verabreicht werden. In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob das koinhibitorische Molekül B7-H1 auf der Oberfläche der DZ einen Einfluss auf das tolerogene Potential der DZ und somit auf die EAE-Protektion hat. Es sollte überprüft werden, ob DZ aus B7-H1 defizienten Mäusen ebenso fähig sind, die EAE zu verhindern, wie WT DZ.

Es war ebenfalls bereits bekannt, dass die tolerogenen DZ T- und NKT-Zellen aktivieren, welche zur Protektion beitragen. In dieser Arbeit sollte die Frage geklärt werden, ob MZ B-Zellen ebenfalls wichtig sind. Dazu sollte untersucht werden, ob CD22<sup>-/-</sup> Mäuse, welche eine Reduktion in der MZ B-Zell-Population haben, vor der EAE geschützt werden können.

Des Weiteren sollte analysiert werden, welchen Einfluss ZNS-Lipid-Antigene auf DZ haben, da vermutet wird, dass diese wichtige Antigene bei der Entstehung der Multiplen Sklerose darstellen.

Nachdem es bereits zahlreiche Hinweise für einen Zusammenhang zwischen Virus-Infektionen und Erkrankungen wie Multiple Sklerose gibt, sollte untersucht werden, ob eine Masern-Infektion einen Einfluss auf den Verlauf einer EAE-Erkrankung hat. Dazu sollte ein Maus-Modell für eine persistierende Masern-Infektion verwendet und herausgefunden werden, ob diese Infektion einen Unterschied des EAE-Verlaufes bewirkt.



### **3. Material und Methoden**

#### **3.1. Medien, Puffer und Lösungen**

##### HL-1 Medium (komplett)

500ml	HL-1-Medium (Lonza)
100U/ml	Penicillin (PAA)
100µg/ml	Streptomycin (PAA)
2mM	L-Glutamin (PAA)
50µM	β-Mercaptoethanol (Sigma)

##### Zellkulturmedium (R10-Medium) für Dendritische Zellen

500ml	RPMI1640 (PAA)
50ml	sterilfiltriertes, hitzeinaktiviertes fötales Kälberserum (FKS)
100U/ml	Penicillin
100µg/ml	Streptomycin
2mM	L-Glutamin
50µM	β-Mercaptoethanol

##### Zellkulturmedium für Hybridome

500ml	RPMI1640 mit L-Glutamin (Gibco)
25ml	sterilfiltriertes, hitzeinaktiviertes fötales Kälberserum (FKS)
100U/ml	Penicillin/Streptomycin
0,1mM	nicht-essentielle Aminosäuren
1mM	Natrium-Pyruvat
5µM	β-Mercaptoethanol

##### Einfriermedium

45ml	sterilfiltriertes, hitzeinaktiviertes FKS (PAA)
5ml	DMSO (Sigma)

##### PBS

Dulbecco's PBS (1x) ohne Magnesium und Calcium (PAA)

FACS- Puffer

0,5g	BSA
5ml	10%ige Natriumazid-Lösung
500ml	PBS

1,6% Ammoniumchlorid

8 ml	10%ige Ammoniumchlorid-Lösung (Applichem)
42 ml	steriles Wasser

2% ige Formaldehyd-Lösung

5,4ml	37%ige Formaldehyd-Lösung (Roth)
96,6ml	PBS

4%ige Paraformaldehyd-Lösung

4g	Paraformaldehyd (Fluka)
100ml	PBS

NaOH zugeben bis das Pulver gelöst ist, pH auf 7 einstellen

2% BSA-Lösung

2g	BSA (Sigma)
100ml	PBS

0,1 M Glycin-Lösung

0,375g	Glycin (Applichem)
50ml	steriles Wasser

**3.2. Spezielle Reagenzien**

**3.2.1. Stimulantien und Zytokine**

murines TNF- $\alpha$

PeproTech, verwendete Konzentration: 500U/ml

LPS (von E.coli 0127:B8)

Sigma, verwendete Konzentration: 1 $\mu$ g/ml

### 3.2.2. Peptide

#### MOG<sub>35-55</sub>

MOG<sub>35-55</sub> Peptid (EVGWYRSPFSRVVHLYRNGK) wurde synthetisiert und HPLC aufgereinigt von R. Volkmer, Charite, Berlin

### 3.2.3. Lipide

Sulfatid (Avanti Polar Lipids)

Sphingomyelin (Avanti Polar Lipids)

Ceramid (Avanti Polar Lipids)

Cerebrosid (Avanti Polar Lipids)

Gangliosid (Avanti Polar Lipids)

GM1-Gangliosid (Avanti Polar Lipids)

α-GalCer (Alexis Biochemicals)

### 3.2.4. Fluoreszierende Partikel

Fluoresbrite PolyFluor 407 Microspheres (Polysciences)

Fluoresbrite YG Microspheres 1µm (Polysciences)

### 3.3. Antikörper

anti-B7-H1-PE (BD Pharmingen), Verdünnung für FACS: 1:100

anti-CD80-FITC (BD Pharmingen), Verdünnung für FACS: 1:100

anti-CD86-FITC (BD Pharmingen), Verdünnung für FACS: 1:100

anti-CD40-PE (BD Pharmingen), Verdünnung für FACS: 1:100

anti-MHC II-PE (BD Pharmingen), Verdünnung für FACS: 1:250

anti-CD3-FITC (BD Pharmingen), Verdünnung für FACS: 1:400

anti-NK1.1-PerCP-Cy5.5 (BD Pharmingen), Verdünnung für FACS: 1:100

anti-B7-DC-PE (eBioscience), Verdünnung für FACS: 1:100

anti-PD-1-PE (eBioscience), Verdünnung für FACS: 1:100

anti-CD169 unkonjugiert (AbD Serotec), Verdünnung für Histologie: 1:300

anti-Ratte-Alexa555 (Molecular Probes/Invitrogen), Verdünnung für Histologie:  
1:1000

### **3.4. Mausstämme**

C57BL/6 und BALB/c Tiere wurden von Charles River oder Harlan bezogen. Die verwendeten transgenen Tiere stammen aus der Eigenzucht im Institut für Virologie (CD1d<sup>-/-</sup>, Jα281<sup>-/-</sup> und CD22<sup>-/-</sup>) bzw. aus der Neurologischen Klinik (B7-H1<sup>-/-</sup>, 2D2).

Die zum Zwecke immunologischer Untersuchungen am Tier vorgenommenen Immunisierungen und Organentnahmen wurden durch die Regierung von Unterfranken genehmigt.

### **3.5. Zellkulturmethoden**

#### **3.5.1. Kultur von Zellen**

Die Arbeiten mit Zellkulturen wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die verwendeten Zellen wurden bei 5% CO<sub>2</sub> und 37°C kultiviert. Um die Zellen zu ernten, erfolgte eine Zentrifugation bei 1200 rpm für 5 Minuten.

#### **3.5.2. Einfrieren und Auftauen von Zellen**

Zum Einfrieren der Zellen wurden diese in eiskaltem Einfriermedium aufgenommen, langsam auf -80°C abgekühlt und nach etwa 24 Stunden weiter auf -140°C abgekühlt. Zum Auftauen wurden die Zellen in einem auf 37°C vorgewärmtem Wasserbad zügig aufgetaut, in Kulturmedium überführt, zentrifugiert und in frischem Medium aufgenommen.

### **3.5.3. Zellzählung und Vitalitätstest**

Um die genaue Zellzahl zu bestimmen, wurden die Zellen mit Trypanblau-Lösung verdünnt. Dieser Farbstoff färbt tote Zellen an, und somit können die lebenden weißen Zellen von den toten blauen Zellen unterschieden werden. Die lebenden Zellen wurden mithilfe einer Neubauerzählkammer unter dem Lichtmikroskop ausgezählt. Es wurden 4 mal 16 Quadranten ausgezählt und durch 4 geteilt. Die Zellzahl errechnet sich mit folgender Formel:

Durchschnittliche Zellzahl x Verdünnungsfaktor x  $10^4$  = Zellen/ml

### **3.5.4. Gewinnung von murinem GM-CSF**

Um GM-CSF angereicherten Kulturüberstand zu erhalten, wurde eine mit dem GM-CSF Gen transfizierte Plasmazytom-X63-Ag8-Zelllinie verwendet. Diese wurde von Dr. B. Stockinger zur Verfügung gestellt (119). Die Zellen wurden mit  $3 \times 10^5$  Zellen pro mittlere Flasche in R10-Medium ausgesät und für 7 Tage kultiviert. Im Anschluss wurden die Zellen zentrifugiert und der Überstand wurde abgenommen und filtriert.

### **3.5.5. Färbung von Zellen mit CFSE**

Je  $2 \times 10^7$  Zellen wurden in 1ml PBS aufgenommen. Das CFSE (Molecular Probes/Invitrogen) wurde gemäß den Herstellerangaben in DMSO gelöst und im Verhältnis 1:1 mit PBS verdünnt. Anschließend wurde durch eine 1:1 Verdünnung mit der Zellsuspension eine finale CFSE-Konzentration von 2,5  $\mu$ M erreicht. Die Zellen wurden mit dem Farbstoff für 15 Minuten im Dunkeln und bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen.

### **3.5.6. Knochenmark-Präparation**

Femur und Tibia der Hinterläufe von Mäusen wurden entnommen. Am Knochen anliegendes Gewebe wurde mithilfe von Papiertüchern entfernt. Im Anschluss wurden die gesäuberten Knochen mit 70% Ethanol desinfiziert, um eine Kontamination der Knochenmarkskultur durch Gewebszellen zu vermeiden.

Anschließend wurden die Knochen in PBS gewaschen, an beiden Enden mit einer sterilen Schere geöffnet und das Knochenmark mit einer PBS-gefüllten Spritze herausgespült. Nach Zentrifugation der Zellen wurden sie in R10-Medium aufgenommen, gezählt und mit  $3 \times 10^6$  Zellen pro Kulturschale ausgesät.

### **3.5.7. Generierung von Dendritischen Zellen**

Die Gewinnung von DZ aus murinem Knochenmark erfolgte nach der von Lutz und Mitarbeitern beschriebenen Methode (120). Die Zellen wurden, wie unter 3.5.6. beschrieben, isoliert und in 10ml R10-Medium pro Schale ausgesät. Um aus den Knochenmarksvorläuferzellen DZ zu generieren, wurde das Kulturmedium zusätzlich mit 10% GM-CSF Kulturüberstand versetzt. Nach 3 Tagen wurden erneut 10ml R10 Medium mit 10% GM-CSF Überstand zugegeben. Nach 6 und 8 Tagen wurden jeweils 10ml der Kultur entfernt und durch 10ml frisches Medium inklusive GM-CSF Überstand ersetzt. Die Zellen wurden je nach Experiment zwischen Tag 6 und 10 verwendet.

### **3.5.8. Präparation von Milz-Zellen**

Die Milz wurde entnommen und mithilfe des Stempels einer Spritze durch ein Zellsieb gedrückt. Das Sieb wurde anschließend mit PBS gespült. Die Zellen wurden zentrifugiert, in R10-Medium aufgenommen und zur Erythrozytenlyse 1:1 mit 1,66% Ammoniumchlorid verdünnt. Die Lyse erfolgte für 5 Minuten bei 37°C. Im Anschluss wurden die Zellen mit Medium aufgefüllt, zentrifugiert und in frischem Medium aufgenommen.

## **3.6. Immunologische Methoden**

### **3.6.1. Fluoreszenzaktivierte Durchflusszytometrie (FACS)**

Um die Oberflächenmarker von Zellen zu untersuchen, wurden sie mit den unter 3.3. erwähnten fluoreszierenden Antikörpern gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Die Zellen (bis zu  $1 \times 10^6$  pro Ansatz) wurden für 30 Minuten im Dunkeln auf Eis mit 50µl Antikörper-Verdünnung (in FACS-Puffer) inkubiert und anschließend

mit FACS-Puffer aufgefüllt und zentrifugiert. Um die Färbung zu fixieren, wurden sie für 15 Minuten in 2% Formaldehyd inkubiert und anschließend 1:1 mit FACS-Puffer verdünnt und bis zur Messung im Kühlschrank aufbewahrt. Die Fluoreszenz der Proben wurden mithilfe eines Durchflusszytometers (Becton Dickinson, FACS Calibur) analysiert und die Daten mittels FlowJo-Software 7.2.4 (Tree Star, Inc.) ausgewertet.

### **3.6.2. Proliferationsmessung**

#### **3.6.2.1. CFSE-Verdünnung**

Um zu untersuchen, ob Zellen sich teilen, können diese, wie unter 3.5.5. beschrieben, mit CFSE angefärbt werden. Infolge der Zellteilung wird der Farbstoff verdünnt. Die Abschwächung der CFSE-Fluoreszenz kann mittels Durchflusszytometrie analysiert werden.

#### **3.6.2.2. [<sup>3</sup>H]-Thymidin-Einbau**

Die Proliferation kann auch über den Einbau von radioaktiv markiertem [<sup>3</sup>H]-Thymidin in die DNA der sich teilenden Zellen gemessen werden. Die zu analysierenden Zellen wurden zunächst 72 Stunden inkubiert und anschließend wurde 1µCi Methyl- [<sup>3</sup>H] Thymidin zu der Zellsuspension gegeben und die Zellen wurden für weitere 18h inkubiert. Der Kulturüberstand wurde mithilfe eines Harvesters (Tomtec) auf einen Filter (Perkin Elmer, Filtermat A) übertragen. Dieser wurde in eine Plastik-Tasche (Perkin Elmer, Sample Bag) eingeschweißt und eine Szintillationsflüssigkeit wurde zugegeben. Die auf dem Filter enthaltene Radioaktivität (cpm) konnte nun mithilfe eines Messgerätes (Perkin Elmer, 1450 Microbeta) ausgelesen werden.

#### **3.6.3. “Enzyme-linked-immunoabsorbent-assay” (ELISA)**

Zell-Kulturüberstände bzw. Seren von Mäusen wurden mittels ELISA auf ihren Zytokin-Gehalt getestet. Es wurden Kits für IL-13, IL-17 (eBioscience), IL-10, IL-4, IFN- $\gamma$  (BD Pharmingen) verwendet und entsprechend der Anleitung des Herstellers durchgeführt.

### **3.6.4. „Mixed lymphocyte reaction“(MLR)**

DZ von BALB/c Mäusen wurden, wie unter 3.5.7 beschrieben, generiert und von Tag 8 auf Tag 9 mit den Lipiden gereift. Anschließend wurden sie zusammen mit Milzzellen einer C57BL/6 Maus kultiviert, welche wie unter Punkt 3.5.8 beschrieben, isoliert wurden. Nach 72 Stunden wurde 1µCi Methyl-[<sup>3</sup>H]-Thymidin zugegeben und die Proliferation, wie unter 3.6.2.2 beschrieben, analysiert.

### **3.6.5. Restimulation von Milz-Zellen**

Die Milz-Zellen wurden, wie unter 3.5.8. beschrieben, präpariert. Die Restimulation erfolgte in Serum-freiem HL-1 Medium. Es wurden  $4 \times 10^5$  Milz-Zellen unter Zugabe von verschiedenen Mengen MOG<sub>35-55</sub> (0–20 µg/ml) für 4 Tage in einer 96 well Platte kultiviert. Im Anschluss wurde der Überstand mittels ELISA auf dessen Zytokin-Gehalt untersucht.

### **3.6.6. Ko-Kultur von DZ mit NKT-Zell Hybridomen**

Folgende Hybridome wurden verwendet: KT12 (121), VIII24 (29), XV19 (29) und BW58 r/m CD28 (122). Für die Ko-Kultur Experimente wurden die DZ aus WT und B7-H1<sup>-/-</sup> Mäusen für 16 Stunden mit TNF gereift.  $5 \times 10^4$  Zellen der Hybridome KT12, BW58 r/m CD28 oder VIII24 oder  $1 \times 10^4$  Zellen des Hybridoms XV19 wurden in einer 96 well Platte mit Rundboden für 24 Stunden mit den DZ kultiviert. Um zu überprüfen, ob die Zellen überhaupt reagieren, wurde 10ng/ml α-GalCer zugegeben. Der Überstand wurde mittels ELISA auf IL-2 getestet.

## **3.7. Histologische Methoden**

### **3.7.1. Herstellung von Gefrierschnitten**

Die Milzen von DZ-injizierten Mäusen wurden entnommen und umgehend in einem 1,5 ml Plastikreaktionsgefäß in Tissue-Tek eingebettet und mit flüssigem Stickstoff eingefroren. Die gefrorenen Organe wurden an einem Cryostat (Leica) in 10µm dicke



Scheiben geschnitten und auf SuperFrost Plus Objektträgern aufgenommen und bei -20° C gelagert.

### 3.7.2. Färbung von Gefrierschnitten

Die Gefrierschnitte wurden bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer aufgetaut und für 15 Minuten mit 4% Paraformaldehyd fixiert. Dann wurde für 15 Minuten eine Lösung aus 0,1M Glycin zum Blocken von ungebundenen Aldehydgruppen zugegeben. Anschließend wurden die Schnitte mit einer 2%-igen BSA-Lösung blockiert. Nach diesem Schritt wurde der erste Antikörper für 30 Minuten zugegeben. Im Anschluss wurde der Sekundärantikörper zugegeben. Zwischen den einzelnen Schritten wurden die Schnitte dreimal mit PBS gewaschen. Nach der Färbung wurde das Gewebe mit Fluoromount-Medium (Serva Electrophoresis GmbH) eingebettet und mithilfe eines konfokalen Fluoreszenz-Mikroskops analysiert.

## 3.8. Tierversuche

### 3.8.1. DZ-Injektion und EAE-Induktion

Bevor bei den Mäusen EAE induziert wurde, wurden den Tieren dreimal DZ intravenös injiziert. Dies geschah 7, 5 und 3 Tage vor der EAE-Induktion. Die DZ wurden zuvor geerntet, mit  $5 \times 10^6$  Zellen pro ml wieder in eine Platte ausgesät und mit 40µg/ml MOG-Peptid und 500 U/ml TNF- $\alpha$  für 4 Stunden gereift. Anschließend wurden zwischen  $2$  und  $3 \times 10^6$  Zellen pro Maus und Injektion injiziert.

Die aktive EAE wurde mit MOG<sub>35-55</sub> und CFA ausgelöst. Die Tiere erhielten eine Emulsion aus MOG<sub>35-55</sub> (200µg pro Maus) und CFA (Sigma-Aldrich), welches mit *Mycobacterium tuberculosis* H37RA (5mg/mL) (Difco) versetzt war. Zusätzlich bekamen sie am Tag der Immunisierung und 48 Stunden später 400ng Pertussis Toxin (Alexis Biochemicals). Die Emulsion wurde subkutan rechts und links der Wirbelsäule injiziert und das Pertussis Toxin wurde intraperitoneal verabreicht. Der Krankheitsverlauf der Tiere wurde beobachtet und entsprechend der Tabelle 1 ausgewertet.

