

CD8⁺ Lymphozyten medierter Angriff auf Neuronen des ZNS: Relevanz von Granzym B und Perforin für akute elektrophysiologische Veränderungen

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



vorgelegt von
Alexander Michael Herrmann
aus Oberharmersbach

Münster 2014

Erklärung

Hiermit erkläre ich ehrenwörtlich, die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Diese Arbeit hat weder in gleicher noch in ähnlicher Form in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen.

Ich habe in keinem früheren Verfahren einen akademischen Titel erworben oder zu erwerben versucht.

.....

Münster, Oktober 2014

Eingereicht am:

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender:

Gutachter: Prof. Dr. Heinz Wiendl

Gutachter: Priv.-Doz. Dr. Vladimir Soukhoroukov

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

- Meinen Eltern -
Elisabeth und Eugen

The moment became a longer moment, and suddenly it was a very long moment,
so long one could hardly tell where all the time was coming from.

Douglas Adams

| | | |
|----------|---|----|
| 1 | Einleitung | 1 |
| 1.1 | Erläuterung der Rolle von CD8 ⁺ T-Zellen in verschiedenen entzündlichen und neuro-degenerativen Erkrankungen des ZNS | 1 |
| 1.2 | Mechanismen der Antigen-Präsentation, klonalen Expansion und CD8 ⁺ T-Zell-Migration | 7 |
| 1.3 | CD8 ⁺ T-Zell-Reaktivierung, klonale Expansion und Migration in das ZNS-Parenchym | 10 |
| 1.4 | Kontrolle der Immunzellen durch das ZNS-Parenchym mittels Regulation von MHC-I-Molekülen und der Regulation von T-Zell-inhibierenden Molekülen auf den Zielzellen | 12 |
| 1.5 | CD8 ⁺ T-Zell-Einwanderung in das ZNS und die Suche nach antigen-präsentierenden Zielzellen | 14 |
| 1.6 | Ausbildung der immunologischen Synapse zwischen CD8 ⁺ T-Zellen und ihren Zielzellen | 16 |
| 1.7 | Mechanismen der unspezifischen Zell-Schädigung durch CD8 ⁺ T-Zellen | 19 |
| 1.8 | Unterschiedliche Angriffspunkte von CD8 ⁺ T-Zellen auf Neuronen des ZNS und mögliche Folgen | 21 |
| 1.9 | Ziel der Arbeit | 23 |
| 2 | Material und Methoden | 26 |
| 2.1 | Material | 26 |
| 2.1.1 | Geräte | 26 |
| 2.1.2 | Verbrauchsmaterialien | 27 |
| 2.1.3 | Chemikalien | 27 |
| 2.1.4 | Puffer und Lösungen | 28 |
| 2.1.5 | Biochemikalien, Medien und Supplemente | 29 |
| 2.2 | Tierexperimentelle Methoden | 30 |
| 2.3 | OT-I Maus-System | 30 |
| 2.4 | Aktivierung und Stimulation von T-Lymphozyten | 31 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 2.5 | Präparation embryonaler Hippocampus-Neuronen..... | 32 |
| 2.6 | Immunhistochemie von neuronalen Zellkulturen..... | 33 |
| 2.7 | Charakterisierung neuronaler Zellkulturen mit Propidium-Iodid | 35 |
| 2.8 | Immunhistochemische Charakterisierung von T-Lymphozyten..... | 36 |
| 2.9 | Elektrophysiologie | 36 |
| 2.10 | <i>Patch-Clamp</i> -Ableitungen in primären Neuronen-kulturen | 39 |
| 2.11 | Kalzium-Imaging mittels 2-Photonen-Mikroskopie..... | 42 |
| 2.12 | Charakterisierung der OT-I T-Lymphozyten sowie der Granzym B- und Perforin-defizienten OT-I T-Lymphozyten mit Hilfe der Durchflusszytometrie.... | 43 |
| 2.13 | INF- γ ELISA..... | 44 |
| 2.14 | ^3H Thymidin-Inkorporationsassay | 44 |
| 2.15 | Elektrophysiologische Ableitung extrazellulärer Potentiale im Neuronennetzwerk mittels eines Multi-Elektroden-Arrays | 45 |
| 3 | Ergebnisse | 47 |
| 3.1 | Charakterisierung der Vitalität von murinen primären Hippocampus-Neuronen..... | 47 |
| 3.2 | Expression von MHC-I auf murinen Neuronen nach IFN- γ Stimulation.... | 48 |
| 3.3 | Antigen-abhängiger Effekt von OT-I T-Lymphozyten gegenüber murinen Hippocampus-Neuronen..... | 49 |
| 3.4 | Morphologischer Einfluss durch IFN- γ Stimulation und MHC-I Beladung mit OVA auf primären murine Hippocampus-Neuronen | 52 |
| 3.5 | Änderung passiver elektrophysiologischer Parameter in Neuronen nach Zell-Zellkontakt mit OT-I Lymphozyten | 55 |
| 3.6 | Charakterisierung der OT-I Lymphozyten | 58 |
| 3.7 | Änderung passiver elektrophysiologischer Parameter in Neuronen nach direktem Zell-Zellkontakt mit Perforin-defizienten und Granzym B-defizienten OT-I Zellen..... | 59 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 3.8 | Neuronale Apoptose und Membranwiderstands Effekte nach Interaktion von OT-I FasL mit neuronalem Fas Rezeptor | 61 |
| 3.9 | Antigen- und Perforin-abhängiger Kalziumeinstrom in Neurone nach direktem OT-I-Zellkontakt..... | 63 |
| 3.10 | Einfluss auf die Neuronen Apoptose durch die Reduktion des Membranwiderstandes mittels porenformende Agenzien..... | 66 |
| 3.11 | Auswirkungen der antigen-abhängige Interaktion von Neuronen und zytotoxischen T-Zellen auf die neuronale Netzwerkaktivität..... | 68 |
| 4 | Diskussion | 71 |
| 4.1 | Methodenkritische Aspekte..... | 71 |
| 4.2 | Morphologische und funktionelle Charakterisierung der verwendeten Zellmodelle..... | 72 |
| 4.3 | Zytotoxische Effekte von TZR transgenen CD8 ⁺ OT-I T-Zellen auf primäre murine Hippocampus-Neurone | 74 |
| 4.4 | Beteiligung Perforin- und Granzym B beinhaltender zytotoxischer Granula an der OT-I-vermittelten neuronalen Apoptose | 75 |
| 4.5 | Elektrophysiologische Charakterisierung von murinen Neuronen während des direkten Kontakts mit zytotoxischen CD8 ⁺ T-Zellen..... | 76 |
| 4.6 | Die Rolle von Perforin und Granzym B bei der Antigen-abhängigen Änderung von passiven elektrischen Parametern von Neuronen..... | 78 |
| 4.7 | Antigen-abhängiger Einfluss von OT-I Zellen auf elektrische Parameter in einem neuronalen Netzwerk..... | 80 |
| 4.8 | Antigen-abhängiger ZTL-Effekt und die Rolle von Perforin auf den intrazellulären Kalziumhaushalt primärer Neurone..... | 81 |
| 4.9 | Vergleich der Membranleitfähigkeit nach direktem OT-I-Kontakt mit einem theoretischen Modell der Leitfähigkeit von Perforin-haltigen Poren | 82 |
| 5 | Zusammenfassung | 84 |
| 5.1 | Abstract | 86 |
| 6 | Literatur | 88 |