<b>EAE- Score</b>	<b>Klinische Symptome</b>
0,5	Läuft normal, Schwanzspitze schleift am Boden
1	Läuft normal, ganzer Schwanz schleift am Boden
1,5	Zusätzlich etwas breitbeiniger Gang
2	Breitbeiniger Gang, Hinterteil tiefer als bei 1,5
2,5	Zusätzlich klappt beim Laufen öfter oder immer ein Hinterbein nach hinten weg, kann aber wieder nach vorn gebracht werden
3	Ein Bein konstant hinten, kann nicht mehr unter den Körper gebracht werden; oder beide Beine inkonstant hinten, können noch unter den Körper gezogen werden; oder seitliches Wegrutschen beider Beine, Gang im Spagat
3,5	Beide Hinterbeine fast völlig oder völlig gelähmt, können nicht mehr bis zur Spagatstellung vorgezogen werden
4	Zusätzlich Schwäche der Vorderbeine, Maus zieht sich nicht mehr gerade und zügig mit den Armen vorwärts, Aufstützen des Oberkörpers nur auf die Unterarme
4,5	Zusätzlich Atemnot, Maus liegt im Sterben
5	Maus gestorben oder aufgrund des schlechten Zustandes getötet

**Tabelle 1: Definition des klinischen EAE-Scores**

### **3.8.2. Masern-Infektion und EAE-Induktion**

C57BL/6 Tieren im Alter von exakt 14 Tagen wurden intracerebral mit Masern-Virus infiziert. Dazu wurden 20µl Virus-Suspension mit  $1 \times 10^3$  pfu in die linke Hemisphäre der Tiere injiziert (Kollaboration mit Prof. Jürgen Schneider-Schaulies) (123). Kontrolltieren wurde PBS injiziert. Die Tiere wurden dabei mit Isofluran narkotisiert. Nach 3 Wochen wurden bei den Tieren im Alter von 5 Wochen, wie unter 3.8.1. beschrieben, EAE induziert. Kontrolltiere erhielten eine Emulsion aus CFA und PBS subkutan und Pertussis Toxin intraperitoneal.

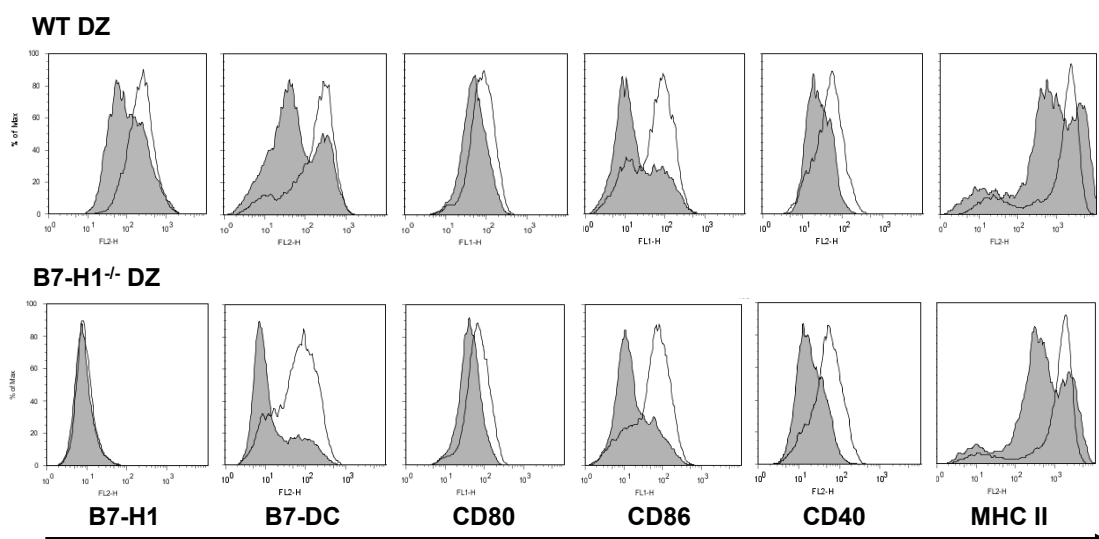
## 4. Ergebnisse

### 4.1. Einfluss des koinhibitorischen Moleküls B7-H1 auf das tolerogene Potential von DZ

In dieser Arbeit sollte geklärt werden, inwieweit Signal-Moleküle auf der Oberfläche der DZ einen Einfluss auf die EAE-Protektion haben. Es sollte untersucht werden, ob die Abwesenheit des Moleküls B7-H1 das tolerogene Potential der DZ beeinflusst.

#### 4.1.1. Oberflächenmarker und stimulatorische Kapazität von DZ aus Wildtyp und B7-H1<sup>-/-</sup> Mäusen

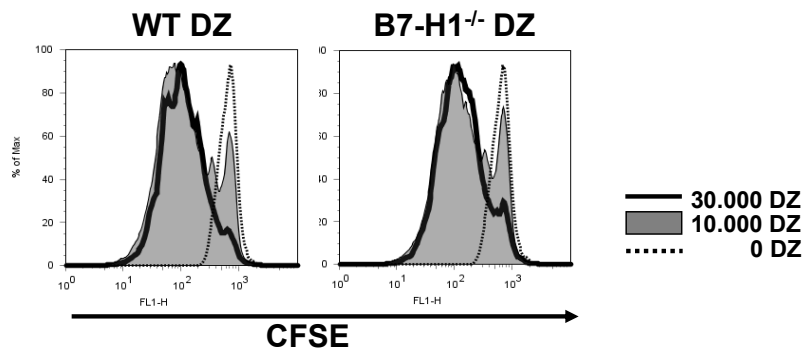
Bevor untersucht werden konnte, ob B7-H1-defiziente DZ eine tolerogene Wirkung im EAE-Modell haben, sollten zunächst die Eigenschaften von WT und B7-H1<sup>-/-</sup> DZ verglichen werden. Hierfür wurden DZ aus Knochenmarkszellen von WT und B7-H1<sup>-/-</sup> Mäusen generiert und für 16 Stunden mit TNF stimuliert. Die Zellen wurden für verschiedene Oberflächenmarker gefärbt (B7-H1, B7-DC, CD80, CD86, CD40, MHC II) und mittels FACS analysiert. Abgesehen von B7-H1, welches auf den B7-H1-defizienten DZ fehlt, zeigten die DZ vergleichbare Expression der untersuchten Oberflächenmarker (Abb. 5).



**Abbildung 5: WT und B7-H1<sup>-/-</sup> zeigen die gleiche Expression von Oberflächenmarkern**

DZ wurden aus dem Knochenmark von WT und B7-H1<sup>-/-</sup> Mäusen generiert, mit TNF stimuliert, für verschiedene Oberflächenmarker gefärbt und mittels FACS analysiert. Die schattierte Fläche zeigt die unstimulierte Kontrolle und die schwarze Linie zeigt die TNF-stimulierten DZ.

Da die DZ aus WT und B7-H1<sup>-/-</sup> Mäusen eine vergleichbare Expression von Oberflächenmarkern zeigten, sollte nun überprüft werden, ob sie auch vergleichbare funktionelle Eigenschaften haben. Um dies zu überprüfen, wurde untersucht, inwieweit die verschiedenen DZ in der Lage sind, die Proliferation von T-Zellen zu stimulieren. Dazu wurden CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus 2D2 Mäusen isoliert. Diese haben einen TZR der spezifisch für das MOG-Peptid ist. Diese T-Zellen wurden mit DZ aus WT oder B7-H1<sup>-/-</sup> Mäusen kultiviert, welche mit TNF stimuliert und mit MOG<sub>35-55</sub> beladen wurden. Die T-Zellen wurden zuvor mit CFSE gefärbt, um ihre Proliferation durch den Verlust des Farbstoffs nachzuweisen. Die CFSE-Verdünnung bei der Ko-Kultur mit WT bzw. B7-H1 DZ war vergleichbar, was zeigt, dass beide DZ die T-Zellen stimulieren können (Abb. 6).



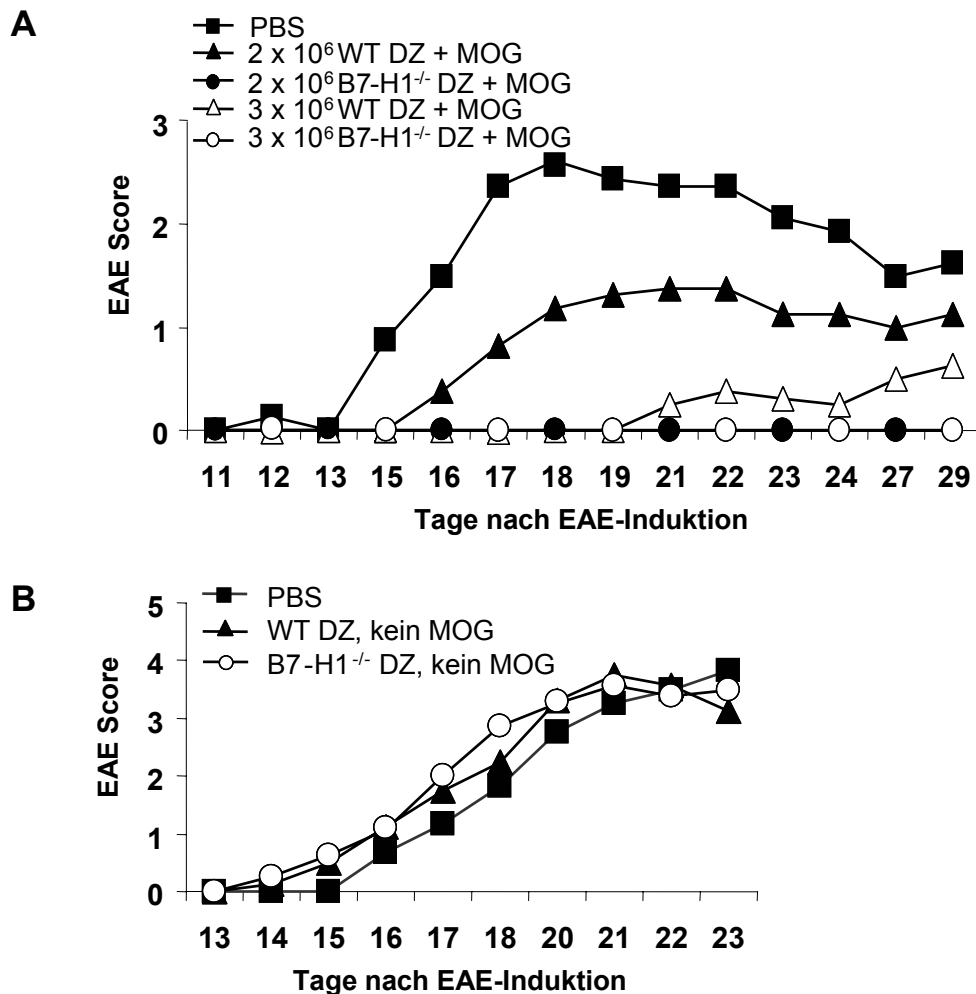
**Abbildung 6: WT und B7-H1<sup>-/-</sup> stimulieren die Proliferation von T-Zellen gleich gut**

TNF-stimulierte und MOG<sub>35-55</sub> beladene DZ aus WT und B7-H1<sup>-/-</sup> Mäusen wurden mit CFSE- gefärbten CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus 2D2 Mäusen ko-kultiviert. Die CFSE-Verdünnung wurde mittels FACS untersucht. Die gepunktete Linie zeigt die Kontrolle ohne DZ, die schattierte Linie zeigt die Kultur mit 10.000 DZ und die durchgezogene Linie zeigt die Kultur mit 30.000 DZ.

#### 4.1.2. Tolerogenes Potential von WT und B7-H1<sup>-/-</sup> DZ

Wie bereits aus Vorarbeiten in der Arbeitsgruppe bekannt war, führt die wiederholte intravenöse Injektion von semireifen, MOG-beladenen DZ zu der Protektion vor der EAE (100). In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob das Fehlen des koinhibitorischen Moleküls auf der Oberfläche der DZ einen Einfluss auf die EAE-Protektion hat. Zu diesem Zweck wurden DZ aus dem Knochenmark von WT und B7-H1<sup>-/-</sup> Mäusen generiert, mit TNF gereift, mit MOG-Peptid beladen und anschließend mehrmals intravenös in WT Mäuse injiziert bevor die EAE induziert wurde. Es wurden verschiedene Mengen an Zellen verwendet und es konnte

beobachtet werden, dass die suboptimale Dosis von  $2 \times 10^6$  WT DZ zu einer Linderung der EAE-Symptome führte, während die höhere Dosis von  $3 \times 10^6$  Zellen eine vollständige Protektion bewirkte. Bei den B7-H1<sup>-/-</sup> DZ war bereits die suboptimale Dosis ausreichend für eine vollständige Protektion der Mäuse (Abb. 7A). Der Effekt der EAE-Protektion ist MOG-spezifisch, da die Beladung der DZ mit dem Peptid nötig ist, um die EAE zu verhindern. Injizierte man DZ, die zwar mit TNF gereift, jedoch nicht mit MOG<sub>35-55</sub> beladen wurden, zeigten die Mäuse EAE-Symptome (Abb. 7B).



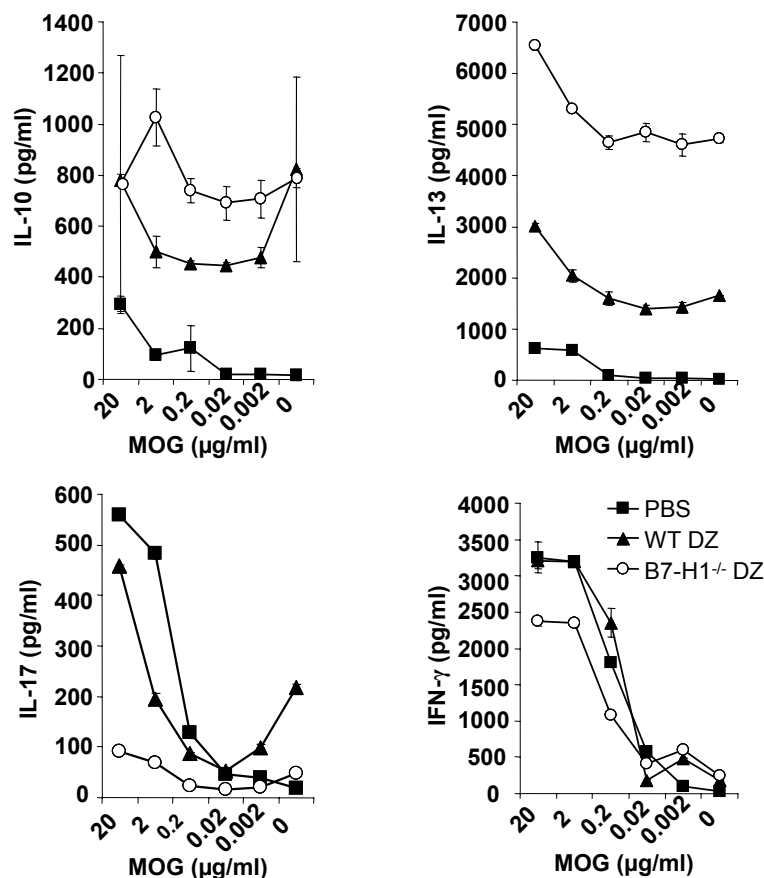
**Abbildung 7: B7-H1<sup>-/-</sup> protektieren besser vor EAE als WT DZ**

A)  $2 \times 10^6$  bzw.  $3 \times 10^6$  DZ aus WT und B7-H1<sup>-/-</sup> Mäusen wurden mit TNF gereift und mit MOG<sub>35-55</sub> beladen. Die Zellen wurden dreimal i.v. in C57BL/6 Mäuse injiziert, den Kontrollmäusen wurde PBS injiziert. Anschließend wurde EAE induziert und der Krankheitsverlauf der Tiere wurde beobachtet.

B)  $2,5 \times 10^6$  WT bzw. B7-H1<sup>-/-</sup> DZ wurden mit TNF gereift, jedoch nicht mit MOG<sub>35-55</sub> beladen. Die Zellen wurden dreimal i.v. injiziert und EAE wurde induziert.

### 4.1.3. Injektion von B7-H1<sup>-/-</sup> DZ moduliert die T-Zell-Antwort in der Peripherie

Um die Frage zu klären, warum die B7-H1-defizienten DZ besser in der EAE-  
 Protektion sind, wurden die Milz-Zellen von PBS und TNF-DZ injizierten Mäusen  
 entnommen, nachdem 10 Tage zuvor EAE induziert wurde. Um die periphere T-Zell-  
 Antwort zu untersuchen, wurden die Milz-Zellen mit MOG-Peptid restimuliert und auf  
 ihre Zytokin-Produktion untersucht. Die PBS-Kontrolltiere zeigten eine starke  
 Produktion der pathogenen Zytokine IL-17 und IFN- $\gamma$ , während die Mengen der  
 protektiven Zytokine IL-10 und IL-13 niedrig waren. Die WT-DZ injizierten Tiere  
 zeigten eine Reduktion der pathogenen und eine Erhöhung der protektiven Zytokine.  
 Dieser Effekt wurde durch die Injektion von B7-H1<sup>-/-</sup> DZ verstärkt, hier waren die  
 protektiven Zytokine noch höher und die pathogenen Zytokine noch niedriger als bei  
 der Injektion von WT DZ (Abb. 8).



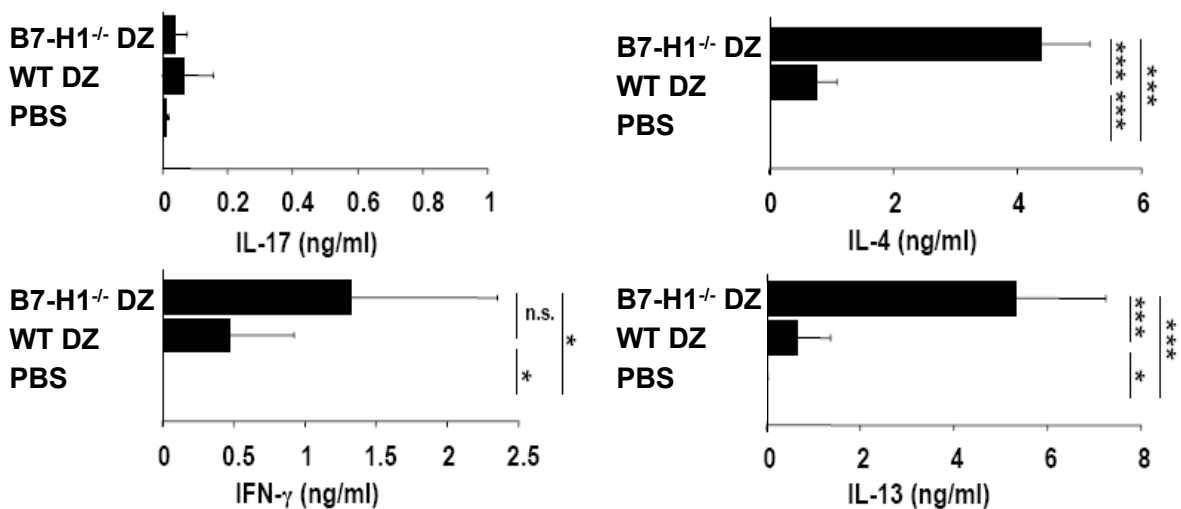
**Abbildung 8: Injektion von B7-H1<sup>-/-</sup> DZ bewirkt eine verstärkte Produktion von protektiven Zytokinen**

MOG<sub>35-55</sub>-beladene und TNF-gereifte DZ aus WT und B7-H1<sup>-/-</sup> Mäusen wurden dreimal in Mäuse injiziert bevor EAE induziert wurde. Kontrollmäusen wurde PBS injiziert. 10 Tage nach der EAE-

Induktion wurden die Milz-Zellen mit verschiedenen Mengen MOG-Peptid restimuliert. Nach 4 Tagen Kultur wurden die Überstände mittels ELISA auf ihren Zytokin-Gehalt untersucht.