| | | |
|----------|------------------------------------|-----|
| 7 | Abkürzungsverzeichnis | 100 |
| 8 | Danksagung | 102 |
| 9 | Lebenslauf | 103 |
| 9.1 | Eigene Publikationen | 105 |
| 9.2 | Konferenz Beiträge | 108 |

1 Einleitung

Zytotoxischen $CD8^+$ T-Lymphozyten (ZTL) wird in den letzten Jahren vermehrt eine Schlüsselrolle in verschiedenen entzündlichen Erkrankungen des zentralen Nervensystem (ZNS) infektiösen, autoimmunen oder paraneoplastischen Ursprungs zugeschrieben. Beispiele hierfür beinhalten Erkrankungen wie die Multiple Sklerose (MS), virale Enzephalitiden, die Rasmussen Enzephalitis (RE) und die paraneoplastische Cerebellitis. Darüber hinaus scheinen $CD8^+$ T-Zellen auch in primär neurodegenerativen ZNS-Erkrankungen wie der amyotrophen Lateralsklerose (ALS), der Parkinson-Erkrankung oder beim Morbus Alzheimer eine wichtige Rolle zu spielen. Es wird angenommen, dass $CD8^+$ T-Zellen in diesen Erkrankungen Neurone auf verschiedenen Wegen schädigen können.

Zum Einen können ZTL direkt Neurone und deren Neuriten als Zielstruktur erkennen und in der Folge zu deren Schädigung führen (Liblau et al., 2013). Zum Anderen können $CD8^+$ T-Zellen eine Schädigung der Myelinschicht und der Oligodendrozyten (ODZ) sowohl in der grauen als auch in der weißen Substanz hervorrufen und somit letztendlich „kollateralen“ neuronalen Schaden verursachen.

1.1 Erläuterung der Rolle von $CD8^+$ T-Zellen in verschiedenen entzündlichen und neurodegenerativen Erkrankungen des ZNS

Die Relevanz von $CD8^+$ T-Zellen in der Pathogenese der MS hat sich in den letzten Jahren abgezeichnet. Sowohl in akuten als auch in chronischen Läsionen der weißen Substanz, konnten deutlich mehr zytotoxische $CD8^+$ T-Zellen im Vergleich zu $CD4^+$ T-Zellen gefunden werden. Während $CD4^+$ T-Lymphozyten vor

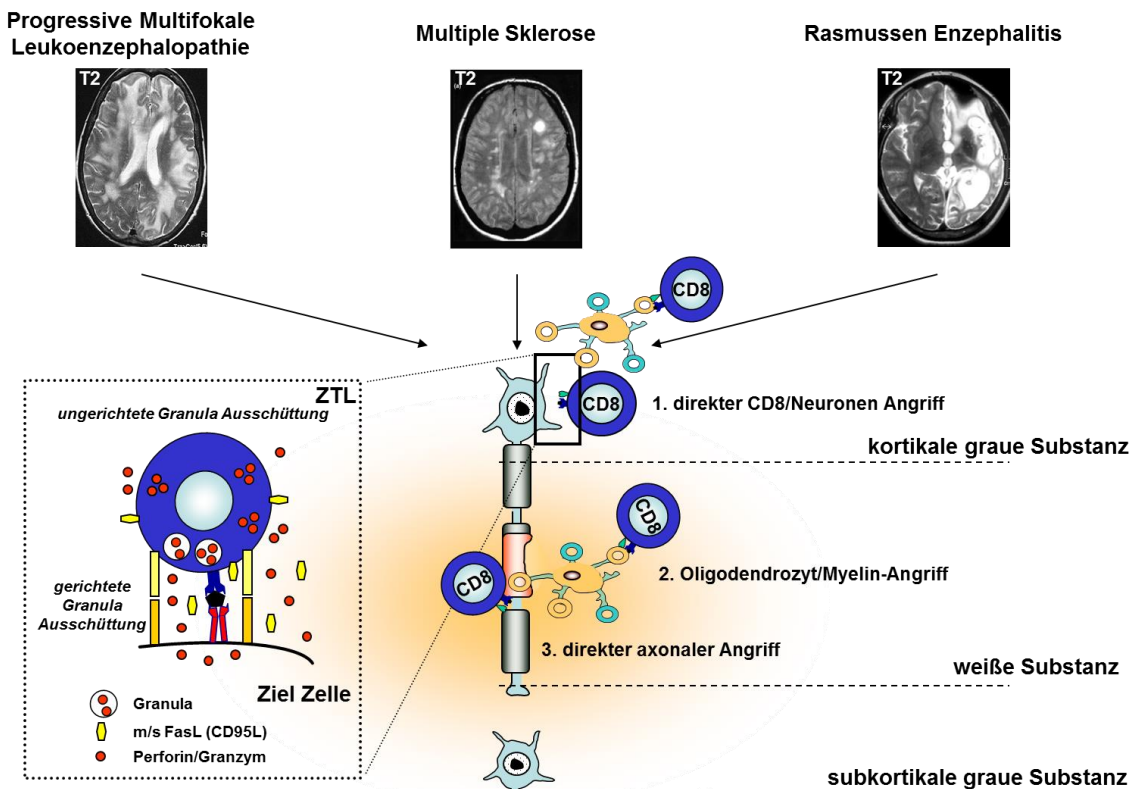
allem eher im perivaskulären Raum zu finden sind (Booss et al., 1983, Hauser et al., 1986), werden CD8⁺ T-Zellen vor allem im Parenchym gefunden. Die Degeneration der Myelinscheiden und der ODZ wird als Schlüsselereignis in der Pathogenese der MS angesehen. CD8⁺ T-Zellen sind in der Lage Oberflächenstrukturen der von ODZ gebildeten Myelinscheiden zu erkennen. Dementsprechend können CD8⁺ T-Lymphozyten in der Nähe von ODZ und destrukturierter Myelinscheiden gefunden werden. Darüber hinaus zeigen diese Zellen oligoklonale Expansionen im ZNS, aber auch im Liquor und im peripheren Blut.

Axonaler Schaden in Läsionen der weißen Substanz korreliert mit der Anzahl von CD8⁺ T-Zellen (Bitsch et al., 2000, Kuhlmann et al., 2002), aktivierten Makrophagen sowie Mikroglia (Ferguson et al., 1997). Zudem konnte gezeigt werden, dass Neurone und alle anderen Zellen des ZNS innerhalb von Läsionen eine ausgeprägte Expression des Haupthistokompatibilitäts-Komplex-Klasse-I (MHC-I) zeigen (Hoftberger et al., 2004). Insgesamt legen diese Beobachtungen nahe, dass CD8⁺ T-Zellen als Effektorzellen sowohl zum Untergang bei ODZ und Myelin als auch an der direkten axonalen Schädigung beteiligt sind. Im Unterschied zu den Beobachtungen in der weißen Substanz, findet man in Läsionen der grauen Substanz wesentlich geringere T-Zell Infiltrate. Ein möglicher Grund hierfür könnte die geringere Dichte von Myelin- und/oder ODZ-Antigenen sein (Peterson et al., 2001). Jedoch konnten auch in Läsionen der grauen Substanz eine größere Anzahl von CD8⁺ T-Zellen im Vergleich zu CD4⁺ T-Zellen gefunden werden (Bo et al., 2003). Auch in diesen Läsionen gehen Demyelinisierung und der Untergang von ODZ mit der Schädigung von Axonen und Neuriten der Reduktion der synaptischen Dichte und somit apoptotischen Veränderungen der Neurone einher (Peterson et al., 2001, Stadelmann et al., 2008).

Auch in verschiedenen viralen Enzephalitiden scheinen CD8⁺ T-Zellen wichtige Aufgaben zu übernehmen. Unter diesen Bedingungen sind CD8⁺ T-Zellen in entzündlichen Läsionen des ZNS in der weißen und grauen Substanz, in einer engen räumlichen Nähe zu Neuronen zu finden. Dabei attackieren sie entweder bereits mit Viren infizierte Neurone, um diese zu eliminieren oder erhalten die virale Latenz ohne die infizierten Neurone dabei zu zerstören. Aktivierte CD8⁺ T-Zellen weisen eine hohe Expression der Effektormoleküle Granzym B und Perforin

auf (Petito et al., 2003, Petito et al., 2006). Zusätzlich zu dem direkten zytotoxischen Effekt von CD8⁺ T-Zellen auf die virus-infizierten Neurone, konnte kollateraler neuronaler Schaden nach CD8⁺ T-Zell vermittelter Apoptose von ODZ nachgewiesen werden. Bei der progressiven multifokalen Leukenzephalopathie (PML) wird angenommen, dass latente Infektionen der ODZ und zu einem geringen Anteil auch der Astrozyten durch den JC- oder den SV40-Virus virulent werden, nachdem die normale Immunosurveillance des ZNS zusammenbricht. In diesen entzündlichen Läsionen akkumulieren CD8⁺ T-Lymphozyten nahe der infizierten ODZ und auch Astrozyten, welche eine deutliche MHC-I-Expression zeigen. Auch wird davon ausgegangen, dass die CD8⁺ T-Zellen zum Untergang der ODZ beitragen, um eine Ausbreitung des Virus zu vermeiden (Perez-Liz et al., 2008, White et al., 1992). Durch die daraus resultierende Demyelinisierung der Axone kommt es somit zu einer indirekten Schädigung der Neuronen in der weißen und grauen Substanz (Moll et al., 2008).