#### 4.1.4. Injektion von B7-H1<sup>-/-</sup> DZ bewirkt die Produktion von protektiven Serum-Zytokinen

Aus früheren Arbeiten in der Arbeitsgruppe war bekannt, dass bei der EAE-Protektion durch TNF-DZ NKT-Zellen eine Rolle spielen (101). Die Antwort dieser Zellen kann bereits nach kurzer Zeit durch die Produktion von Zytokinen im Serum nachgewiesen werden. Um dies zu überprüfen, wurden DZ von WT und B7-H1<sup>-/-</sup> mit TNF gereift und mit MOG-Peptid beladen und anschließend dreimal im Abstand von 2 Tagen intravenös in Mäuse injiziert. Nach der 3. Injektion wurde das Serum der Tiere mittels ELISA auf IL-17, IFN- $\gamma$ , IL-4 und IL-13 untersucht. Kontrolltiere, die mit PBS injiziert wurden, zeigten keine Zytokine im Serum. IL-17 war weder nach PBS- noch nach DZ-Injektion nachweisbar. Die mit WT-DZ injizierten Tiere zeigten jedoch einen Anstieg der Zytokine IFN- $\gamma$ , IL-4 und IL-13. Dieser Anstieg war um ein Vielfaches verstärkt in den Mäusen die B7-H1<sup>-/-</sup> DZ erhalten haben (Abb. 9).

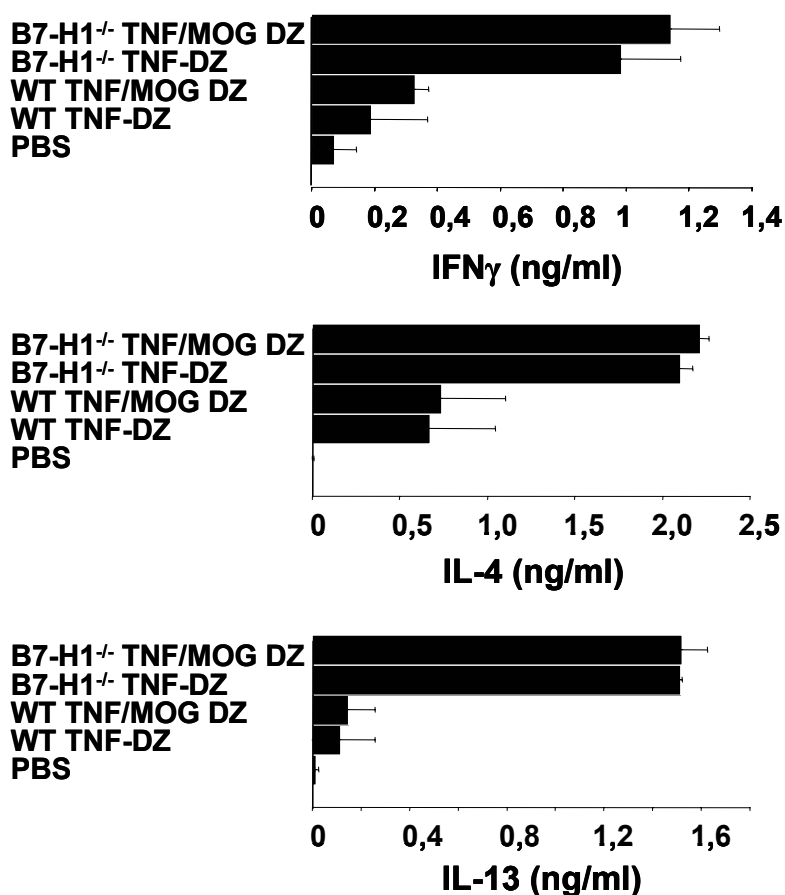


**Abbildung 9: Injektion von B7-H1<sup>-/-</sup> DZ bewirkt einen starken Anstieg von protektiven Serum-Zytokinen**

DZ aus WT und B7-H1<sup>-/-</sup> Mäusen wurden mit TNF gereift und mit MOG<sub>35-55</sub> beladen bevor sie i.v. in Mäuse injiziert wurden. Nach 3 Injektionen im Abstand von 2 Tagen wurde das Serum der Tiere auf Zytokine untersucht. 2 Stunden nach der letzten Injektion wurde Blut entnommen und zentrifugiert, nachdem es geronnen war. Das Serum wurde mittels ELISA getestet.

#### 4.1.5. Produktion der Serum-Zytokine ist MOG-unabhängig

Nun stellte sich die Frage, ob die Zytokin-Produktion nach der Injektion der DZ MOG-spezifisch ist. Dazu wurden WT und B7-H1<sup>-/-</sup> DZ verglichen, die mit TNF gereift und entweder mit MOG-Peptid beladen wurden oder unbeladen waren. Diese DZ wurden dreimal intravenös injiziert und nach der 3. Injektion wurde das Serum der Tiere auf den Zytokin-Gehalt untersucht. Es zeigte sich ein Anstieg von IFN- $\gamma$ , IL-4 und IL-13 und dieser war wesentlich höher nach Injektion von B7-H1<sup>-/-</sup> DZ verglichen mit WT DZ. Dabei spielte es jedoch keine Rolle, ob die DZ mit MOG-Peptid beladen waren. Somit ist die Zytokin-Produktion unabhängig von dem MOG-Peptid auf der DZ, da die Zytokin-Produktion gleich stark war, unabhängig davon, ob die DZ mit Peptid beladen wurden oder nicht (Abb. 10).



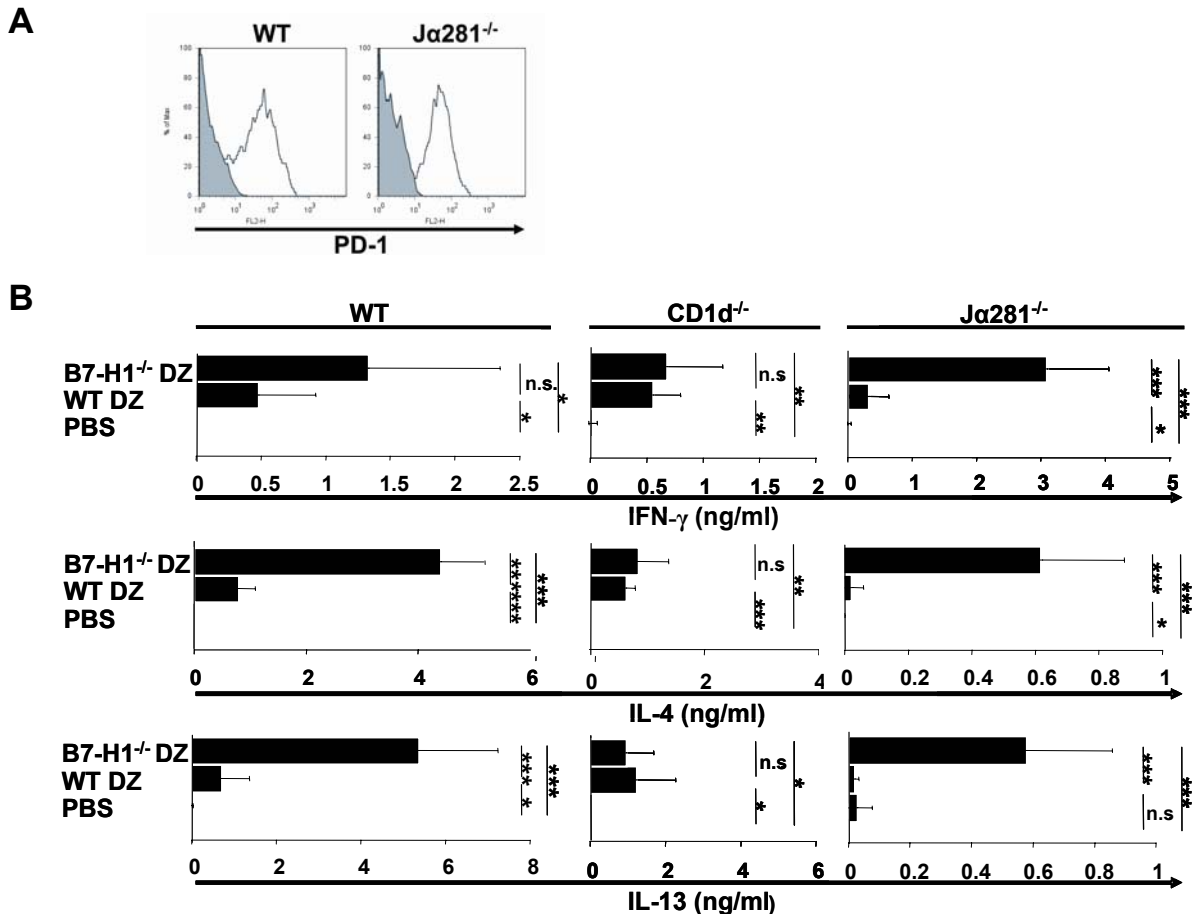
**Abbildung 10: Anstieg der protektiven Serum-Zytokine ist Peptid-unabhängig**

DZ aus WT und B7-H1<sup>-/-</sup> Mäusen wurden mit TNF gereift und entweder mit MOG<sub>35-55</sub> beladen oder unbeladen i.v. in Mäuse injiziert. Nach 3 Injektionen im Abstand von 2 Tagen wurde das Serum der Tiere auf Zytokine untersucht. 2 Stunden nach der letzten Injektion wurde Blut entnommen und zentrifugiert, nachdem es geronnen war. Das Serum wurde mittels ELISA getestet.



#### 4.1.6. Serum-Zytokine werden von Typ II NKT-Zellen produziert

Um herauszufinden, welche Zellen die Zytokine herstellen, wurden verschiedene *knock out*-Mäuse verwendet.  $CD1d^{-/-}$  Mäuse, welche keine NKT-Zellen haben und  $J\alpha 281^{-/-}$  Mäuse, welche keine Typ I NKT-Zellen jedoch Typ II NKT-Zellen besitzen. Es wurden WT oder  $B7-H1^{-/-}$  DZ mit TNF gereift, mit  $MOG_{35-55}$  beladen und anschließend mehrmals in WT,  $J\alpha 281^{-/-}$  oder  $CD1d^{-/-}$  Mäuse injiziert. 2 Stunden nach der 3. Injektion wurde das Serum auf Zytokine untersucht. WT Mäuse zeigten einen starken Anstieg der Zytokine  $IFN-\gamma$ , IL-4 und IL-13 nach der Injektion von  $B7-H1^{-/-}$  DZ (Abb. 11B), wie bereits in Abschnitt 4.6. beschrieben wurde. Bei den  $CD1d^{-/-}$  Mäusen war jedoch kein Unterschied zwischen der WT DZ- und der  $B7-H1^{-/-}$  DZ-injizierten Gruppe festzustellen. Dies deutet darauf hin, dass entweder die Typ I oder die Typ II oder beide NKT-Zellen wichtig für die Produktion dieser Zytokine sind. Die DZ-Injektion in  $J\alpha 281^{-/-}$  zeigte jedoch, dass die Typ II NKT-Zellen die entscheidenden Zellen sind. Diesen Mäusen fehlen nur die Typ I NKT-Zellen und in diesen Tieren konnte wieder die starke Zytokin-Produktion nach Injektion der  $B7-H1^{-/-}$  DZ festgestellt werden. Die NKT-Zellen von WT und  $J\alpha 281^{-/-}$  Mäusen wurden auf die Expression des B7-H1-Interaktionspartners PD-1 untersucht. Dazu wurden die Milz-Zellen für CD3 und NK1.1 gefärbt und die doppelt-positiven Zellen, welche die NKT-Zellen darstellen, auf die Expression von PD-1 untersucht. Sowohl in der WT Maus, welche beide NKT-Zell-Typen besitzt, als auch in der  $J\alpha 281^{-/-}$  Maus, wo nur Typ II NKT-Zellen vorhanden sind, war PD-1 auf den Zellen exprimiert (Abb. 11A).



**Abbildung 11: Serum-Zytokine werden von Typ II NKT-Zellen produziert**

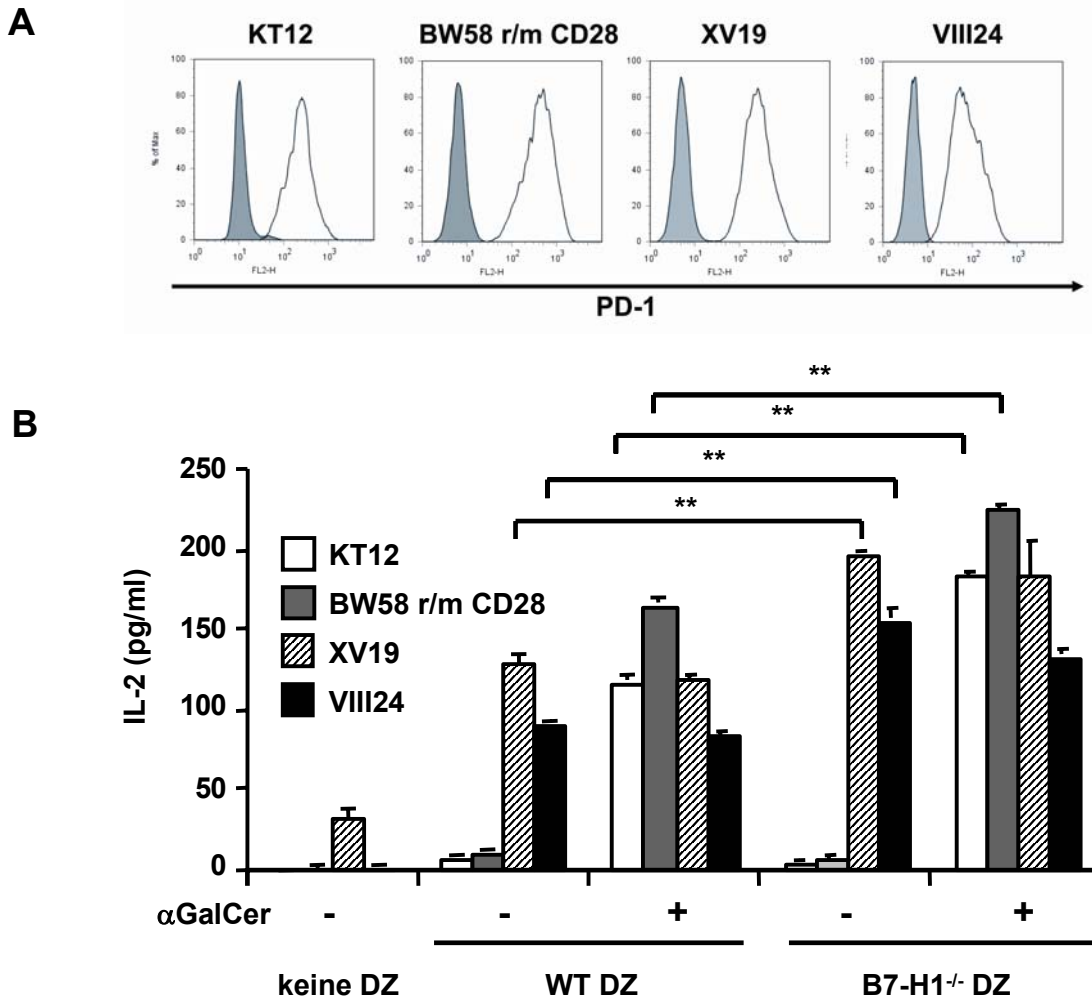
A) Milz-Zellen von WT und Ja281<sup>-/-</sup> Mäusen wurden für CD3 und NK1.1 gefärbt und die doppel-positiven Zellen wurden auf ihre PD-1 Expression untersucht.

B) MOG-beladene und TNF-gereifte WT bzw. B7-H1<sup>-/-</sup> DZ wurden dreimal i.v. in WT, Ja281<sup>-/-</sup> oder CD1d<sup>-/-</sup> Mäuse injiziert und 2 Stunden nach der 3. Injektion wurde das Serum mittels ELISA untersucht.

#### 4.1.7. Typ II NKT-Zellen werden von DZ stimuliert und dieser Effekt wird über B7-H1 reguliert

Um zu bestätigen, dass speziell Typ II NKT-Zellen über B7-H1 auf den DZ reguliert werden, wurden Ko-Kultur-Experimente mit verschiedenen Hybridomen durchgeführt. Die Hybridome KT12 und BW58 r/m CD28 entsprechen Typ I NKT-Zellen und die Hybridome XV19 und VIII24 entsprechen Typ II NKT-Zellen. Alle 4 Hybridome exprimieren den Interaktionspartner von B7-H1, PD-1, auf ihrer Oberfläche (Abb. 12A). Jedoch wurden nur die Typ II NKT-Zellen von den DZ stimuliert (Abb. 12B). Es wurden TNF-gereifte WT und B7-H1<sup>-/-</sup> DZ mit den einzelnen Hybridomen kultiviert und nach 24 Stunden wurde die Antwort der Hybridome anhand der IL-2 Produktion

im Überstand gemessen. Es zeigte sich, dass nur die Hybridome XV19 und VIII24 auf die DZ reagierten und ihre Reaktion war in Abwesenheit von B7-H1 stärker. Die Hybridome KT12 und BW58 r/m CD28 konnten nur durch DZ stimuliert werden, die  $\alpha$ -GalCer in Kombination mit dem CD1d-Molekül präsentierten.



**Abbildung 12: Typ II NKT-Zell-Hybridome werden von DZ stimuliert und dies wird über B7-H1 reguliert**

A) NKT-Zell-Hybridome wurden für PD-1 gefärbt und mittels FACS analysiert. Das schattierte Histogramm zeigt den Isotyp und die schwarze Linie zeigt die PD-1-Färbung.

B)  $1 \times 10^4$  TNF-gereifte DZ aus WT oder B7-H1<sup>-/-</sup> Mäusen wurden zusammen mit den verschiedenen NKT-Zell-Hybridomen kultiviert und nach 24 Stunden wurde mittels ELISA der IL-2 Gehalt im Überstand bestimmt. Als Positiv-Kontrolle wurde  $\alpha$ -GalCer (10ng/ml) zugegeben.

Zusammenfassend hat diese Arbeit gezeigt, dass das tolerogene Potential von semireifen, MOG-beladenen DZ durch die Abwesenheit des koinhibitorischen Moleküls B7-H1 verstärkt wird. B7-H1-defiziente DZ induzieren verstärkte protektive

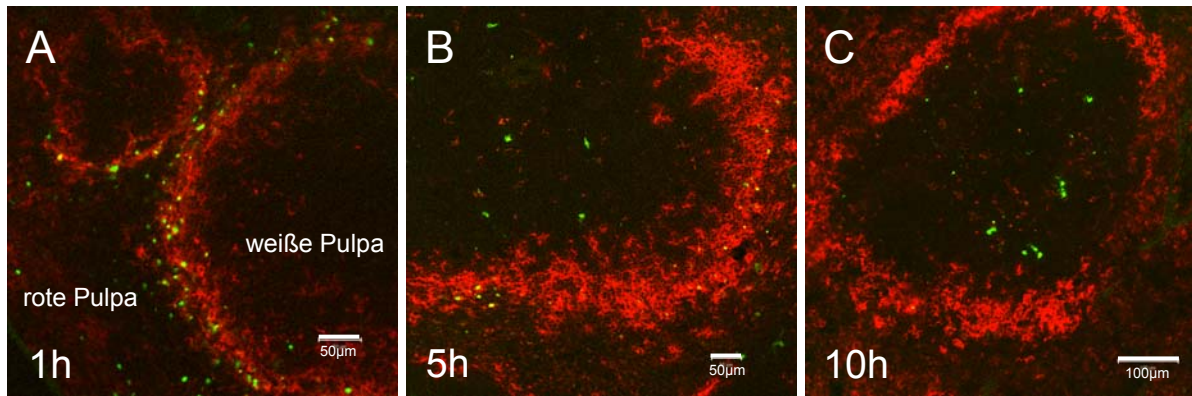
T- und NKT-Zell-Antworten. Im Serum der Mäuse konnten nach Injektion von B7-H1<sup>-/-</sup> DZ erhöhte Mengen der protektiven Zytokine IL-4 und IL-13 nachgewiesen werden. Experimente mit CD1d<sup>-/-</sup> und Jα281<sup>-/-</sup> Mäusen haben ergeben, dass diese Zytokine größtenteils von Typ II NKT-Zellen produziert werden. Somit hat das B7-H1-Molekül eine inhibitorische Wirkung auf Typ II NKT-Zellen und in Abwesenheit dieses Moleküls kommt es folglich zu einer verstärkten Antwort dieser Zellen. Experimente mit NKT-Zell-Linien konnten darüber hinaus zeigen, dass nur Typ II NKT-Zellen von DZ stimuliert werden konnten und dieser Effekt war in Abwesenheit von B7-H1 verstärkt. Typ I NKT-Zellen konnten nur von DZ stimuliert werden, wenn der CD1d-Ligand α-GalCer zugegeben wurde. Somit haben DZ einen endogenen Liganden für Typ II, nicht jedoch für Typ I NKT-Zellen.

### **4.2. Einfluss von Marginalzonen-B-Zellen auf die EAE-Protektion**

#### **4.2.1. Wanderung von intravenös injizierten DZ in die Milz**

Aus Vorarbeiten in der Arbeitsgruppe war bekannt, dass die Milz bei der EAE-Protektion wichtig ist. Entfernt man die Milz nach den DZ-Injektionen ist keine Protektion der Tiere mehr möglich (unveröffentlichte Daten, Carsten Wieth).

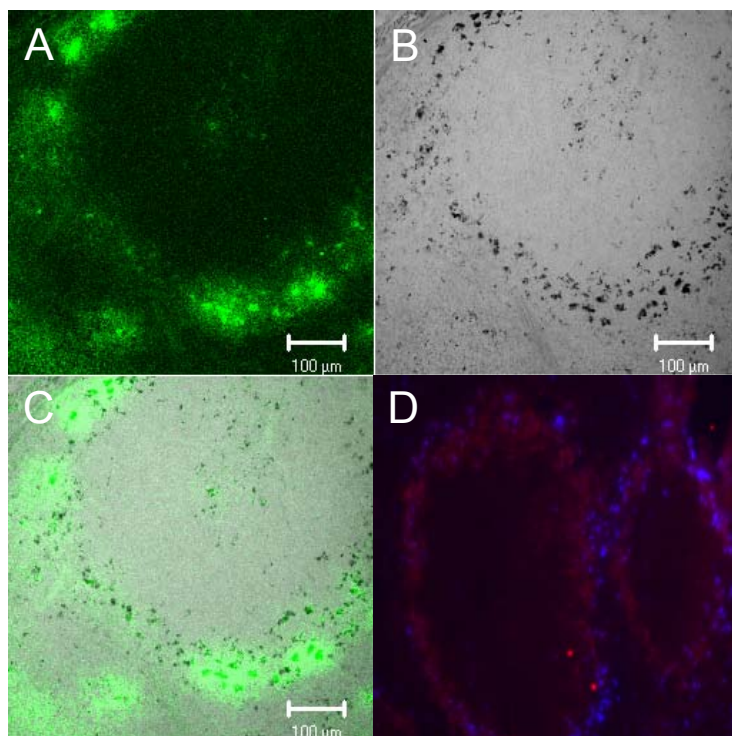
Dies legt nahe, dass die injizierten DZ in die Milz wandern. Um dies zu überprüfen, wurden DZ generiert, mit TNF gereift und mit dem grün-fluoreszierenden Farbstoff CFSE gefärbt, um die Lokalisation in der Milz feststellen zu können. Anschließend wurden die Zellen intravenös in C57BL/6 Mäuse injiziert. Nach 1, 5 bzw. 10 Stunden wurden die Milzen der Mäuse entnommen und Gefrierschnitte angefertigt. Diese wurden mit dem Marker für Sialoadhesin (CD169) gefärbt, welcher die Marginalzone anzeigt, da er die Makrophagen der MZ anfärbt. Nach einer Stunde waren die grün markierten DZ ausschließlich in der MZ der Milz zu finden (Abb. 13A). Bereits nach 5 Stunden konnten die i.v. injizierten DZ jedoch in der weißen Pulpa der Milz nachgewiesen werden und nach 10 Stunden befanden sie sich ausschließlich dort (Abb. 13B, C). Die DZ gelangten passiv über den Blutstrom in die MZ, was dadurch gezeigt werden konnte, dass sich auch i.v. injizierte fluoreszierende Partikel dort anlagerten (Abb. 14). Diese Partikel blieben jedoch in der MZ im Gegensatz zu den DZ, die anschließend aktiv in die weiße Pulpa wanderten.



**DZ Marginalzone**

**Abbildung 13: Intravenös injizierte DZ wandern über die Marginalzone in die weiße Pulpa der Milz**

Aus Knochenmarkszellen generierte DZ wurden mit CFSE (grün) gefärbt und i.v. in C57BL/6 Mäuse injiziert. Den Mäusen wurde zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Injektion die Milz entnommen und eingefroren. Gefrierschnitte von diesem Gewebe wurden für den Marker CD169 (rot) gefärbt, welcher die MZ Makrophagen anfärbt. Nach einer Stunde befanden sich die DZ ausschließlich in der MZ (A), nach 5 Stunden wanderten sie bereits in die weiße Pulpa (B) und nach 10 Stunden waren sie ausschließlich in der weißen Pulpa zu finden (C).



**Abbildung 14: Intravenös injizierte fluoreszierende Partikel wandern in die Marginalzone der Milz**

A-C) Grün-fluoreszierende Partikel (Fluoresbrite Microspheres) wurden i.v. in Mäuse injiziert. Nach 24 Stunden wurde die Milz entnommen und Gefrierschnitte wurden hergestellt. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen zeigen, dass sich die Partikel in der MZ der Milz ansammeln

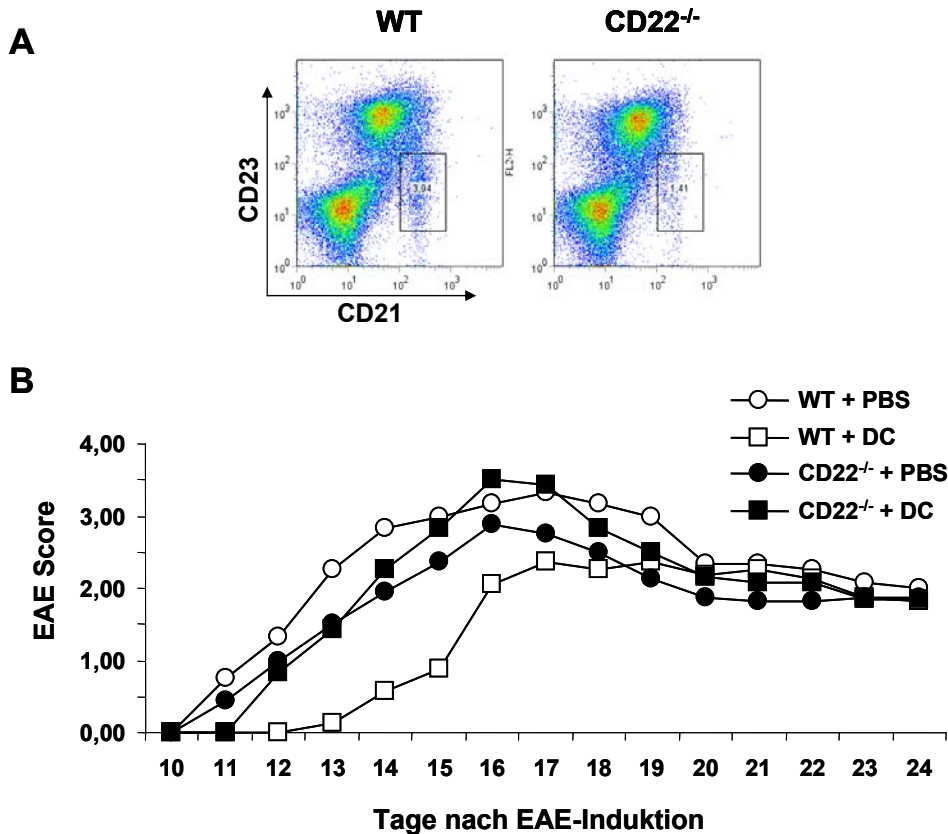
(A), die Durchlichtaufnahme zeigt eine kreisförmige Anlagerung der Partikel (B). C zeigt die Überlagerung von A und B.

D) Blau-fluoreszierende Partikel wurden i.v. injiziert und nach 24 Stunden wurden Gefrierschnitte der Milz hergestellt. Die Schnitte wurden mit dem MZ-Marker CD169 (rot) angefärbt und fluoreszenzmikroskopisch analysiert. Die Überlagerung des blauen und roten Kanals zeigt, dass sich die Partikel in der MZ anlagerten.

### **4.2.2. MZ-B-Zellen sind wichtig für die EAE-Protektion**

Da die i.v. injizierten DZ auf ihrer Wanderung in die weiße Pulpa zunächst die Marginalzone der Milz passieren, stellte sich die Frage, mit welchen Zellen sie dort interagieren könnten. Da sich in der MZ unter anderem die MZ B-Zellen befinden, sollte geklärt werden, ob diese bei der EAE-Protektion eine Rolle spielen. Um dies zu untersuchen, wurden EAE-Protektionsexperimente in  $CD22^{-/-}$  Mäusen durchgeführt, da diese Tiere eine Reduktion der MZ B-Zellen zeigen (17).

Die Population der MZ B-Zellen kann durch die Oberflächen-Färbung mit den Markern CD21 und CD23 nachgewiesen werden, da die Zellen CD21 stark und CD23 schwach exprimieren (Abb. 15A). Um zu überprüfen, ob die Reduktion der MZ-B-Zellen die EAE-Protektion beeinträchtigt, wurden DZ aus WT Mäusen generiert, mit TNF gereift, mit MOG<sub>35-55</sub> beladen und dreimal in WT und  $CD22^{-/-}$  Mäuse injiziert. Es wurde die sub-optimale Dosis von  $2 \times 10^6$  DZ injiziert um herauszufinden, ob die Protektion in den *knock out*-Tieren besser oder schlechter funktionierte. Im Anschluss wurde EAE induziert und der Krankheitsverlauf der Tiere beobachtet. WT und  $CD22^{-/-}$  Tiere, die mit PBS injiziert wurden, entwickelten EAE-Symptome, während die WT Tiere, die DZ injiziert bekamen, eine Linderung der EAE zeigten (Abb. 15B). Hingegen bewirkte die DZ-Injektion in den  $CD22^{-/-}$  Tieren keine Verbesserung des Krankheitsverlaufs. Dies zeigt, dass die MZ B-Zellen eine protektive Rolle bei der EAE-Protektion durch die DZ spielen.



**Abbildung 15: Marginalzonen B-Zellen spielen eine Rolle bei der EAE-Protektion**

A) Milz-Zellen aus WT und CD22<sup>-/-</sup> Mäusen wurden für CD21 und CD23 gefärbt und mittels FACS analysiert.

B) WT und CD22<sup>-/-</sup> Mäusen wurden dreimal 2x10<sup>6</sup> TNF-gereifte und MOG<sub>35-55</sub>-beladene DZ injiziert. Kontrolltieren wurde PBS injiziert. Anschließend wurde EAE induziert und der Krankheitsverlauf der Tiere beobachtet.

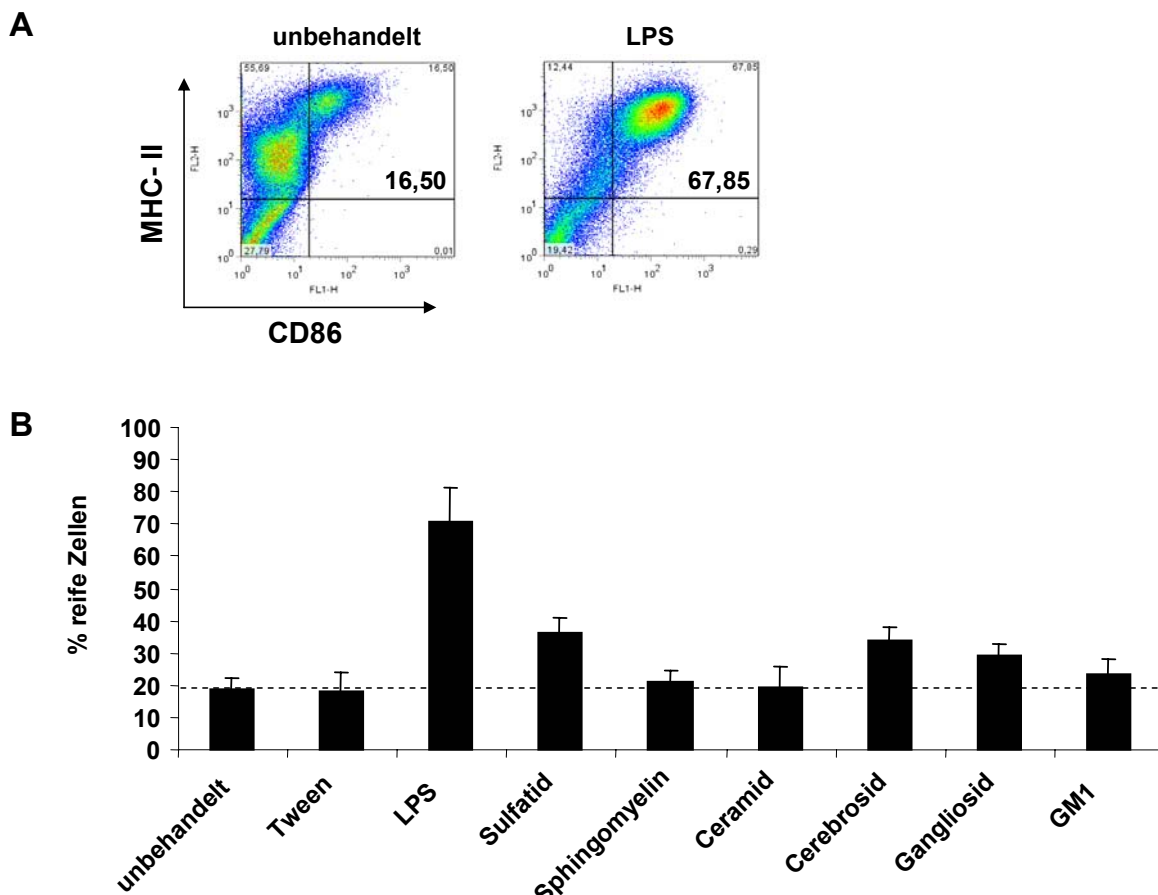
Zusammenfassend kann man sagen, dass intravenös injizierte DZ zunächst über den Blutstrom in die MZ der Milz gelangen, von wo sie anschließend in die weiße Pulpa der Milz wandern. In der MZ können die DZ unter anderem mit MZ-B-Zellen interagieren. Experimente mit CD22<sup>-/-</sup> Mäusen, welche eine Reduktion der MZ-Population zeigen, haben ergeben, dass diese Tiere nicht durch DZ-Injektion vor EAE geschützt werden können. Dies deutet darauf hin, dass die MZ-B-Zellen wichtig für die EAE-Protektion durch DZ sind.

#### 4.3. Effekt von Glykolipiden auf DZ

Die Myelinscheide des ZNS besteht zu 70% aus Glykolipiden, welche somit eine wichtige Quelle von Antigenen des ZNS sind. Sie können während einer MS-Erkrankung das Ziel autoreaktiver Zellen sein.

### 4.3.1. Lipide bewirken DZ-Reifung

In dieser Arbeit sollte untersucht werden, welchen Effekt verschiedene Glykolipide auf DZ haben. Zu diesem Zweck wurden DZ über Nacht mit diesen Lipiden behandelt und im Anschluss wurde mittels FACS-Analyse für MHC II und CD86 überprüft, ob sich der Reifungszustand der Zellen verändert (Abb. 16). Es zeigte sich, dass Sulfatid, Cerebrosid und Gangliosid die Anzahl der MHC II und CD86 doppelt-positiven DZ verglichen mit der unbehandelten bzw. mit der Lösungsmittel-Kontrolle erhöhte. GM1 Gangliosid führte auch zu einer leichten Erhöhung der reifen Zellen, allerdings nicht so stark wie Sulfatid, Cerebrosid, und Gangliosid. Sphingomyelin und Ceramid dagegen bewirkten keine Reifung. Im Überstand dieser Zellen waren jedoch keine Zytokine wie IL-6 und IL-12p40 messbar (Abb. 17). Diese Lipid-gereiften DZ entsprechen somit eher der TNF-behandelten semireifen DZ als der vollständig gereiften LPS-DZ.



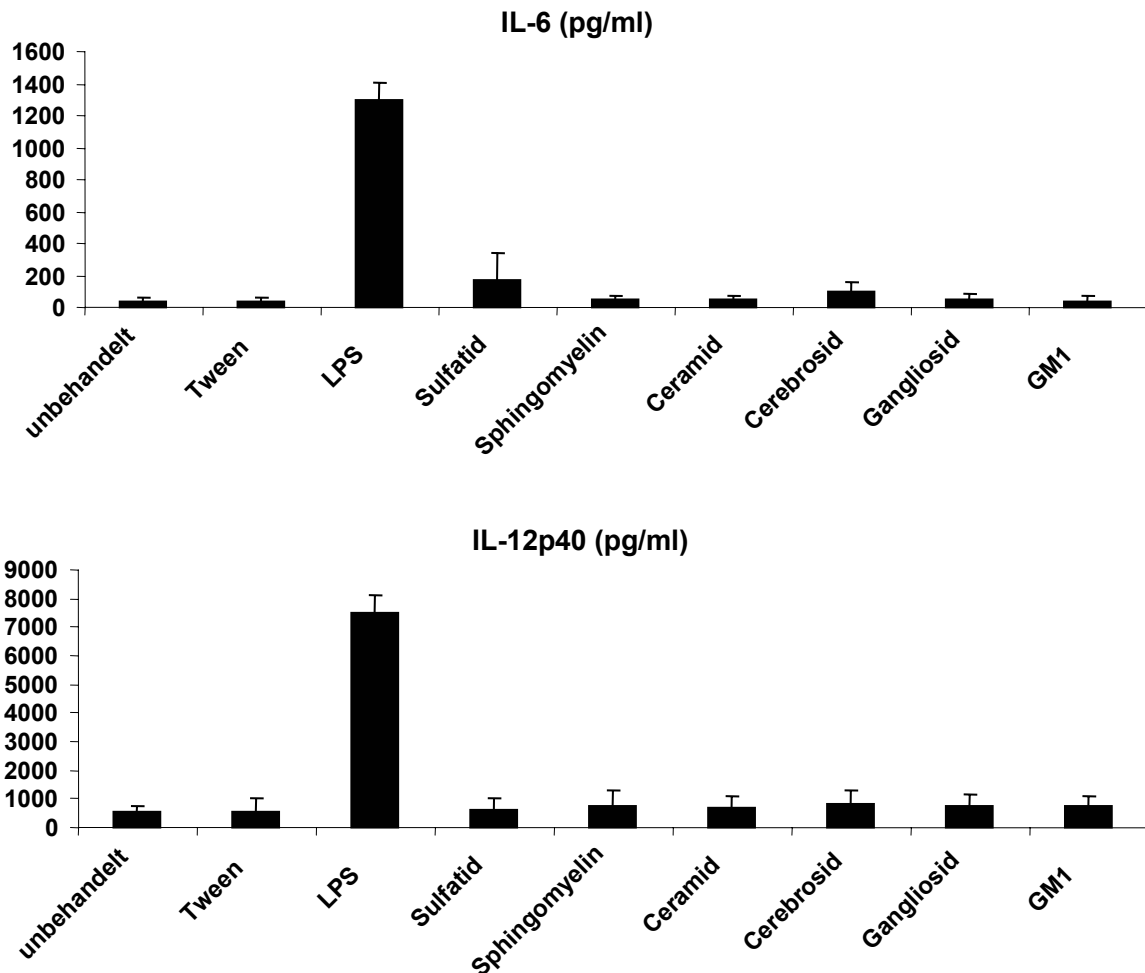
**Abbildung 16: Lipide induzieren Reifung von DZ**