Abbildung 1.1



Direkte und indirekte neuronale Schädigung durch CD8⁺ T-Zellen bei entzündlichen ZNS-Erkrankungen. (A) Beispiele für Erkrankungen mit direkter und indirekter Schädigung von Neuronen unter Beteiligung von CD8⁺ T-Zellen. In der PML (links) und der MS (Mitte) werden Neurone indirekt durch die CD8⁺ T-Zelle geschädigt, nachdem diese zum Untergang von ODZ und damit der Myelinscheiden geführt hat. Hingegen werden in der RE (rechts) die Neurone und Astrozyten direkt durch CD8⁺ T-Zellen angegriffen. (B) CD8⁺ T-Zellen schädigen Neurone entweder direkt am Soma, an den Neuriten oder indirekt durch Schädigung der ODZ und der Myelinscheide in der grauen und weißen Substanz. (Kasten) Interaktion zwischen einer CD8⁺ T-Zelle und ihrer Zielzelle. Über den T-Zell-Rezeptor (TZR, blau) erkennt die CD8⁺ T-Zelle ihr passendes Antigen, das über das MHC-I Molekül (rot) der Zielzelle präsentiert wird. Dies führt zur Ausbildung einer immunologischen Synapse (IS) unter Bildung eines trimolekularen Komplexes durch die Beteiligung der LFA1/ICAM-I (gelb) Interaktion. In der Folge schütten CD8⁺ T-Zellen die zytotoxischen Granula Perforin und Granzym (rote Punkte), gerichtet in die IS oder ungerichtet in die direkte Zellumgebung aus. Das ungerichtete Ausschütten der Granula führt zu kollateralen Zellschäden der direkt umgebenden Zellen. CD8⁺ T-Zellen können zusätzlich auch über gerichtete und ungerichtete Ausschüttung von löslichen FasL Molekülen (gelb) Zelltod in der Zielzelle oder den umgebenden Zellen hervorrufen. Membrangebundene Fas-Rezeptoren binden die löslichen FasL-Moleküle und lösen dadurch Apoptose in der Zielzelle aus. Grafik modifiziert nach (Melzer et al., 2009).

Die RE ist ein klassisches Beispiel für eine CD8⁺ T-Zell-assoziierte und MHC-I-vermittelte Enzephalitis. Patienten mit dieser Erkrankung weisen Entzündungen des ZNS auf, die sich auf eine Gehirnhemisphäre beschränken. Dementsprechend leiden die Patienten typischerweise an einer fokalen Epilepsie. In der betroffenen

Hemisphäre werden vor allem CD8⁺ T-Zellen, sowie ein substantieller Untergang von Neuronen und Astrozyten gefunden. In diesen Regionen zeigen CD8⁺ T-Lymphozyten eine auffällige räumliche Nähe zu MHC-I-Molekülen, die auf dem Perikaryon von Neuronen exprimiert werden (Bien et al., 2002). Diese Lymphozyten weisen eine polare Ausrichtung ihrer zytotoxischen Granula in Richtung der neuronalen Plasmamembran auf. Neurone in diesem Bereich zeigen einen gestörten axonalen Transport mit der Akkumulation von Neurofilamenten in Perikarya und Zeichen der Apoptose, wie dekondensierte Zellkerne und die Aktivierung von Caspase-3 (Bien et al., 2002). Interessanterweise, konnten keine Veränderungen von ODZ und der Myelinschicht in dieser Region gefunden werden. Hingegen konnte gezeigt werden, dass Astrozyten in der RE ebenfalls als Zielzellen von CD8⁺ T-Lymphozyten in Frage kommen (Bauer et al., 2007). Innerhalb des ZNS, aber auch in der Peripherie weisen CD8⁺ T-Zellen in der RE klonale Perturbationen auf. Darüber hinaus zeigen CD8⁺ T-Zellen in RE-Läsionen ein begrenztes T-Zell-Rezeptor (TZR) –Repertoire auf (Li et al., 1997, Schwab et al., 2009). Diese Auffälligkeit resultiert wahrscheinlich daraus, dass sich diese Zellen aus einer begrenzten Anzahl von Vorläuferzellen innerhalb des ZNS entwickelt haben. Darüber hinaus, persistieren diese Klone über die Zeit im ZNS und partiell auch im peripheren Blutkreislauf. Weiter konnte gezeigt werden, dass die Verteilung der T-Zell-Klone eine Korrelation mit dem Krankheitsverlauf von RE-Patienten aufweisen. Dieser Umstand legt nahe, dass CD8⁺ T-Zellen als Schlüsselemente in der RE fungieren.

Ein weiteres Beispiel für eine mögliche Rolle von CD8⁺ T-Zellen auch in neurodegenerativen Erkrankungen ist die paraneoplastische Kleinhirndegeneration. Diese Erkrankung ist durch einen CD8⁺ T-Zell-vermittelten Untergang von Purkinje-Neuronen gekennzeichnet. Hierbei erkennen CD8⁺ T-Zellen das auf Tumorzellen und Purkinje-Neuronen exprimierte onkoneurale Antigen cdr2 (Albert et al., 2000, Albert et al., 1998, Tanaka et al., 1998, Tanaka et al., 1999). Im Rahmen der Erkrankung konnte eine T-Zell-Infiltration in das Cerebellum nachgewiesen werden (Giometto et al., 1997, Verschuuren et al., 1996). Da Purkinje-Neurone MHC-I-Proteine exprimieren, sind sie somit in der Lage Epitope des cdr2 Antigen zu präsentieren und machen sich somit zum Ziel von cdr2 spezifischen zytotoxischen CD8⁺ T-Zellen. Diese Ergebnisse legen nahe,

dass CD8⁺ T-Zellen auch in anderen paraneoplastischen neurologischen Degenerationen eine Rolle spielen könnten (Albert and Darnell, 2004).

Des Weiteren werden ZNS-Infiltrate und neuronale Degeneration durch CD8⁺ T-Zellen nicht nur in primär entzündlichen Erkrankungen des Nervensystems gefunden, sondern auch in klassischen neurodegenerativen Erkrankungen. Beispielsweise sind in der ALS, bei der ein Großteil der eingewanderten T-Zellen im Gyrus praecentralis (Kawamata et al., 1992), in der Pyramidenbahn (Tractus corticospinalis) und im Rückenmark gefunden werden, (Troost et al., 1990) CD8⁺ T-Zellen. Zudem weisen diese Zellen eine oligoklonale Expansion auf. Diese resultiert wahrscheinlich aus der Tatsache, dass die Vorläuferzellen nur durch wenige lokale Antigene aktiviert wurden (Panzara et al., 1999).

Ebenso kann beim Morbus Alzheimer, eine hohe Anzahl CD8⁺ T-Zellen und MHC-I-präsentierenden Zellen in den betroffenen Regionen des Hippocampus und des parietalen Cortex gefunden werden (Itagaki et al., 1988, Town et al., 2005). Ein weiterer Beleg für einen Zusammenhang zwischen neuronalem Schaden und CD8⁺ T-Zellen ist auch in der Substantia nigra des Mittelhirns bei der Parkinson Erkrankung zu finden. Bei dieser Erkrankung wurden CD8⁺ T-Zellen in direkter Nachbarschaft von Blutgefäßen oder zu degenerierten dopaminergen Mittelhirnneuronen gefunden. Darüber hinaus übertrifft die Zahl der CD8⁺ T-Zellen die von CD4⁺ T-Zellen um das Vier- bis Fünffache (Brochard et al., 2009).

Insgesamt muss jedoch erwähnt werden, dass die Zahl der CD8⁺ T-Zellen in neurodegenerativen Erkrankungen viel geringer ist als in primär entzündlichen Erkrankungen des Nervensystems. Des Weiteren ist nicht geklärt, inwiefern die Migration von CD8⁺ T-Zellen in das ZNS-Parenchym bei den erwähnten neurodegenerativen Erkrankungen Ursache oder Folge der Neurodegeneration ist.

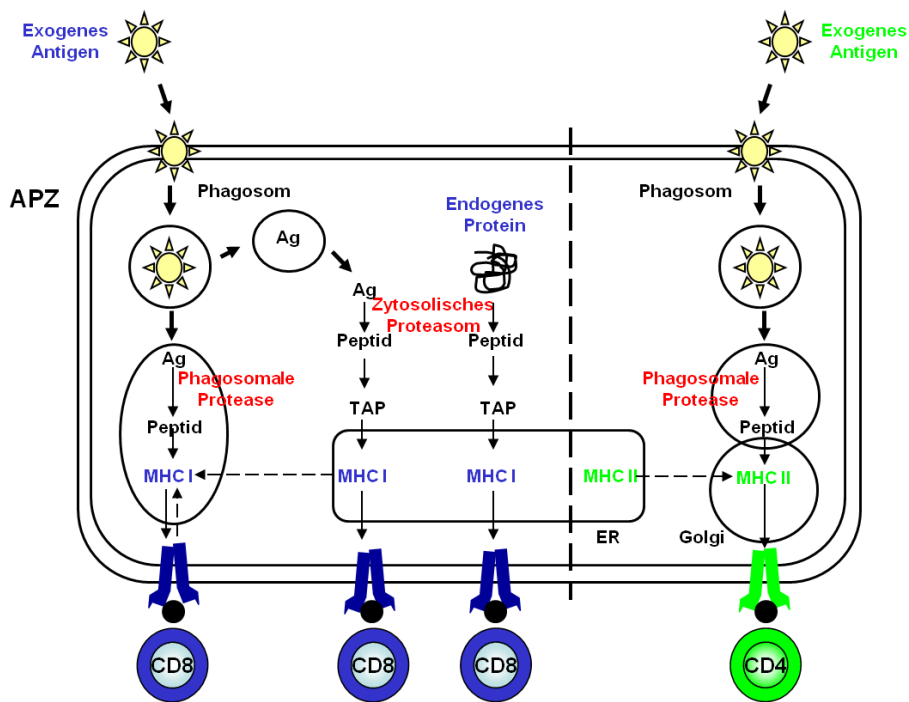
1.2 Mechanismen der Antigen-Präsentation, klonalen Expansion und CD8⁺ T-Zell-Migration

Die Blut-Hirn-Schranke (BHS) ist für Immunzellen eine wichtige, jedoch keine unüberwindliche Barriere. Unstimulierte naive T-Zellen können ohne vorhergehende Aktivierung nicht in das ZNS einwandern. Diese antigen-spezifische CD8⁺ T-Zell-Aktivierung kann in sekundärem lymphatischem Gewebe, wie beispielsweise den zervikalen Lymphknoten (ZLK), hervorgerufen werden. Dies geschieht in der Regel durch antigen-präsentierende Zellen (APZ) (Seder and Ahmed, 2003). Zwei mögliche Wege des Antigentransportes aus dem ZNS nach Gewebeschaden in die ZLK werden diskutiert: Zum Einen können Antigene passiv im Liquor und der Lymphe transportiert werden und gelangen so in die ZLK oder die Antigene erreichen die ZLK, nachdem sie von APZ wie zum Beispiel dendritischen Zellen (DZ) phagozytiert wurden. Diese Zellen kommen auch in einer geringen Zahl im perivaskulären Raum vor und können aktiv nach Antigenaufnahme zu den ZLK migrieren (Galea et al., 2007a). In den Lymphknoten werden freie sowie zell-gebundene Antigene durch APZ aufgenommen, prozessiert und über das MHC-I-Molekül undifferenzierten CD8⁺ T-Zellen präsentiert, ein Prozess der „Cross-Präsentation“ genannt wird. Exogene Antigene werden von APZ über MHC-II-Moleküle präsentiert, die von undifferenzierten CD4⁺ Zellen erkannt werden (Ackerman and Cresswell, 2004, Trombetta and Mellman, 2005).