DZ wurden für 16 Stunden mit 80µg/µl Lipid behandelt. Als Positiv-Kontrolle wurden die DZ mit LPS gereift und als Negativ-Kontrolle wurden sie mit dem Lösungsmittel der Lipide (0,025% Tween in PBS)



## Ergebnisse

behandelt. Im Anschluss wurden sie für MHC II und CD86 gefärbt und mittels FACS analysiert. A) zeigt exemplarisch FACS Daten von unbehandelten und LPS-gereiften DZ. B) Zeigt die Zusammenfassung von 3 unabhängigen Experimenten, %-Zahlen stehen für reife Zellen (entspricht dem rechten, oberen Quadranten in A)



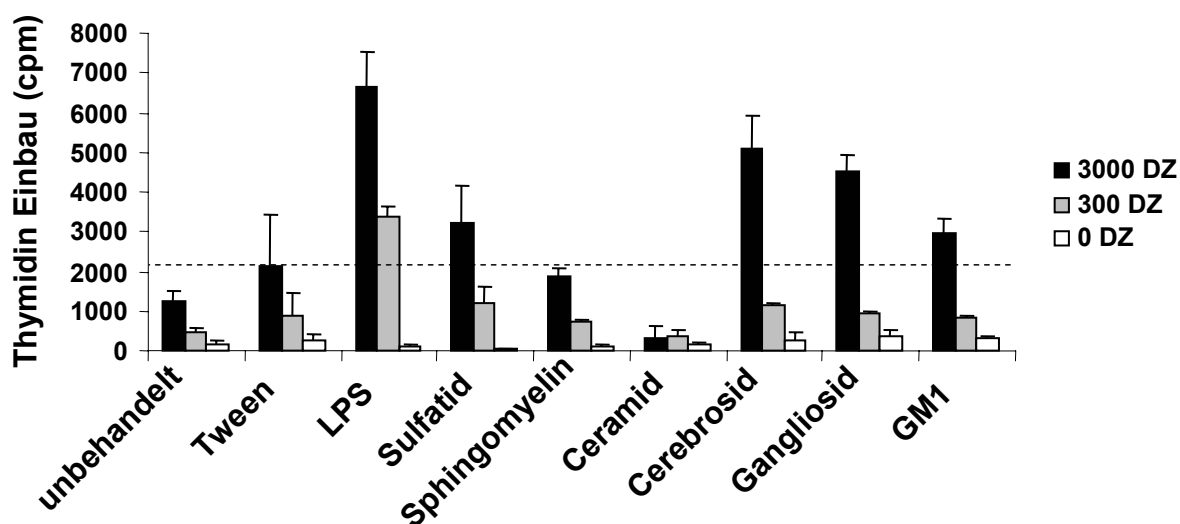
**Abbildung 17: Reifung mit Lipiden induziert keine Zytokin-Produktion von DZ**

DZ wurden für 16 Stunden mit  $80\mu\text{g}/\mu\text{l}$  Lipid behandelt. Als Positiv-Kontrolle wurden die DZ mit LPS gereift und als Negativ-Kontrolle wurden sie mit dem Lösungsmittel der Lipide (0,025% Tween in PBS) behandelt. Anschließend wurden die Überstände mittels ELISA auf IL-6 und IL-12p40 untersucht. Die Abbildung entspricht den Mittelwerten aus 3 unabhängigen Versuchen.

### 4.3.2. Lipid-gereifte DZ stimulieren T-Zellen

Um zu überprüfen, ob diese Lipid-gereiften DZ stimulatorische Eigenschaften haben, wurde eine „mixed lymphocyte reaction“ (MLR) durchgeführt. Dazu wurden DZ von BALB/c Mäusen mit Milz-Zellen von C57BL/6 Mäusen kultiviert. Um zu testen, ob die

T-Zellen von den DZ zur Proliferation angeregt werden können, wurde radioaktives [<sup>3</sup>H]-Thymidin zugegeben und somit konnte man durch den Einbau des [<sup>3</sup>H]-Thymidins auf die Proliferation der Zellen schließen. Es zeigte sich, dass die DZ, welche aufgrund der Lipid-Behandlung gereift wurden, nämlich die Sulfatid-, Cerebrosid-, Gangliosid- und GM1-Gangliosid-gereiften DZ, zu einer T-Zell-Proliferation führten. Dies war jedoch nicht der Fall bei den DZ die mit Sphingomyelin oder Ceramid gereift wurden (Abb. 18).



**Abbildung 18: Lipid-gereifte DZ stimulieren T-Zellen**

DZ einer BALB/c Maus wurden für 16 Stunden mit Lipiden gereift. Als Positiv-Kontrolle wurden die DZ mit LPS gereift und als Negativ-Kontrolle wurden sie mit dem Lösungsmittel der Lipide (0,025% Tween in PBS) behandelt. Im Anschluss wurden diese DZ mit Milz-Zellen einer C57BL/6 Maus kultiviert. Nach 72 Stunden wurde [<sup>3</sup>H]-Thymidin zugegeben und weitere 16 Stunden später wurden die Zellen geerntet und der Einbau des radioaktiven [<sup>3</sup>H]-Thymidins gemessen.

Zusammenfassend konnten diese Experimente zeigen, dass die Lipide Sulfatid, Cerebrosid, Gangliosid und GM1-Gangliosid zu einer Reifung von DZ führt, was sich in der erhöhten Expression von CD86 und MHC II, jedoch nicht in der Produktion von Zytokinen zeigt. Nach der Reifung mit diesen Lipiden waren die DZ in der Lage T-Zellen *in vitro* in einer MLR zu stimulieren. Dies war nicht der Fall bei Behandlung der DZ mit Sphingomyelin und Ceramid.

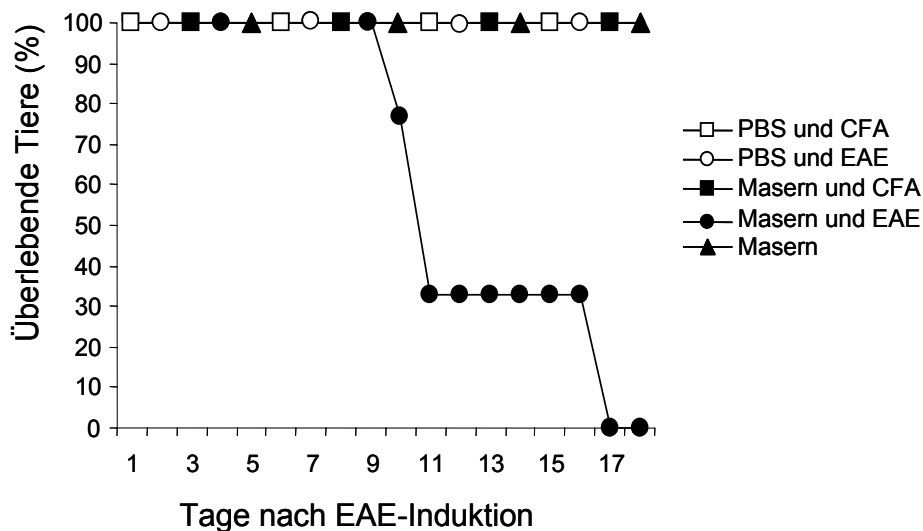
#### 4.4. Einfluss von Masern-Virus auf EAE

Nachdem es Hinweise darauf gibt, dass ein Zusammenhang zwischen Virus-Erkrankungen und Krankheiten wie MS besteht, sollte in dieser Arbeit ein Maus-

Modell zur Untersuchung dieses Zusammenhangs generiert werden. Dazu wurde ein bereits etabliertes Modell für eine latente Masern-Infektion im Gehirn von Mäusen verwendet (123). Es sollte nun geklärt werden, ob diese Infektion den Verlauf der EAE beeinflusst.

#### 4.4.1. EAE-Induktion bei Masern-infizierten Tieren bewirkt deren Tod

Um zu untersuchen, ob die latente Virus-Infektion im Gehirn einen Einfluss auf den EAE-Verlauf hat, wurden die Mäuse zunächst im Alter von 14 Tagen durch eine Injektion des Masern-Virus in das Gehirn infiziert. Die Tiere zeigten aufgrund dieser Infektion keine Krankheitssymptome. Im Alter von 5 Wochen wurde EAE induziert. Dies hatte zur Folge, dass die Tiere spontan starben (Abb. 19). Bei Kontrolltieren, welche eine PBS-Injektion ins Gehirn und anschließend EAE erhalten haben, war dies nicht der Fall. Auch nicht bei Tieren die lediglich mit Masern-Virus infiziert wurden, jedoch keine EAE-Induktion bekamen. Um zu überprüfen, ob dieser Effekt auf das MOG-Peptid im Adjuvant zurückzuführen ist, wurde Masern-infizierten Tieren das Adjuvant ohne MOG-Peptid injiziert und diese Tiere überlebten ebenfalls. Dies zeigt, dass der Tod der Tiere auf einen MOG-spezifischen Effekt zurückzuführen ist.



**Abbildung 19: EAE-Induktion bei Masern-infizierten Tieren führt zum Tod**

C57BL/6 Mäuse wurden in Alter von 14 Tagen mit Masern-Virus im Gehirn infiziert. Kontrolltieren wurde PBS ins Gehirn injiziert. Im Alter von 5 Wochen wurde bei den Tieren entweder EAE ausgelöst oder als Kontrolle CFA ohne MOG-Peptid injiziert. Das Überleben der Tiere nach EAE-Induktion wurde beobachtet.

## **5. Diskussion**

### **5.1. B7-H1-Defizienz verstärkt das tolerogene Potential von DZ durch Aktivierung von Typ II NKT-Zellen**

Wiederholte Injektionen von semireifen DZ, welche mit MOG-Peptid beladen wurden, können Mäuse vor der MOG-induzierten EAE schützen. Diese DZ protektieren die Tiere, da sie CD4<sup>+</sup> T-Zellen und NKT-Zellen aktivieren, welche die EAE verhindern, indem sie die Zytokine IL-10, IL-13 und IL-4 produzieren (100, 101). Dies führt zu einer Immundeviation, was die Th1 und Th17 Effektorzellen, welche die EAE bewirken, inhibiert. Diese protektiven CD4<sup>+</sup> T-Zellen und NKT-Zellen können durch semireife DZ, nicht jedoch durch unreife oder vollständig gereifte LPS-DZ aktiviert werden (100). Die semireifen DZ, welche durch Reifung mit TNF- $\alpha$  generiert werden, haben zwar die kostimulatorischen Moleküle CD80, CD86 und CD40 auf ihrer Oberfläche, produzieren jedoch keine proinflammatorischen Zytokine (43).

Die Frage war nun, inwieweit koinhibitorische Moleküle diese tolerogenen Eigenschaften der TNF-DZ beeinflussen. Das koinhibitorische Molekül B7-H1, welches unter anderem auf DZ exprimiert wird, ist ein wichtiger negativer Regulator bei der Stimulation von T-Zellen (108, 109). In Abwesenheit von B7-H1 kommt es zu einer Verschlechterung der Krankheitssymptome bei der aktiven MOG-induzierten EAE, die Krankheit beginnt früher und verläuft heftiger als bei WT Tieren (116). Es kommt zu einer stärkeren Immunreaktion durch infiltrierende autoreaktive Zellen im ZNS. Außerdem bewirkt der Transfer von enzephalitogenen T-Zellen in B7-H1<sup>-/-</sup> Mäusen stärkere EAE-Symptome als in WT Mäusen (108). B7-H1 wird während der EAE von APZ im ZNS exprimiert und reguliert die Aktivierung von T-Zellen (124). B7-H1 ist somit ein wichtiges regulatorisches Molekül, welches autoreaktive T-Zell-Antworten inhibieren kann. Alle diese Daten lassen vermuten, dass die Abwesenheit des inhibitorischen Moleküls auf der DZ einen Einfluss auf deren tolerogenes Potential haben könnte.

Es stellte sich heraus, dass die tolerogene Eigenschaft der DZ in Abwesenheit von B7-H1 verstärkt ist. Im EAE-Modell konnte gezeigt werden, dass B7-H1<sup>-/-</sup> DZ die Mäuse besser vor der Krankheit schützen können als die WT DZ. Bereits eine geringe Menge an B7-H1<sup>-/-</sup> DZ reicht aus, um eine vollständige Protektion der Tiere

zu erreichen. Die B7-H1<sup>-/-</sup> DZ bewirken eine erhöhte Produktion von protektiven CD4<sup>+</sup> T-Zell- und NKT-Zell-Zytokinen (IL-10, IL-13 und IL-4).

Die MOG-spezifische Antwort der CD4<sup>+</sup> T-Zellen auf die DZ-Injektion erfolgt in erster Linie durch die Produktion von IL-10 (100). Andere Arbeiten haben ergeben, dass die intracerebrale Injektion von semireifen, MOG-beladenen DZ ebenfalls zu einer EAE-Protektion führt, indem IL-10-produzierende Zellen induziert werden, welche IL-17-produzierende Zellen hemmen (125). Die intracerebrale Injektion von LPS-DZ, welche auch bei intravenöser Injektion keine Protektion bewirken, beschleunigte dagegen den EAE-Verlauf.

Es stellte sich nun die Frage, ob die tolerogene Eigenschaft der DZ über koinhibitorische Moleküle wie das B7-H1 vermittelt wird. Überraschenderweise zeigt sich in dieser Arbeit, dass die tolerogene Eigenschaft in Abwesenheit des inhibitorischen B7-H1 weiter erhöht ist. Aufgrund der Verschlechterung der EAE-Symptome in B7-H1<sup>-/-</sup> Mäusen (115, 116) wäre zu erwarten gewesen, dass B7-H1<sup>-/-</sup> DZ aufgrund des fehlenden inhibitorischen Signals weniger in der Lage sind ein hemmendes Signal für autoreaktive T-Zellen zu liefern und somit die Protektion durch die DZ verschlechtert wird. Die Daten dieser Arbeit belegen jedoch, dass das Gegenteil der Fall ist. Die Inhibition durch das B7-H1 wirkt sich nämlich in erster Linie auf protektive T- und NKT-Zellen aus, welche in Abwesenheit des inhibitorischen Signals eine stärkere Antwort und folglich eine bessere Protektion liefern. Eine andere Arbeit hat ebenfalls gezeigt, dass die B7-H1-Defizienz auf DZ im ZNS einen begünstigenden Einfluss auf die EAE hat (126). Fehlt bei intracerebraler LPS-DZ-Injektion das B7-H1 auf der DZ verläuft die EAE, verglichen mit der WT DZ, milder. Der Grund dafür ist Rekrutierung von CD8<sup>+</sup> Treg ins ZNS. Wie in unserem Modell bewirkt hier das Fehlen eines Inhibitors eine Expansion von protektiven Zellen und somit eine Abschwächung der Autoimmunreaktion. In unserem Modell sind jedoch in erster Linie NKT-Zellen betroffen.

Bei den NKT-Zellen kann man zwischen verschiedenen Subtypen unterscheiden. In einer vorangegangenen Arbeit konnte bereits gezeigt werden, dass NKT-Zellen wichtig für die EAE-Protektion durch DZ sind (101). In dieser Arbeit konnte jedoch nicht zwischen dem Beitrag von Typ I und Typ II NKT-Zellen unterschieden werden. Um herauszufinden, welche dieser Populationen durch ihre Zytokin-Produktion zur EAE-Protektion beiträgt, wurden verschiedene NKT-Zell-defiziente Mäuse verwendet. CD1d<sup>-/-</sup> Mäusen haben weder Typ I noch Typ II NKT-Zellen, während

J $\alpha$ 281<sup>-/-</sup> Mäuse keine Typ I NKT-Zellen, jedoch Typ II NKT-Zellen besitzen. Experimente mit diesen Tieren zeigen, dass die hohe Menge an NKT-Zell-Zytokinen, welche bereits wenige Stunden nach der 3. Injektion der B7-H1<sup>-/-</sup> DZ im Serum nachgewiesen werden kann, größtenteils von Typ II NKT-Zellen produziert wird. In CD1d<sup>-/-</sup> Mäusen werden diese Zytokine nicht produziert, wohingegen sie in J $\alpha$ 281<sup>-/-</sup> Mäuse nachgewiesen werden können. Diese Experimente zeigen, dass die Stimulation der Typ II NKT-Zellen, welche den B7-H1-Interaktionspartner PD-1 exprimieren, über B7-H1 negativ reguliert wird, da es in Abwesenheit von B7-H1 zu einer verstärkten Antwort kommt. Dies konnte in Versuchen mit verschiedenen NKT-Zell-Linien, welche Typ I oder Typ II NKT-Zellen entsprechen, bestätigt werden. Die Typ II NKT-Zellen werden von B7-H1-defizienten DZ stärker stimuliert als von WT DZ, was anhand der Produktion von IL-2 gemessen werden kann.

Es gibt Studien, die zeigen, dass die PD-1/B7-H1 Interaktion wichtig für die Regulation von invarianten NKT-Zellen (iNKT, Typ I) ist. Sie zeigen, dass die Interaktion zwischen PD-1 und B7-H1 verantwortlich für die Induktion eines anergischen Zustandes bei Typ I NKT-Zellen ist. Die NKT-Zell-Anergie äußert sich dadurch, dass die NKT-Zellen nach Stimulation durch  $\alpha$ -GalCer nicht erneut durch dieses aktiviert werden können (127). Dieser Mechanismus der Anergie-Induktion bei iNKT-Zellen wird über die PD-1/B7-H1 Interaktion reguliert, da die Blockade dieses Signalweges die Zellen wieder reaktiv macht (128, 129). Im Gegensatz zu diesen Daten werden die NKT-Zellen, welche durch DZ Injektion aktiviert werden, nicht anergisch, was sich dadurch zeigt, dass sie noch nach der 3. DZ-Injektion Zytokine produzieren. Außerdem führt die Injektion von DZ, im Gegensatz zu der Aktivierung durch  $\alpha$ -GalCer, zu einer Polarisierung der Zytokin-Antwort in Richtung Th2 (101, 130). Dies deutet darauf hin, dass  $\alpha$ -GalCer NKT-Zellen auf unterschiedliche Weise stimuliert wie ein endogener Ligand auf einer DZ.

Für die EAE-Protektion durch die semireife DZ ist in erster Linie eine Peptid-spezifische Aktivierung von MHC II abhängigen CD4<sup>+</sup> T-Zellen nötig, da keine Protektion mit TNF-DZ möglich ist, wenn diese nicht mit MOG-Peptid beladen wurden. NKT-Zellen tragen auch zur Protektion bei. Diese produzieren protektive Serum-Zytokine unabhängig davon, ob die injizierte TNF-DZ mit MOG-Peptid beladen wurde oder nicht. Allerdings reicht dieser protektive Effekt alleine nicht aus, um die Tiere zu schützen. Vielmehr ist es wichtig, dass die DZ gleichzeitig über MHC II die T-Zelle und über CD1d die NKT-Zelle aktiviert (101). Die Aktivierung der NKT-

Zellen hängt nicht von der Präsentation des MOG-Peptids in Kombination mit dem MHC II Molekül ab, sondern von der Erkennung eines endogenen Liganden auf der DZ, welcher von einem CD1d Molekül präsentiert wird. Um welchen Liganden es sich dabei handelt ist bisher unbekannt.