Die unterschiedlichen Antigenpräsentationen über MHC-I- und MHC-II-Komplexe werden wie im Folgenden beschrieben: Nach der Endozytose des Antigens mittels verschiedener Mechanismen durch die APZ werden diese in Phagosomen abgebaut. Diese Phagosomen mit den Antigenabbauprodukten fusionieren darauf mit Golgi-Vesikeln. Diese beinhalten MHC-II-Moleküle, die im endoplasmatischen Retikulum (ER) synthetisiert wurden. Nach der Peptid-Synthese fusionieren die MHC-II-Proteine mit einem weiteren Protein mit dem Namen „*Invariante Kette*“ (*Ii*). Dieses Protein verhindert die unspezifische Bindung des MHC-II-Proteins mit endogenen Peptiden. Nach der Bindung wird dieser MHC-II-Ii-Komplex von Endosomen aufgenommen. Dort wird durch Proteasen Ii gespalten, sodass nur

noch eine kurze Peptidsequenz mit dem Namen CLIP (*class-II-associated invariant chainpeptide*) in der Bindungstasche zurückbleibt. Dieses Peptid verhindert weiterhin die Bindung mit einem Antigen. Wenn CLIP katalytisch vom MHC-CLIP-Komplex getrennt wird, kann das MHC-II-Protein aus dem Endosom ein Antigen binden und dieses an der Zelloberfläche CD4⁺ T-Zellen präsentieren (Abbildung 1.2).

Abbildung 1.2



Mechanismus der Antigen-Prozessierung und deren Präsentation. (Rechter Abbildungsteil) In der Regel präsentieren APZ exogene Antigene über MHC-II-Proteine (grün) an ihrer Zelloberfläche. Diese werden von CD4⁺ T-Zellen (grün) erkannt. Exogene Antigene werden nach Aufnahme von APZ über verschiedene Mechanismen katalytisch in Peptide zerlegt. Innerhalb von Phagosomen verschmelzen diese mit Golgi-Vesikeln, in denen sich vollständig synthetisierte MHC-II-Proteine befinden. Diese MHC-II-Proteine wurden im endoplasmatischen Retikulum (ER) synthetisiert. Im ER sind die MHC-II-Proteine noch mit der invarianten Kette (Ii) assoziiert. Diese verhindert die Bindung von MHC-II-Proteinen an endogene Antigene noch. Dieser MHC-II/invarianten Kettenkomplex (MHC-II/Ii) bewegt sich durch den Golgi-Apparat in dem MHC-II/Ii zu *class-II-associated invariant chainpeptide* (CLIP) verändert wird. CLIP wird dann vom MHC-II – CLIP-Komplex entfernt und gegen das Antigen ausgetauscht. Von da an wird das Antigen zusammen mit dem MHC-II-Molekül an die Zelloberfläche transportiert. Dort wird das Antigen CD4⁺ T-Zellen präsentiert. (Mittlerer Abbildungsteil) Endogene Antigene werden im Zytosol der APZ durch Proteosome katalytisch gespalten. Diese zytosolischen Peptide werden von der transporter-assoziierten-Antigenpräsentation (TAP) in das ER transportiert. Im ER werden neusynthetisierte MHC-I-Moleküle (blau) mit dem Antigen beladen. Diese pMHC-I-Moleküle werden dann durch das ER an die Zelloberfläche transportiert, an denen diese endogenen Antigene CD8⁺ T-Zellen präsentiert werden. (Linker Abbildungsteil) Einige APZ, sowie DZ, Makrophagen und Gliazellen

können auch durch MHC-I-vermittelte „Cross-Präsentation“ CD8⁺ T-Zellen aktivieren. Hierbei werden exogene Antigenpeptide aus dem Phagosom in das Zytosol entlassen und via TAP ins ER transportiert. Im ER wird das exogene Antigen mit einem MHC-I-Molekül fusioniert und an die Zelloberfläche transportiert. Alternativ kann auch das Antigen durch die phagosomale Protease im Phagosom gespalten werden und an recycelte MHC-I-Moleküle, die von der Zellmembran zurücktransportiert wurden, gebunden. Grafik modifiziert nach (Melzer et al., 2009).

Über den MHC-I-Komplex werden überwiegend, aber nicht ausschließlich endogene Antigene präsentiert. Diese werden im Zytosol durch Proteasomen in Peptidstücke gespalten. Diese zytosolischen Peptide werden dann vom TAP-Komplex (Transporter-assoziierte Antigenpräsentation) in das ER transportiert. Dort werden neu synthetisierte MHC-I-Proteine angelagert. Über den Golgi-Apparat werden diese beladenen Moleküle zur Zellmembran transportiert, um CD8⁺ T-Zellen präsentiert zu werden (Abbildung 1.2).

Manche Subtypen der APZ, sowie der DZ und auch Makrophagen bzw. Mikroglia können jedoch auch exogene Antigene über MHC-I-Moleküle präsentieren und dadurch CD8⁺ T-Zellen aktivieren. Diese „Cross-Präsentation“ ist abhängig davon, wo das Antigen katalytisch in Peptide gespalten wird und an welcher Stelle diese Peptide auf die MHC-I-Moleküle geladen werden (Ackerman and Cresswell, 2004, Trombetta and Mellman, 2005). Dabei werden exogene Antigene, die normalerweise im Phagosom für die MHC-II-vermittelte Antikörperpräsentation degradiert werden, in das Zytosol geschleust, wo sie stattdessen gespalten werden. Von dort nehmen sie den Weg der endogenen Antigene und werden mittels TAP in das ER transportiert, um dort auf MHC-I-Moleküle geladen zu werden. Ein weiterer Weg bei dem exogene Antigene an CD8⁺ T-Zellen über MHC-I präsentiert werden können, besteht darin, die Antigene in den Phagosomen zu Peptiden zu spalten und danach mit MHC-I-Proteinen zu fusionieren. Diese MHC-I-Moleküle werden entweder von der Zellmembran ins Zytosol zurücktransportiert und recycelt oder sie werden direkt vom ER in die Phagosomen geschleust (Trombetta and Mellman, 2005, Ackerman and Cresswell, 2004).

Die „Cross-Präsentation“ von Antigenen, die aus dem ZNS stammen, führt gewöhnlicher Weise zu einer CD8⁺ T-Zell-Toleranz (Kurts et al., 1997b). Sollten jedoch antigenspezifische CD4⁺ T-Zellen vorliegen (Kurts et al., 1997a), kommt es zu einer Expansion von CD8⁺ T-Zellen (Carbone et al., 1998).

1.3 CD8⁺ T-Zell-Reaktivierung, klonale Expansion und Migration in das ZNS-Parenchym

Der Anteil von CD4⁺ T-Zellen macht unter physiologischen Bedingungen mehr als 80% der Leukozyten im Liquor aus, da diese Zellen zur Immunüberwachung im ZNS-Parenchym benötigt werden. Nach der Aktivierung mittels Antigen-Präsentation in lymphatischen Organen, ist es CD4⁺ T-Gedächtniszellen auf verschiedenen Wegen möglich, in das Liquor-System einzuwandern (Ransohoff et al., 2003, Ransohoff and Engelhardt, 2012, Schwab et al., 2013). Um in das ZNS-Parenchym einzudringen, benötigen die CD4⁺ T-Gedächtniszellen eine MHC-II-vermittelte Reaktivierung durch APZ im äußeren Liquor-Raum, dem sogenannten Subarachnoidealraum sowie den perivaskulären Räumen (Becher et al., 2006). Dieser Mechanismus gewährleistet, dass nur reaktivierte CD4⁺ T-Zellen in das ZNS-Parenchym einwandern können, die vorher über ihr spezifisches Antigen im Liquor oder im ZNS selbst reaktiviert wurden. Im Mausmodell konnte dementsprechend gezeigt werden, dass nach einem adoptiven Transfer von aktivierten ZNS-Antigen-spezifischen CD4⁺ T-Zellen, eine MHC-II- Expression der APZ im perivaskulären Raum notwendig ist, um eine neurologische Autoimmunstörung hervorzurufen (Greter et al., 2005, Kawakami et al., 2005, Flugel et al., 2001).

Indes wurde auch gezeigt, dass sowohl nach adoptiven Transfer als auch nach aktiver Immunisierung, ZNS-spezifische CD8⁺ T-Zellen ähnlich wie CD4⁺ T-Zellen in das ZNS migrieren können (Ford and Evavold, 2005, Huseby et al., 2001, Sun et al., 2001). Diese Bedeutung in der Pathogenese wurde schon in diversen anderen Modellen der Neuroinflammation gezeigt. Dabei war es irrelevant, ob es sich hierbei primär um eine entzündliche oder degenerative Störung handelte (Brisebois et al., 2006, Ip et al., 2006). Bisher war jedoch der Mechanismus, auf welche Weise CD8⁺ T-Zellen in das neuronale Parenchym gelangen, weitgehend ungeklärt. Daher wurden in verschiedenen Arbeiten von Galea (Galea et al., 2007b) und Kollegen bei Mäusen, die überwiegend CD8⁺ T-Zellen mit dem TZR gegen das Peptid Hemagglutinin (HA) exprimieren, dieses Peptid in das Striatum injiziert. Hierbei konnte gezeigt werden, dass nur die T-Zellen in das ZNS

migrierten, die ihr spezifisches Antigen erkennen. Auch konnte beobachtet werden, dass die T-Zellen nur an den Ort ins ZNS wandern, an dem sie ihr spezifisches Antigen vorfinden. Insgesamt konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass CD8⁺ T-Zellen, im Unterschied zu CD4⁺ T-Zellen keine Antigenpräsentation durch APZ (um die BHS) zu überwinden), jedoch eine MHC-I-vermittelte Antigenpräsentation durch zerebrale Endothelzellen benötigen. Bemerkenswerter Weise waren die eingewanderten CD8⁺ T-Zellen nach der beschriebenen Injektion ins Striatum, nicht vollständig aktiviert, welches sich durch fehlende zytotoxische Granula und das Ausbleiben von Gewebeschäden im ZNS zeigte. Wurde das Antigen jedoch peripher in Kombination mit komplettem Freund-Adjuvans (KFA) gegeben oder die Zellen *in vitro* mit dem Antigen Peptid HA512-520 stimuliert und die Tiere damit passiv immunisiert, konnten zytotoxische Granula und axonale Degeneration beobachtet werden (Galea et al., 2007b).

Insgesamt scheint somit nach der erfolgten Aktivierung in den ZLK die Infiltration von CD4⁺ und auch CD8⁺ T-Zellen in das ZNS-Parenchym weiterhin ein antigen-abhängiger Prozess zu sein. Jedoch scheint der Mechanismus der Antigen-Präsentation für beide Zelltypen unterschiedlich zu sein.