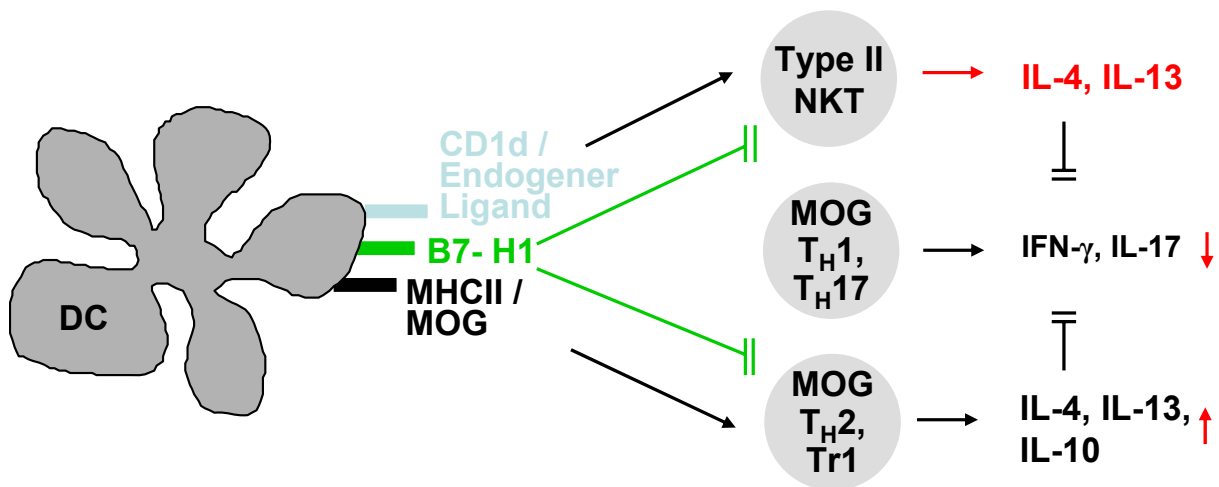
Es zeigte sich jedoch durch die Experimente mit den NKT-Zell-Linien, dass nur die Typ II NKT-Zellen diesen endogenen Liganden erkennen. Diese Versuche haben ergeben, dass nur die Typ II NKT-Zellen von einem endogenen CD1d-Liganden auf der DZ stimuliert werden können, da sie bereits von unbeladenen DZ aktiviert werden. Typ I NKT-Zellen dagegen können nur von DZ stimuliert werden, wenn diese den exogenen Liganden  $\alpha$ -GalCer zusammen mit dem CD1d Molekül präsentieren. Die DZ scheinen somit einen endogenen Liganden für Typ II, nicht jedoch für Typ I NKT-Zellen auf ihrer Oberfläche zu tragen. Ein möglicher Ligand für die Typ II NKT-Zelle ist das Sulfatid. Es konnte gezeigt werden, dass Typ II NKT-Zellen, welche reaktiv für Sulfatid sind, den Verlauf der EAE beeinflussen (99).

Durch die Injektion der TNF-DZ werden zwar auch die Typ I NKT-Zellen stimuliert, was durch die niedrigere Serum-Zytokin-Produktion in den  $\text{J}\alpha 281^{-/-}$  Mäusen, welche keine Typ I NKT-Zellen haben, gezeigt wird. Jedoch werden diese Zellen möglicherweise *in vivo* nicht direkt von der DZ, sondern indirekt über die Wechselwirkung mit  $\text{CD4}^+$  T-Zellen stimuliert. Dafür spricht, dass durch MHC II<sup>-/-</sup> DZ, welche nicht mit T-Zellen interagieren können, keine Serum-Zytokine induziert werden (101). Dies würde erklären, warum die Typ I NKT-Zellen *in vitro* nicht von der DZ allein stimuliert werden können.

Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass für die EAE-Protektion beide NKT-Zell-Typen wichtig sind. Dies zeigt sich dadurch, dass der EAE-Verlauf bei TNF-DZ-injizierten  $\text{CD1d}^{-/-}$  Mäusen, denen beide Typen fehlen, stärker ist als bei  $\text{J}\alpha 281^{-/-}$  Mäusen, denen nur die Typ I NKT-Zellen fehlen (101). Die Typ I NKT-Zellen scheinen indirekt über  $\text{CD4}^+$  T-Zellen stimuliert zu werden, während die Typ II NKT-Zellen direkt von einem endogenen Liganden auf der DZ stimuliert werden.

Zusammenfassend zeigt diese Arbeit, dass das inhibitorische Molekül B7-H1 auf der DZ eine wichtige regulatorische Funktion hat. In Abwesenheit dieses Moleküls ist das tolerogene Potential der DZ erhöht, was dadurch zustande kommt, dass speziell Typ II NKT-Zellen aktiviert werden. Das Verständnis der Funktion von kostimulatorischen bzw. koinhibitorischen Molekülen im Zusammenhang mit Autoimmunerkrankungen ist wichtig, um künftig neue Therapien zu entwickeln. Es zeigt sich, dass der B7-

H1/PD-1 Signalweg eine wichtige regulatorische Aufgabe bei einer möglichen DZ-Therapie für MS-Patienten hat.



**Abbildung 20: Schematische Darstellung der Regulation von T- und NKT-Zellen durch DZ**

Semireife, MOG beladene DZ präsentieren auf ihrer Oberfläche MOG-Peptid zusammen mit dem MHC II Molekül. Außerdem haben sie CD1d Moleküle auf der Oberfläche, welche Lipid-Antigene präsentieren. Sie präsentieren einen bisher unbekanntenen endogenen Liganden. Die DZ präsentiert den MOG/MHC II Komplex an die MOG-spezifische T-Zelle. Zum einen induziert sie Th2 Zellen, welche IL-4 und IL-13 produzieren, und Tr1 Zellen, welche IL-10 produzieren. Außerdem werden über einen endogenen Liganden, der in Kombination mit dem CD1d Molekül präsentiert wird, Typ II NKT-Zellen aktiviert, welche IL-4 und IL-13 produzieren. Diese Zytokine hemmen Th1 und Th17 Zellen, welche über die Zytokine IFN- $\gamma$  und IL-17 die EAE vermitteln. Die Stimulation der T- und NKT-Zellen wird von B7-H1 auf der DZ negativ reguliert. Fehlt dieses Molekül auf der DZ kommt es zu einer besseren Stimulation dieser Zellen. Es werden mehr protektive Zytokine von den T-Zellen und besonders von den NKT-Zellen gebildet, was die Produktion der pathogenen Zytokine reduziert.

## 5.2. MZ-B-Zellen tragen zur EAE-Protektion bei

Neben den DZ stellen auch MZ-B-Zellen einen Interaktionspartner für NKT-Zellen dar, da diese mehr CD1d exprimieren als DZ (131). Es gibt Hinweise darauf, dass MZ-B Zellen eine wichtige Rolle bei der Aktivierung von NKT-Zellen spielen (132). MZ-B-Zellen können  $\alpha$ -GalCer aufnehmen und anschließend NKT-Zellen aktivieren, was wiederum die Antikörper-Produktion durch B-Zellen fördert (133). Außerdem konnte gezeigt werden, dass MZ-B-Zellen die Stimulation von NKT-Zellen durch  $\alpha$ -GalCer-beladene DZ verbessern können (134).

Diese Arbeit belegt, dass MZ-B-Zellen ebenfalls an der EAE-Protektion durch DZ beteiligt sind. In CD22<sup>-/-</sup> Mäusen, welche eine Reduktion der MZ-B-Zellen aufweisen,



kann die EAE nicht durch Injektion von DZ verhindert werden. Die protektiven semireifen DZ, welche intravenös verabreicht werden, können nach kurzer Zeit in Kontakt mit MZ-B-Zellen treten. Bereits eine Stunde nach der Injektion gelangen die DZ über den Blutstrom in die MZ der Milz, wo sie mit den dort ansässigen MZ-B-Zellen kommunizieren können. Möglicherweise liegt der Beitrag der MZ-B-Zellen unter anderem darin, dass sie nötig sind um NKT-Zellen zu aktivieren. Es gibt Hinweise darauf, dass NKT-Zellen sich ebenfalls in der MZ der Milz befinden (135). Es wäre möglich, dass die DZ in der MZ zunächst auf die MZ-B-Zelle trifft, welche aktiviert wird und daraufhin an der Stimulation der NKT-Zelle beteiligt ist.

Hinweise für die Interaktion von MZ-B-Zellen, DZ und NKT liefern auch Daten vom ACAID-Modell (12). In diesem Modell werden Antigene wie OVA in das Auge injiziert und lösen daraufhin systemische Toleranz aus. Dabei wird das OVA im Auge von CD1d<sup>+</sup> F4/80<sup>+</sup> Makrophagen aufgenommen und in die MZ der Milz transportiert. Daraufhin werden NKT-Zellen ebenfalls in die MZ rekrutiert und bilden einen Komplex mit F4/80<sup>+</sup> APC und MZ-B-Zellen (136). Möglicherweise kommt es nach Injektion der MOG-beladenen DZ ebenfalls zur Ausbildung eines Komplexes mit MZ-B-Zellen und NKT-Zellen in der MZ der Milz.

Weiterführende Experimente sollen nun klären, ob es tatsächlich zur Ausbildung dieses Komplexes aus DZ, MZ-B-Zellen und NKT-Zellen kommt. Außerdem stellt sich die Frage, über welche Moleküle die DZ mit der MZ-B-Zelle interagiert und worin genau der Beitrag der MZ-B-Zelle bei der EAE-Protektion liegt.

### **5.3. Lipid-Antigene reifen DZ, welche wiederum T-Zellen aktivieren können**

Die Myelinscheide der Nervenzellen des ZNS bestehen größtenteils aus Glykolipiden, welche somit wichtige Antigene darstellen und bei der Entstehung von MS eine Rolle spielen können. Es gibt Hinweise, dass es während der MS zu Reaktionen von T-Zellen und Antikörpern gegen bestimmte Lipide kommt. Die Lipide werden von dem CD1-Molekül präsentiert (137) und dieses Molekül wird in MS-Läsionen und bei der EAE verstärkt exprimiert (138, 139). In dieser Arbeit wurde der Effekt ausgewählter Lipide auf DZ untersucht und es konnte gezeigt werden, dass Sulfatid, Cerebrosid, Gangliosid und GM1-Gangliosid zu einer Reifung der DZ führen, welche mit dem Zustand der semireifen DZ vergleichbar ist. Die DZ zeigen zwar im Bezug auf ihre Oberflächenmarker einen reifen Phänotyp mit erhöhter Expression von MHC II und

CD86, jedoch produzieren sie keine Zytokine wie IL-6 und IL-12p40. Sphingomyelin und Ceramid haben dagegen keinen Effekt auf die Reifung der DZ. Kultiviert man Sulfatid-, Cerebrosid-, Gangliosid- und GM1-Gangliosid-gereifte DZ zusammen mit Milz-Zellen, stimulieren sie die T-Zellen und regen deren Proliferation an.

Es gibt Arbeiten, die belegen, dass die oxidierte Form von Lipiden die Funktion und Reifung von DZ regulieren (140, 141). Diese Publikationen zeigen ebenso wie die Daten dieser Arbeit, dass durch die Behandlung von DZ mit oxidierten Phospholipiden die Expression von CD86 und MHC II erhöht wird und sie bestätigen ebenfalls, dass die Lipid-behandelten DZ in einer MLR T-Zellen stimulieren. Weiterhin zeigen die Arbeiten, dass die Stimulation der DZ über TLR-Signale durch die Behandlung mit oxidierten Phospholipiden inhibiert wird. Lipide und deren oxidierte Formen stellen somit wichtige Regulatoren der DZ-Reifung dar.

In der Zerebrospinalflüssigkeit von MS-Patienten können erhöhte Mengen von Lipid-spezifischen Antikörpern gefunden werden (94). Dabei ist auffällig, dass besonders Antikörper gegen oxidierte Formen vorhanden sind, zum Beispiel gegen  $3\beta$ -hydroxy- $5\alpha$ -cholestan-15-one, eine oxidierte Form von Cholesterol. Die Zusammensetzung der Myelin-Lipide bei MS-Patienten unterscheidet sich von der gesunder Menschen (142). Möglicherweise werden die Lipide im Verlauf der MS-Erkrankung verändert, zum Beispiel durch Stickstoffoxid, welches in den MS-Plaques vorhanden ist, und werden somit von Selbst-Antigenen zu Fremd-Antigenen, was Autoimmunreaktionen zur Folge hat. Ähnliches ist auch bei der Atherosklerose der Fall, wo oxidierte Lipide eine Rolle bei der Entzündung spielen (143).

Es konnte gezeigt werden, dass die Injektion von Sulfatid den Verlauf der EAE beeinflusst (94, 99). Dabei hat es je nach Art der Injektion unterschiedliche Effekte. Es stellt sich nun die Frage, ob die hier untersuchten Lipide den EAE-Verlauf verändern, wenn sie als Antigene mit dem Adjuvant verabreicht werden. Dabei wäre interessant, ob der Oxidationszustand einen Einfluss darauf hat. Außerdem soll in weiterführenden Arbeiten geklärt werden, ob die Lipid-gereiften DZ protektive Effekte in der EAE haben oder ob sie diese möglicherweise durch Aktivierung autoreaktiver T-Zellen verschlimmern. Es wäre weiterhin interessant, ob die DZ das Lipid über CD1d an NKT-Zellen präsentiert und somit NKT-Zell-Antworten moduliert.

#### **5.4. Neues Mausmodell zur Untersuchung von Viruserkrankungen und EAE**

Erste Experimente haben gezeigt, dass eine cerebrale Masern-Virus-Erkrankung zusammen mit EAE dramatische Auswirkungen auf Mäuse haben kann. Infizierte Tiere, denen das Masern-Virus direkt in das Gehirn injiziert wurde, verkraften die Infektion allein sehr gut und weisen keinerlei äußere Symptome auf. Allerdings ist bei diesen Tieren eine Neigung zu krampfartigen Anfällen festzustellen. Dies kann beobachtet werden, wenn die Tiere unter Stress geraten, zum Beispiel wenn man sie aus dem Käfig nimmt und sie festhält. Bei MS-Patienten können auch verstärkt epileptische Anfälle beobachtet werden (144).

Es sollte in dieser Arbeit untersucht werden, inwieweit diese Virus-Erkrankung den Verlauf der EAE beeinflusst. Es wurde vermutet, dass die Symptome bei den Tieren, die mit dem Virus infiziert sind, stärker werden. Man konnte jedoch beobachten, dass diese Tiere innerhalb von wenigen Tagen nach Induktion der EAE versterben. Eine mögliche Ursache dafür könnte sein, dass die Entzündung aufgrund der EAE-Induktion zu einer Aktivierung des Virus führt, oder möglicherweise ist aufgrund der Virus-Infektion die BHS geschädigt, was den Eintritt der autoreaktiven Zellen ins ZNS und somit die Schädigung im Gewebe beschleunigt.

Diese Kombination von Virus-Infektion und EAE verspricht ein gutes, neues Modell darzustellen, welches näher an die MS-Erkrankung des Menschen heran kommt, da beim MS-Patienten ebenfalls Virus-Erkrankungen vorkommen, welche vermutlich mit der Krankheit im Zusammenhang stehen. Außerdem stellt dieses Modell auch das Symptom der epileptischen Anfälle dar, welche bei MS-Patienten ebenfalls vorkommen.

Weiterführende Arbeiten sollen nun klären, wieso die Masern-Virus-infizierten Tiere nach der EAE-Induktion versterben. Es soll überprüft werden, ob diese Tiere eine erhöhte Anzahl von pathogenen Zellen im ZNS haben, welche die Axone schädigen. Außerdem soll untersucht werden, ob die Virus-Infektion die BHS beeinträchtigt. Des Weiteren soll eine mildere EAE induziert werden, welche die Tiere nicht tötet, um somit den EAE-Verlauf nach Masern-Infektion beobachten zu können.

## **6. Zusammenfassung**

Aus Vorarbeiten in der Arbeitsgruppe war bekannt, dass Mäuse durch Injektion von tolerogenen, TNF-gereiften und MOG-beladenen DZ vor EAE geschützt werden können.

Eines der Ziele dieser Arbeit war es zu untersuchen, ob das koinhibitorische Molekül B7-H1 auf der Oberfläche der DZ einen Einfluss auf das tolerogene Potential der DZ hat. Dazu wurden B7-H1-defiziente DZ generiert, mit TNF gereift, mit MOG-Peptid beladen und intravenös in Mäuse injiziert, bevor die EAE induziert wurde. Es zeigte sich, dass diese DZ die Tiere sogar noch besser vor der Krankheit schützen konnten als die WT DZ. Die Injektion der B7-H1<sup>-/-</sup> DZ bewirkte eine verstärkte Produktion von IL-10 and IL-13 nach Restimulation der Milz-Zellen *in vitro* und eine erhöhte Menge von protektiven Serum-Zytokinen (IL-4 und IL-13), welche von NKT-Zellen produziert wurden. Versuche mit CD1d<sup>-/-</sup> und Jα281<sup>-/-</sup> Mäusen haben ergeben, dass diese Zytokine von Typ II NKT-Zellen produziert wurden. Weitere Versuche mit Typ I und II NKT-Zell-Linien haben bestätigt, dass nur die Typ II NKT-Zellen von einem endogenen CD1d-Ligand der DZ stimuliert werden können. Außerdem wird dies über B7-H1 reguliert, da die NKT-Zell-Reaktion in Abwesenheit von B7-H1 stärker ist.

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass neben den NKT-Zellen MZ B-Zellen nötig sind, um die Mäuse vor der EAE-Entwicklung zu schützen. Versuche mit CD22<sup>-/-</sup> Mäusen, welche eine Reduktion in der MZ B-Zell-Population zeigen, haben ergeben, dass in Abwesenheit von MZ B-Zellen keine EAE-Protektion mehr möglich ist.

In dieser Arbeit wurde auch der Effekt von Glykolipid-Antigenen, welche einen Großteil der Myelinscheide des ZNS ausmachen, auf DZ untersucht. Ausgewählte Lipide führen zu einer Reifung der DZ, welche sich in der verstärkten MHC II- und CD86-Expression, jedoch nicht in der Produktion von Zytokinen äußert. Außerdem sind diese Lipid-gereiften DZ in der Lage T-Zellen zu stimulieren.

Als letzter Punkt wurde in dieser Arbeit der Zusammenhang zwischen Masern-Virus-Infektionen und EAE untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass eine cerebrale Masern-Infektion zusammen mit einer EAE-Induktion einen dramatischen Effekt auf die Tiere hat. Für diese Versuche wurde ein Maus-Modell einer persistierenden Masern-Infektion im Gehirn verwendet. Diese Tiere leben nach der Virus-Behandlung ohne Symptome. Nach der EAE-Induktion starben diese Tiere jedoch bereits wenige Tage später aufgrund einer MOG-Peptid-spezifischen Reaktion.

## **7. Summary**

From previous studies in our group it was known that tolerogenic, TNF-matured and MOG-loaded DC could protect mice from developing EAE.

One issue of this thesis was to investigate the effect of the co-inhibitory molecule B7-H1 on the tolerogenic potential of the DC. Therefore B7-H1-deficient DC were generated, matured with TNF, loaded with MOG peptide and injected intravenously before inducing EAE. It could be shown that the B7-H1<sup>-/-</sup> DC were even better in protecting mice from EAE. The injection of B7-H1<sup>-/-</sup> DC induced an increased production of IL-10 and IL-13 after restimulation of splenic cells *in vitro* and an increased amount of the protective serum-cytokines (IL-4 and IL-13) which were produced by NKT cells. Experiments with CD1d<sup>-/-</sup> and J $\alpha$ 281<sup>-/-</sup> mice showed that these cytokines were produced by Type II NKT cells. Further experiments with Type I and II NKT cell lines confirmed that only Type II NKT cells could be stimulated by an endogenous CD1d-Ligand on the DC. Furthermore this mechanism is regulated by B7-H1 because the NKT cell reaction is stronger in the absence of B7-H1.

This study also showed that besides the NKT cells the MZ B cells are necessary to protect mice from EAE. Experiments with CD22<sup>-/-</sup> mice which have a reduction in MZ B cells showed that EAE protection in the absence of MZ B cells is not possible.

Another issue of this work was to study the effect of glycolipid antigens on DC. These lipids are a major part of the myelin sheath of the CNS. Some lipids induce DC maturation which is indicated by an increased MHC II and CD86 expression but not by cytokine production. Furthermore these lipid-matured DC are able to stimulate T cells.

The last point of this study was to investigate the connection between measles virus infections and EAE. It could be shown that a cerebral measles infection together with EAE has a dramatic effect on the mice. For these experiments the mouse model of a persistent measles infection in the brain was used. These animals live without symptoms after treatment with the virus alone but after EAE induction these mice died rapidly because of a MOG specific reaction.

## **8. Literaturverzeichnis**

1. Janeway, C. A. T., P. 1997. *Immunologie*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg-Berlin-Oxford.
2. Steiniger, B., and P. Barth. 2000. Microanatomy and function of the spleen. *Advances in anatomy, embryology, and cell biology* 151:III-IX, 1-101.
3. Groom, A. C., E. E. Schmidt, and I. C. MacDonald. 1991. Microcirculatory pathways and blood flow in spleen: new insights from washout kinetics, corrosion casts, and quantitative intravital videomicroscopy. *Scanning microscopy* 5:159-173; discussion 173-154.
4. Drenckhahn, D., and J. Wagner. 1986. Stress fibers in the splenic sinus endothelium in situ: molecular structure, relationship to the extracellular matrix, and contractility. *The Journal of cell biology* 102:1738-1747.
5. Bratosin, D., J. Mazurier, J. P. Tissier, J. Estaquier, J. J. Huart, J. C. Ameisen, D. Aminoff, and J. Montreuil. 1998. Cellular and molecular mechanisms of senescent erythrocyte phagocytosis by macrophages. A review. *Biochimie* 80:173-195.
6. Knutson, M., and M. Wessling-Resnick. 2003. Iron metabolism in the reticuloendothelial system. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology* 38:61-88.
7. Sze, D. M., K. M. Toellner, C. Garcia de Vinuesa, D. R. Taylor, and I. C. MacLennan. 2000. Intrinsic constraint on plasmablast growth and extrinsic limits of plasma cell survival. *J Exp Med* 192:813-821.
8. Mebius, R. E., and G. Kraal. 2005. Structure and function of the spleen. *Nature reviews* 5:606-616.
9. Cyster, J. G., and C. C. Goodnow. 1995. Pertussis toxin inhibits migration of B and T lymphocytes into splenic white pulp cords. *J Exp Med* 182:581-586.
10. Attanavanich, K., and J. F. Kearney. 2004. Marginal zone, but not follicular B cells, are potent activators of naive CD4 T cells. *J Immunol* 172:803-811.
11. Balazs, M., F. Martin, T. Zhou, and J. Kearney. 2002. Blood dendritic cells interact with splenic marginal zone B cells to initiate T-independent immune responses. *Immunity* 17:341-352.
12. Stein-Streilein, J., and J. W. Streilein. 2002. Anterior chamber associated immune deviation (ACAID): regulation, biological relevance, and implications for therapy. *Int Rev Immunol* 21:123-152.
13. Martin, F., and J. F. Kearney. 2002. Marginal-zone B cells. *Nature reviews* 2:323-335.
14. Tedder, T. F., J. Tuscano, S. Sato, and J. H. Kehrl. 1997. CD22, a B lymphocyte-specific adhesion molecule that regulates antigen receptor signaling. *Annual review of immunology* 15:481-504.
15. Cyster, J. G., and C. C. Goodnow. 1997. Tuning antigen receptor signaling by CD22: integrating cues from antigens and the microenvironment. *Immunity* 6:509-517.
16. Nitschke, L., R. Carsetti, B. Ocker, G. Kohler, and M. C. Lamers. 1997. CD22 is a negative regulator of B-cell receptor signalling. *Curr Biol* 7:133-143.
17. Samardzic, T., D. Marinkovic, C. P. Danzer, J. Gerlach, L. Nitschke, and T. Wirth. 2002. Reduction of marginal zone B cells in CD22-deficient mice. *European journal of immunology* 32:561-567.
18. Lopes-Carvalho, T., and J. F. Kearney. 2004. Development and selection of marginal zone B cells. *Immunological reviews* 197:192-205.

19. Martin, F., A. M. Oliver, and J. F. Kearney. 2001. Marginal zone and B1 B cells unite in the early response against T-independent blood-borne particulate antigens. *Immunity* 14:617-629.
20. Ferguson, A. R., M. E. Youd, and R. B. Corley. 2004. Marginal zone B cells transport and deposit IgM-containing immune complexes onto follicular dendritic cells. *International immunology* 16:1411-1422.
21. Roark, J. H., S. H. Park, J. Jayawardena, U. Kavita, M. Shannon, and A. Bendelac. 1998. CD1.1 expression by mouse antigen-presenting cells and marginal zone B cells. *J Immunol* 160:3121-3127.
22. Makino, Y., R. Kanno, T. Ito, K. Higashino, and M. Taniguchi. 1995. Predominant expression of invariant V alpha 14+ TCR alpha chain in NK1.1+ T cell populations. *International immunology* 7:1157-1161.
23. Godfrey, D. I., H. R. MacDonald, M. Kronenberg, M. J. Smyth, and L. Van Kaer. 2004. NKT cells: what's in a name? *Nature reviews* 4:231-237.
24. Chen, H., H. Huang, and W. E. Paul. 1997. NK1.1+ CD4+ T cells lose NK1.1 expression upon in vitro activation. *J Immunol* 158:5112-5119.
25. Bendelac, A., O. Lantz, M. E. Quimby, J. W. Yewdell, J. R. Bennink, and R. R. Brutkiewicz. 1995. CD1 recognition by mouse NK1+ T lymphocytes. *Science (New York, N.Y)* 268:863-865.
26. Beckman, E. M., S. A. Porcelli, C. T. Morita, S. M. Behar, S. T. Furlong, and M. B. Brenner. 1994. Recognition of a lipid antigen by CD1-restricted alpha beta+ T cells. *Nature* 372:691-694.
27. Kawano, T., J. Cui, Y. Koezuka, I. Toura, Y. Kaneko, K. Motoki, H. Ueno, R. Nakagawa, H. Sato, E. Kondo, H. Koseki, and M. Taniguchi. 1997. CD1d-restricted and TCR-mediated activation of valpha14 NKT cells by glycosylceramides. *Science (New York, N.Y)* 278:1626-1629.
28. Lantz, O., and A. Bendelac. 1994. An invariant T cell receptor alpha chain is used by a unique subset of major histocompatibility complex class I-specific CD4+ and CD4-8- T cells in mice and humans. *J Exp Med* 180:1097-1106.
29. Cardell, S., S. Tangri, S. Chan, M. Kronenberg, C. Benoist, and D. Mathis. 1995. CD1-restricted CD4+ T cells in major histocompatibility complex class II-deficient mice. *J Exp Med* 182:993-1004.
30. Lutz, M. B., T. Berger, E. S. Schultz, and A. Steinkasserer. 2004. Dendritic Cells. In *Encyclopedia of molecular cell biology and molecular medicine*. R. A. Meyers, ed. Wiley-VHC, Weinheim. 213-237.
31. Sallusto, F., M. Cella, C. Danieli, and A. Lanzavecchia. 1995. 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* 182:389-400.
32. Albert, M. L., S. F. Pearce, L. M. Francisco, B. Sauter, P. Roy, R. L. Silverstein, and N. Bhardwaj. 1998. Immature dendritic cells phagocytose apoptotic cells via alphavbeta5 and CD36, and cross-present antigens to cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med* 188:1359-1368.
33. Medzhitov, R. 2001. Toll-like receptors and innate immunity. *Nature reviews* 1:135-145.
34. McGreal, E. P., J. L. Miller, and S. Gordon. 2005. Ligand recognition by antigen-presenting cell C-type lectin receptors. *Current opinion in immunology* 17:18-24.
35. Amigorena, S., and C. Bonnerot. 1999. Fc receptor signaling and trafficking: a connection for antigen processing. *Immunological reviews* 172:279-284.

36. Thery, C., and S. Amigorena. 2001. The cell biology of antigen presentation in dendritic cells. *Current opinion in immunology* 13:45-51.
37. Heath, W. R., and F. R. Carbone. 2001. Cross-presentation, dendritic cells, tolerance and immunity. *Annual review of immunology* 19:47-64.
38. Förster, R., A. Schubel, D. Breitfeld, E. Kremmer, I. Renner-Muller, E. Wolf, and M. Lipp. 1999. CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs. *Cell* 99:23-33.
39. Saeki, H., A. M. Moore, M. J. Brown, and S. T. Hwang. 1999. Cutting edge: secondary lymphoid-tissue chemokine (SLC) and CC chemokine receptor 7 (CCR7) participate in the emigration pathway of mature dendritic cells from the skin to regional lymph nodes. *J Immunol* 162:2472-2475.
40. Banchereau, J., and R. M. Steinman. 1998. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392:245-252.
41. Steinman, R. M., D. Hawiger, K. Liu, L. Bonifaz, D. Bonnyay, K. Mahnke, T. Iyoda, J. Ravetch, M. Dhodapkar, K. Inaba, and M. Nussenzweig. 2003. Dendritic cell function in vivo during the steady state: a role in peripheral tolerance. *Ann N Y Acad Sci* 987:15-25.
42. Lutz, M. B. 2006. Differentiation stages and subsets of tolerogenic dendritic cells. In *Handbook of Dendritic Cells. Biology, Diseases and Therapy*. M. B. Lutz, N. Romani, and A. Steinkasserer, eds. VCH-Wiley, Weinheim. 517-543.
43. Lutz, M. B., and G. Schuler. 2002. Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity? *Trends in immunology* 23:445-449.
44. Schwartz, R. H., D. L. Mueller, and M. K. Jenkins. 1989. T-cell clonal anergy. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 54:605-610.
45. Voigtlander, C., S. Rossner, E. Cierpka, G. Theiner, C. Wiethe, M. Menges, G. Schuler, and M. B. Lutz. 2006. Dendritic cells matured with TNF can be further activated in vitro and after subcutaneous injection in vivo which converts their tolerogenicity into immunogenicity. *J Immunother* 29:407-415.
46. Kyewski, B., and L. Klein. 2006. A central role for central tolerance. *Annual review of immunology* 24:571-606.
47. Kyewski, B., and J. Derbinski. 2004. Self-representation in the thymus: an extended view. *Nature reviews* 4:688-698.
48. Schwartz, R. H. 2003. T cell anergy. *Annual review of immunology* 21:305-334.
49. Pardoll, D. M. 2002. Spinning molecular immunology into successful immunotherapy. *Nature reviews* 2:227-238.
50. Greenwald, R. J., V. A. Boussiotis, R. B. Liorbach, A. K. Abbas, and A. H. Sharpe. 2001. CTLA-4 regulates induction of anergy in vivo. *Immunity* 14:145-155.
51. Ferber, I., G. Schonrich, J. Schenkel, A. L. Mellor, G. J. Hammerling, and B. Arnold. 1994. Levels of peripheral T cell tolerance induced by different doses of tolerogen. *Science (New York, N.Y)* 263:674-676.
52. Ju, S. T., D. J. Panka, H. Cui, R. Ettinger, M. el-Khatib, D. H. Sherr, B. Z. Stanger, and A. Marshak-Rothstein. 1995. Fas(CD95)/FasL interactions required for programmed cell death after T-cell activation. *Nature* 373:444-448.
53. Green, D. R., N. Droin, and M. Pinkoski. 2003. Activation-induced cell death in T cells. *Immunological reviews* 193:70-81.



54. Rossner, S., C. Voigtlander, C. Wiethe, J. Hanig, C. Seifarth, and M. B. Lutz. 2005. Myeloid dendritic cell precursors generated from bone marrow suppress T cell responses via cell contact and nitric oxide production in vitro. *European journal of immunology* 35:3533-3544.
55. Piccirillo, C. A., and E. M. Shevach. 2004. Naturally-occurring CD4+CD25+ immunoregulatory T cells: central players in the arena of peripheral tolerance. *Seminars in immunology* 16:81-88.
56. Roncarolo, M. G., R. Bacchetta, C. Bordignon, S. Narula, and M. K. Levings. 2001. Type 1 T regulatory cells. *Immunological reviews* 182:68-79.
57. Weiner, H. L. 2001. Induction and mechanism of action of transforming growth factor-beta-secreting Th3 regulatory cells. *Immunological reviews* 182:207-214.
58. Cottrez, F., and H. Groux. 2004. Specialization in tolerance: innate CD(4+)CD(25+) versus acquired TR1 and TH3 regulatory T cells. *Transplantation* 77:S12-15.
59. Hohlfeld, R. 2009. Multiple sclerosis: human model for EAE? *European journal of immunology* 39:2036-2039.
60. Oksenberg, J. R., and S. L. Hauser. 2005. Genetics of multiple sclerosis. *Neurologic clinics* 23:61-75, vi.
61. Olsson, T., and J. Hillert. 2008. The genetics of multiple sclerosis and its experimental models. *Current opinion in neurology* 21:255-260.
62. Abbott, N. J. 2002. Astrocyte-endothelial interactions and blood-brain barrier permeability. *Journal of anatomy* 200:629-638.
63. Toborek, M., Y. W. Lee, G. Flora, H. Pu, I. E. Andras, E. Wylegala, B. Hennig, and A. Nath. 2005. Mechanisms of the blood-brain barrier disruption in HIV-1 infection. *Cellular and molecular neurobiology* 25:181-199.
64. Hohlfeld, R. 1997. Biotechnological agents for the immunotherapy of multiple sclerosis. Principles, problems and perspectives. *Brain* 120 ( Pt 5):865-916.
65. McFarland, H. F., and R. Martin. 2007. Multiple sclerosis: a complicated picture of autoimmunity. *Nat Immunol* 8:913-919.
66. Ivanov, I., B. S. McKenzie, L. Zhou, C. E. Tadokoro, A. Lepelley, J. J. Lafaille, D. J. Cua, and D. R. Littman. 2006. The orphan nuclear receptor ROR $\gamma$  directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. *Cell* 126:1121-1133.
67. McGeachy, M. J., and D. J. Cua. 2008. Th17 cell differentiation: the long and winding road. *Immunity* 28:445-453.
68. Vaknin-Dembinsky, A., K. Balashov, and H. L. Weiner. 2006. IL-23 is increased in dendritic cells in multiple sclerosis and down-regulation of IL-23 by antisense oligos increases dendritic cell IL-10 production. *J Immunol* 176:7768-7774.
69. Traugott, U., E. L. Reinherz, and C. S. Raine. 1983. Multiple sclerosis: distribution of T cell subsets within active chronic lesions. *Science (New York, N.Y)* 219:308-310.
70. Junker, A., J. Ivanidze, J. Malotka, I. Eiglmeier, H. Lassmann, H. Wekerle, E. Meinl, R. Hohlfeld, and K. Dornmair. 2007. Multiple sclerosis: T-cell receptor expression in distinct brain regions. *Brain* 130:2789-2799.
71. Meinl, E., M. Krumbholz, and R. Hohlfeld. 2006. B lineage cells in the inflammatory central nervous system environment: migration, maintenance, local antibody production, and therapeutic modulation. *Annals of neurology* 59:880-892.

72. Hauser, S. L., E. Waubant, D. L. Arnold, T. Vollmer, J. Antel, R. J. Fox, A. Bar-Or, M. Panzara, N. Sarkar, S. Agarwal, A. Langer-Gould, and C. H. Smith. 2008. B-cell depletion with rituximab in relapsing-remitting multiple sclerosis. *The New England journal of medicine* 358:676-688.
73. Lassmann, H., W. Bruck, and C. Lucchinetti. 2001. Heterogeneity of multiple sclerosis pathogenesis: implications for diagnosis and therapy. *Trends in molecular medicine* 7:115-121.
74. Flynn, J. L., and J. Chan. 2001. Immunology of tuberculosis. *Annual review of immunology* 19:93-129.
75. Linthicum, D. S., J. J. Munoz, and A. Blaskett. 1982. Acute experimental autoimmune encephalomyelitis in mice. I. Adjuvant action of Bordetella pertussis is due to vasoactive amine sensitization and increased vascular permeability of the central nervous system. *Cellular immunology* 73:299-310.
76. Baxter, A. G. 2007. The origin and application of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Nature reviews* 7:904-912.
77. Steinman, L., and S. S. Zamvil. 2006. How to successfully apply animal studies in experimental allergic encephalomyelitis to research on multiple sclerosis. *Annals of neurology* 60:12-21.
78. Norrby, E. 1978. Viral antibodies in multiple sclerosis. *Progress in medical virology. Fortschritte der medizinischen Virusforschung* 24:1-39.
79. Haahr, S., M. Sommerlund, A. Moller-Larsen, R. Nielsen, and H. J. Hansen. 1991. Just another dubious virus in cells from a patient with multiple sclerosis? *Lancet* 337:863-864.
80. Garson, J. A., P. W. Tuke, P. Giraud, G. Paranhos-Baccala, and H. Perron. 1998. Detection of virion-associated MSR-V-RNA in serum of patients with multiple sclerosis. *Lancet* 351:33.
81. Perron, H., B. Lalande, B. Gratacap, A. Laurent, O. Genoulaz, C. Geny, M. Mallaret, E. Schuller, P. Stoeber, and J. M. Seigneurin. 1991. Isolation of retrovirus from patients with multiple sclerosis. *Lancet* 337:862-863.
82. Wandinger, K., W. Jabs, A. Siekhaus, S. Bubel, P. Trillenber, H. Wagner, K. Wessel, H. Kirchner, and H. Hennig. 2000. Association between clinical disease activity and Epstein-Barr virus reactivation in MS. *Neurology* 55:178-184.
83. Wucherpfennig, K. W., and J. L. Strominger. 1995. Molecular mimicry in T cell-mediated autoimmunity: viral peptides activate human T cell clones specific for myelin basic protein. *Cell* 80:695-705.
84. Ascherio, A., and K. L. Munger. 2007. Environmental risk factors for multiple sclerosis. Part I: the role of infection. *Annals of neurology* 61:288-299.
85. Lunemann, J. D., T. Kamradt, R. Martin, and C. Munz. 2007. Epstein-barr virus: environmental trigger of multiple sclerosis? *Journal of virology* 81:6777-6784.
86. DeLorenze, G. N., K. L. Munger, E. T. Lennette, N. Orentreich, J. H. Vogelstein, and A. Ascherio. 2006. Epstein-Barr virus and multiple sclerosis: evidence of association from a prospective study with long-term follow-up. *Archives of neurology* 63:839-844.
87. Cepok, S., D. Zhou, R. Srivastava, S. Nessler, S. Stei, K. Bussow, N. Sommer, and B. Hemmer. 2005. Identification of Epstein-Barr virus proteins as putative targets of the immune response in multiple sclerosis. *The Journal of clinical investigation* 115:1352-1360.

88. Bray, P. F., L. C. Bloomer, V. C. Salmon, M. H. Bagley, and P. D. Larsen. 1983. Epstein-Barr virus infection and antibody synthesis in patients with multiple sclerosis. *Archives of neurology* 40:406-408.
89. Munch, M., K. Riisom, T. Christensen, A. Moller-Larsen, and S. Haahr. 1998. The significance of Epstein-Barr virus seropositivity in multiple sclerosis patients? *Acta neurologica Scandinavica* 97:171-174.
90. Myhr, K. M., T. Riise, E. Barrett-Connor, H. Myrmed, C. Vedeler, M. Gronning, M. B. Kalvenes, and H. Nyland. 1998. Altered antibody pattern to Epstein-Barr virus but not to other herpesviruses in multiple sclerosis: a population based case-control study from western Norway. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 64:539-542.
91. Hollsberg, P., H. J. Hansen, and S. Haahr. 2003. Altered CD8+ T cell responses to selected Epstein-Barr virus immunodominant epitopes in patients with multiple sclerosis. *Clinical and experimental immunology* 132:137-143.
92. Lunemann, J. D., N. Edwards, P. A. Muraro, S. Hayashi, J. I. Cohen, C. Munz, and R. Martin. 2006. Increased frequency and broadened specificity of latent EBV nuclear antigen-1-specific T cells in multiple sclerosis. *Brain* 129:1493-1506.
93. Bellini, W. J., J. S. Rota, L. E. Lowe, R. S. Katz, P. R. Dyken, S. R. Zaki, W. J. Shieh, and P. A. Rota. 2005. Subacute sclerosing panencephalitis: more cases of this fatal disease are prevented by measles immunization than was previously recognized. *The Journal of infectious diseases* 192:1686-1693.
94. Kanter, J. L., S. Narayana, P. P. Ho, I. Catz, K. G. Warren, R. A. Sobel, L. Steinman, and W. H. Robinson. 2006. Lipid microarrays identify key mediators of autoimmune brain inflammation. *Nature medicine* 12:138-143.
95. Endo, T., D. D. Scott, S. S. Stewart, S. K. Kundu, and D. M. Marcus. 1984. Antibodies to glycosphingolipids in patients with multiple sclerosis and SLE. *J Immunol* 132:1793-1797.
96. Uhlig, H., and R. Dernick. 1989. Monoclonal autoantibodies derived from multiple sclerosis patients and control persons and their reactivities with antigens of the central nervous system. *Autoimmunity* 5:87-99.
97. Ilyas, A. A., Z. W. Chen, and S. D. Cook. 2003. Antibodies to sulfatide in cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis. *Journal of neuroimmunology* 139:76-80.
98. Shamshiev, A., A. Donda, I. Carena, L. Mori, L. Kappos, and G. De Libero. 1999. Self glycolipids as T-cell autoantigens. *European journal of immunology* 29:1667-1675.
99. Jahng, A., I. Maricic, C. Aguilera, S. Cardell, R. C. Halder, and V. Kumar. 2004. Prevention of autoimmunity by targeting a distinct, noninvariant CD1d-reactive T cell population reactive to sulfatide. *J Exp Med* 199:947-957.
100. Menges, M., S. Rossner, C. Voigtlander, H. Schindler, N. A. Kukutsch, C. Bogdan, K. Erb, G. Schuler, and M. B. Lutz. 2002. Repetitive injections of dendritic cells matured with tumor necrosis factor alpha induce antigen-specific protection of mice from autoimmunity. *J Exp Med* 195:15-21.
101. Wiethe, C., M. Schiemann, D. Busch, L. Haeberle, M. Kopf, G. Schuler, and M. B. Lutz. 2007. Interdependency of MHC II/self-peptide and CD1d/self-glycolipid presentation by TNF-alpha matured DC for protection from autoimmunity. *J. Immunol.* 178:4908-4916.
102. Gessner, A., and M. Rollinghoff. 2000. Biologic functions and signaling of the interleukin-4 receptor complexes. *Immunobiology* 201:285-307.

103. Yamazaki, T., H. Akiba, H. Iwai, H. Matsuda, M. Aoki, Y. Tanno, T. Shin, H. Tsuchiya, D. M. Pardoll, K. Okumura, M. Azuma, and H. Yagita. 2002. Expression of programmed death 1 ligands by murine T cells and APC. *J Immunol* 169:5538-5545.
104. Freeman, G. J., A. J. Long, Y. Iwai, K. Bourque, T. Chernova, H. Nishimura, L. J. Fitz, N. Malenkovich, T. Okazaki, M. C. Byrne, H. F. Horton, L. Fouser, L. Carter, V. Ling, M. R. Bowman, B. M. Carreno, M. Collins, C. R. Wood, and T. Honjo. 2000. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J Exp Med* 192:1027-1034.
105. Greenwald, R. J., G. J. Freeman, and A. H. Sharpe. 2005. The B7 family revisited. *Annual review of immunology* 23:515-548.
106. Chen, L. 2004. Co-inhibitory molecules of the B7-CD28 family in the control of T-cell immunity. *Nature reviews* 4:336-347.
107. Okazaki, T., and T. Honjo. 2006. The PD-1-PD-L pathway in immunological tolerance. *Trends in immunology* 27:195-201.
108. Latchman, Y. E., S. C. Liang, Y. Wu, T. Chernova, R. A. Sobel, M. Klemm, V. K. Kuchroo, G. J. Freeman, and A. H. Sharpe. 2004. PD-L1-deficient mice show that PD-L1 on T cells, antigen-presenting cells, and host tissues negatively regulates T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101:10691-10696.
109. Butte, M. J., M. E. Keir, T. B. Phamduy, A. H. Sharpe, and G. J. Freeman. 2007. Programmed death-1 ligand 1 interacts specifically with the B7-1 costimulatory molecule to inhibit T cell responses. *Immunity* 27:111-122.
110. Wang, S., J. Bajorath, D. B. Flies, H. Dong, T. Honjo, and L. Chen. 2003. Molecular modeling and functional mapping of B7-H1 and B7-DC uncouple costimulatory function from PD-1 interaction. *J Exp Med* 197:1083-1091.
111. Dong, H., G. Zhu, K. Tamada, and L. Chen. 1999. B7-H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion. *Nature medicine* 5:1365-1369.
112. Magnus, T., B. Schreiner, T. Korn, C. Jack, H. Guo, J. Antel, I. Ifergan, L. Chen, F. Bischof, A. Bar-Or, and H. Wiendl. 2005. Microglial expression of the B7 family member B7 homolog 1 confers strong immune inhibition: implications for immune responses and autoimmunity in the CNS. *J Neurosci* 25:2537-2546.
113. Martin-Orozco, N., Y. H. Wang, H. Yagita, and C. Dong. 2006. Cutting Edge: Programmed death (PD) ligand-1/PD-1 interaction is required for CD8+ T cell tolerance to tissue antigens. *J Immunol* 177:8291-8295.
114. Sharpe, A. H., E. J. Wherry, R. Ahmed, and G. J. Freeman. 2007. The function of programmed cell death 1 and its ligands in regulating autoimmunity and infection. *Nat Immunol* 8:239-245.
115. Carter, L. L., M. W. Leach, M. L. Azoitei, J. Cui, J. W. Pelker, J. Jussif, S. Benoit, G. Ireland, D. Luxenberg, G. R. Askew, K. L. Milarski, C. Groves, T. Brown, B. A. Carito, K. Percival, B. M. Carreno, M. Collins, and S. Marusic. 2007. PD-1/PD-L1, but not PD-1/PD-L2, interactions regulate the severity of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of neuroimmunology* 182:124-134.
116. Ortler, S., C. Leder, M. Mittelbronn, A. L. Zozulya, P. A. Knolle, L. Chen, A. Kroner, and H. Wiendl. 2008. B7-H1 restricts neuroantigen-specific T cell responses and confines inflammatory CNS damage: implications for the lesion

- pathogenesis of multiple sclerosis. *European journal of immunology* 38:1734-1744.
117. Salama, A. D., T. Chitnis, J. Imitola, M. J. Ansari, H. Akiba, F. Tushima, M. Azuma, H. Yagita, M. H. Sayegh, and S. J. Khoury. 2003. Critical role of the programmed death-1 (PD-1) pathway in regulation of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med* 198:71-78.
  118. Zhu, B., I. Guleria, A. Khosroshahi, T. Chitnis, J. Imitola, M. Azuma, H. Yagita, M. H. Sayegh, and S. J. Khoury. 2006. Differential role of programmed death-ligand 1 [corrected] and programmed death-ligand 2 [corrected] in regulating the susceptibility and chronic progression of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 176:3480-3489.
  119. Zal, T., A. Volkman, and B. Stockinger. 1994. Mechanisms of tolerance induction in major histocompatibility complex class II-restricted T cells specific for a blood-borne self-antigen. *J Exp Med* 180:2089-2099.
  120. Lutz, M. B., N. Kukulski, A. L. Ogilvie, S. Rossner, F. Koch, N. Romani, and G. Schuler. 1999. An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. *Journal of immunological methods* 223:77-92.
  121. Makowska, A., T. Kawano, M. Taniguchi, and S. Cardell. 2000. Differences in the ligand specificity between CD1d-restricted T cells with limited and diverse T-cell receptor repertoire. *Scand J Immunol* 52:71-79.
  122. Pyz, E., O. Naidenko, S. Miyake, T. Yamamura, I. Berberich, S. Cardell, M. Kronenberg, and T. Herrmann. 2006. The complementarity determining region 2 of BV8S2 (V beta 8.2) contributes to antigen recognition by rat invariant NKT cell TCR. *J Immunol* 176:7447-7455.
  123. Schubert, S., K. Moller-Ehrlich, K. Singethan, S. Wiese, W. P. Duprex, B. K. Rima, S. Niewiesk, and J. Schneider-Schaulies. 2006. A mouse model of persistent brain infection with recombinant Measles virus. *The Journal of general virology* 87:2011-2019.
  124. Schreiner, B., S. L. Bailey, T. Shin, L. Chen, and S. D. Miller. 2008. PD-1 ligands expressed on myeloid-derived APC in the CNS regulate T-cell responses in EAE. *European journal of immunology* 38:2706-2717.
  125. Zozulya, A. L., S. Ortler, J. Lee, C. Weidenfeller, M. Sandor, H. Wiendl, and Z. Fabry. 2009. Intracerebral dendritic cells critically modulate encephalitogenic versus regulatory immune responses in the CNS. *J Neurosci* 29:140-152.
  126. Zozulya, A. L., S. Ortler, Z. Fabry, M. Sandor, and H. Wiendl. 2009. The level of B7 homologue 1 expression on brain DC is decisive for CD8 Treg cell recruitment into the CNS during EAE. *European journal of immunology* 39:1536-1543.
  127. Parekh, V. V., M. T. Wilson, D. Olivares-Villagomez, A. K. Singh, L. Wu, C. R. Wang, S. Joyce, and L. Van Kaer. 2005. Glycolipid antigen induces long-term natural killer T cell anergy in mice. *The Journal of clinical investigation* 115:2572-2583.
  128. Chang, W. S., J. Y. Kim, Y. J. Kim, Y. S. Kim, J. M. Lee, M. Azuma, H. Yagita, and C. Y. Kang. 2008. Cutting edge: Programmed death-1/programmed death ligand 1 interaction regulates the induction and maintenance of invariant NKT cell anergy. *J Immunol* 181:6707-6710.
  129. Parekh, V. V., S. Lalani, S. Kim, R. Halder, M. Azuma, H. Yagita, V. Kumar, L. Wu, and L. V. Kaer. 2009. PD-1/PD-L blockade prevents anergy induction and enhances the anti-tumor activities of glycolipid-activated invariant NKT cells. *J Immunol* 182:2816-2826.

130. Matsuda, J. L., L. Gapin, J. L. Baron, S. Sidobre, D. B. Stetson, M. Mohrs, R. M. Locksley, and M. Kronenberg. 2003. Mouse V alpha 14i natural killer T cells are resistant to cytokine polarization in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100:8395-8400.
131. Dougan, S. K., A. Kaser, and R. S. Blumberg. 2007. CD1 expression on antigen-presenting cells. *Current topics in microbiology and immunology* 314:113-141.
132. Sonoda, K. H., and J. Stein-Streilein. 2002. CD1d on antigen-transporting APC and splenic marginal zone B cells promotes NKT cell-dependent tolerance. *European journal of immunology* 32:848-857.
133. Barral, P., J. Eckl-Dorna, N. E. Harwood, C. De Santo, M. Salio, P. Illarionov, G. S. Besra, V. Cerundolo, and F. D. Batista. 2008. B cell receptor-mediated uptake of CD1d-restricted antigen augments antibody responses by recruiting invariant NKT cell help in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105:8345-8350.
134. Bialecki, E., C. Paget, J. Fontaine, M. Capron, F. Trottein, and C. Faveeuw. 2009. Role of marginal zone B lymphocytes in invariant NKT cell activation. *J Immunol* 182:6105-6113.
135. Stetson, D. B., M. Mohrs, R. L. Reinhardt, J. L. Baron, Z. E. Wang, L. Gapin, M. Kronenberg, and R. M. Locksley. 2003. Constitutive cytokine mRNAs mark natural killer (NK) and NK T cells poised for rapid effector function. *J Exp Med* 198:1069-1076.
136. Faunce, D. E., K. H. Sonoda, and J. Stein-Streilein. 2001. MIP-2 recruits NKT cells to the spleen during tolerance induction. *J Immunol* 166:313-321.
137. Moody, D. B., D. M. Zajonc, and I. A. Wilson. 2005. Anatomy of CD1-lipid antigen complexes. *Nature reviews* 5:387-399.
138. Battistini, L., F. R. Fischer, C. S. Raine, and C. F. Brosnan. 1996. CD1b is expressed in multiple sclerosis lesions. *Journal of neuroimmunology* 67:145-151.
139. Busshoff, U., A. Hein, A. Iglesias, R. Dorries, and A. Regnier-Vigouroux. 2001. CD1 expression is differentially regulated by microglia, macrophages and T cells in the central nervous system upon inflammation and demyelination. *Journal of neuroimmunology* 113:220-230.
140. Bluml, S., S. Kirchberger, V. N. Bochkov, G. Kronke, K. Stuhlmeier, O. Majdic, G. J. Zlabinger, W. Knapp, B. R. Binder, J. Stockl, and N. Leitinger. 2005. Oxidized phospholipids negatively regulate dendritic cell maturation induced by TLRs and CD40. *J Immunol* 175:501-508.
141. Bluml, S., G. Zupkowitz, S. Kirchberger, M. Seyerl, V. N. Bochkov, K. Stuhlmeier, O. Majdic, G. J. Zlabinger, C. Seiser, and J. Stockl. 2009. Epigenetic regulation of dendritic cell differentiation and function by oxidized phospholipids. *Blood* 114:5481-5489.
142. Alling, C., M. T. Vanier, and L. Svennerholm. 1971. Lipid alterations in apparently normal white matter in multiple sclerosis. *Brain research* 35:325-336.
143. Chisolm, G. M., and D. Steinberg. 2000. The oxidative modification hypothesis of atherogenesis: an overview. *Free radical biology & medicine* 28:1815-1826.
144. Spatt, J., R. Chaix, and B. Mamoli. 2001. Epileptic and non-epileptic seizures in multiple sclerosis. *Journal of neurology* 248:2-9.

## **9. Abkürzungsverzeichnis**

Abb.	Abbildung
ACAID	”anterior chamber associated immune deviation“
APZ	antigenpräsentierende Zelle
BHS	Blut-Hirn-Schranke
BZR	B-Zell-Rezeptor
CFA	komplettes Freudsches Adjuvant
CFSE	Carboxy Fluoroscein Succinimidyl Ester
Ci	Curie
CNS	”central nervous system“
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
cpm	”counts per minute“ (Zahl der Zerfälle pro Minute)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DZ, DC	Dendritische Zelle, ”dendritic cell“
EAE	Experimentelle Autoimmun-Enzephalomyelitis
EBV	Epstein-Barr Virus
E.coli	Escherichia coli
ELISA	”enzyme-linked-immunoabsorbent-assay“
FACS	”fluorescence-activated cell sorting“
FKS	fötales Kälberserum
GalCer	Galactosylceramid
GM-CSF	”granulocyte-macrophage colony stimulating factor“ (Granulozyten-Makrophagen-koloniestimulierender Faktor)
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
i.v.	intravenös
LPS	Lipopolysaccharid
M	Mol = mol/Liter
MBP	Myelin Basisches Protein
MHC	”major histocompatibility complex“ (Haupthistokompatibilitätskomplex)

## Abkürzungsverzeichnis

---

MLR	“mixed lymphocyte reaction“
MOG	Myelin Oligodendrozyten Glykoprotein
MS	Multiple Sklerose
MZ	Marginalzone
OVA	Ovalbumin
PBS	“phosphate buffer saline“ (Phosphatpuffer)
pfu	“plaque forming unit“
rpm	“rounds per minute“ (Umdrehungen pro minute)
TGF- $\beta$	“Tumor growth factor“ $\beta$
Th1	T-Helfer 1
Th2	T-Helfer 2
Th17	T-Helfer 17
TLR	“toll-like recetor“
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor $\alpha$
Treg	regulatorische T-Zelle
TZR	T-Zell-Rezeptor
U	Unit (Enzymeinheit)
WT	Wildtyp
ZNS	zentrales Nervensystem



## **10. Veröffentlichungen**

### **10.1. Wissenschaftliche Originalveröffentlichung**

#### **B7-H1-deficiency enhances the potential of tolerogenic dendritic cells by activating CD1d-restricted type II NKT cells**

Carolin Brandl, Sonja Ortler, Thomas Herrmann, Susanna Cardell, Manfred B. Lutz, Heinz Wiendl, PLoS One. 2010 May, 5 (5): e10800

### **10.2. Posterpräsentationen**

#### **Induction of Tolerance by TNF-matured Wildtype and PD-L1<sup>-/-</sup> Dendritic Cells in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE)**

Carolin Brandl, Sonja Ortler, Heinz Wiendl and Manfred B. Lutz  
Joint Annual Meeting of Immunology, Wien, 3. - 6. September 2008

#### **B7-H1 expression on dendritic cells negatively regulates MHC II- and CD1d-restricted CD4<sup>+</sup> T cells but not invariant NKT cells**

Carolin Brandl, Sonja Ortler, Heinz Wiendl and Manfred B. Lutz  
2nd European Congress of Immunology, Berlin, 13. - 16. September 2009

## **11. Lebenslauf**

### **Persönliche Daten:**

Name: Carolin Brandl, geb. Geus  
Geburtstag: 21.12.1981  
Geburtsort: Erlangen  
Wohnort: Erlangen, Luitpoldstr. 54  
Familienstand: verheiratet  
Staatsangehörigkeit: deutsch

### **Schulbildung:**

09/88- 07/90: Grundschule Murcia, Spanien  
09/90- 07/92: Grundschule Erlangen  
09/92- 07/01: Albert-Schweitzer-Gymnasium Erlangen

### **Studium:**

10/01- 10/06: Studium der Biologie an der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg, Abschluss mit der Diplomarbeit bei Prof. Dr. Lars Nitschke am Institut für Genetik der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg, Thema: „Herstellung von embryonalen Stammzellen mit Mutation im CD22-Gen“

### **Berufliche Tätigkeit:**

10/06- 12/06: Tätigkeit als wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Genetik der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg

### **Promotion:**

01/07- heute: Doktorarbeit bei Prof. Dr. Manfred Lutz am Institut für Virologie und Immunbiologie der Julius-Maximilians-Universität Würzburg

### **Danksagung**

Besonders möchte ich mich bei Prof. Dr. Manfred Lutz für die Bereitstellung des interessanten Promotionsthemas, für die Ermöglichung dieser Arbeit und für die gute Betreuung und Unterstützung während der Doktorarbeit danken.

Außerdem bedanke ich mich bei Prof. Dr. Roy Gross für die Erstellung des Zweitgutachtens und für die Betreuung dieser Arbeit seitens der Naturwissenschaftlichen Fakultät.

Weiterhin möchte ich mich bei der gesamten Arbeitsgruppe Lutz für die angenehme Atmosphäre im Labor (und in den vielen Kaffeepausen☺) bedanken.

Außerdem danke ich Heinz Wiendl, Sonja Ortler, Jürgen Schneider-Schaulies und Dajana Reuter für die Zusammenarbeit.

Besonderer Dank gilt meiner Mutter und meinem Ehemann für die Unterstützung und das Verständnis während der gesamten Zeit.

**Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation in allen Teilen selbstständig angefertigt und keine anderen als die genannten Hilfsmittel und Quellen benutzt habe.

Ich erkläre außerdem, dass die vorliegende Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form in einem Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Ich habe bisher, außer den mit dem Zulassungsgesuch urkundlichen Graden, keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht.

Würzburg, den

.....

Carolin Brandl