1.4 Kontrolle der Immunzellen durch das ZNS-Parenchym mittels Regulation von MHC-I-Molekülen und der Regulation von T-Zell-inhibierenden Molekülen auf den Zielzellen

Die Immunreaktion im Gehirn, geht nicht nur von Zellen des Immunsystems aus, sondern wird auch von Zellen des neuronalen Parenchyms reguliert. Das ZNS-Parenchym hat die Fähigkeit auf das Immunsystem inhibierend einzuwirken (Ransohoff and Engelhardt, 2012). Alle Zellen des ZNS-Parenchyms, sind grundlegend in der Lage Fas-Liganden (FasL)-Oberflächenmoleküle zu exprimieren. Dieser Ligand fördert die Apoptose nach Zell-Zellkontakt mit Fas-Rezeptor (Fas) exprimierenden CD8⁺ T-Zellen (Bechmann et al., 1999). Dieser liganden-vermittelte Apoptoseweg ist antigenunabhängig und dadurch ein eher unselektiver CD8⁺ Apoptoseweg (Schmied et al., 1993). Weiterhin können ZNS-Zellen noch auf andere Weise inhibitorisch Einfluss auf Immunzellen nehmen. Zellen des ZNS sind in der Lage unter inflammatorischen Bedingungen co-inhibitorische Oberflächenproteine der B7-Familie zu präsentieren. Diese Liganden interagieren mit dem *programmed-death receptor* (PD-1) welcher auf CD8⁺ T-Zellen präsentiert wird. Durch diese Liganden-Rezeptor-Interaktion wird die Aktivierung und Zytokinsekretion in zytotoxischen CD8⁺ T-Zellen unterdrückt (Magnus et al., 2005, Schmied et al., 1993). Zudem wurde gezeigt, dass sowohl Neurone (Liu et al., 2006) als auch Astrozyten (Trajkovic et al., 2004) in der Lage sind, Effektor-T-Zellen in regulatorische T-Zellen zu wandeln. Dieser Prozess ist abhängig von einem direkten Zell-Zell-Kontakt, scheint aber nicht antigenspezifisch zu sein.

Darüber hinaus konnten auch Mechanismen zur Regulierung der T-Zell-Funktion nachgewiesen werden, die nicht von einem direkten Zell-Zell-Kontakt abhängig sind. T-Zellen sind in der Lage Mikrogliazellen zu veranlassen, Indolamin-2,3-dioxygenase zu exprimieren. Dieses Enzym sorgt für die Ausschüttung des Tryptophan-Metaboliten *Kynurenin*, welcher die Proliferation und die Zytokin-

Freisetzung sowohl in CD8⁺ als auch in CD4⁺ T-Zellen herunterregulieren kann (Frumento et al., 2002).

Mikrogliazellen können nach Schädigung des ZNS über „Cross-Präsentation“ von neuronalen Antigenen eine zytotoxische Immunantwort durch CD8⁺ T-Zellen einleiten (Beauvillain et al., 2008, Frei et al., 1987). Dieser Vorgang ist jedoch nur in einer entzündeten Umgebung möglich. In einer nicht entzündlichen Situation ist diese Aktivierung der Mikrogliazellen und somit die MHC-I-vermittelte Antigenpräsentation streng kontrolliert. Intakte Neurone exprimieren CD200 und CD47. Diese Moleküle interagieren mit ihren jeweiligen Rezeptoren, CD200R und dem Signal-Regulator-Protein- α auf Mikroglia. Diese Ligand-Rezeptor-Interaktion halten die Mikroglia in einem nicht aktivierten Zustand, so dass die entzündlichen Effektor-Funktionen unterdrückt sind (Hoek et al., 2000, Meuth et al., 2008, Wright et al., 2000, Koning et al., 2007). Ein weiterer Weg wie Neurone Mikroglia an ihrer Aktivierung hindern, wird über die elektrische Aktivität von Neuronen geregelt. Elektrisch aktive Neurone, schütten Neutrophine aus, die ihrerseits durch das Binden an Neutrophin-Rezeptoren von Mikroglia die Expression von MHC-II-Molekülen unterdrücken können (Neumann et al., 1998). Neurone schütten aber auch Chemokine, wie Fractalkine und CD22 aus. Beide schwächen durch Binden an die Mikroglia-Rezeptoren CX3CR1 und CD45 ebenso die Mikroglia-Aktivität (Mott et al., 2004, Cardona et al., 2006). Somit ist ein gewisser Schutz aktiver Neurone vor inflammatorischen Prozessen gegeben. Des Weiteren bestehen in einer nicht inflammatorischen Umgebung des ZNS keine Expression von MHC-I und somit auch keine Antigenpräsentation von Gliazellen und Neuronen (Vass and Lassmann, 1990).

Patrouillierende CD8⁺ T-Zellen finden somit in einem tonisch elektrisch aktiven ZNS-Parenchym eine immuninhibitorische Umgebung vor. Eine Aktivierung kann somit, auch aufgrund der nicht vorhandenen MHC-I-Expression auf den Zielzellen nicht stattfinden. Doch trotz dieser immunsuppressiven Fähigkeit des intakten ZNS-Gewebes kann es unter pathologischen Bedingungen zu entzündlichen Reaktionen kommen. Neuronale und oligodendrogliale Schädigungen führen zu einer Aktivierung von umliegenden Mikroglia-Zellen. Die Migration aktivierter Mikroglia in geschädigte ZNS-Regionen führt zu einer Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen, wie z.B. Interferon- γ (IFN- γ) und Tumor-Nekrose-

Faktor- α (TNF- α), sowie zur Phagozytose und Antigen-Präsentation. Das Vorhandensein eines proinflammatorischen Milieus durch IFN- γ und das gleichzeitige „Stummschalten“ von geschädigten Neuronen, führt zu einer Hochregulation des antigen-präsentierenden MHC-I-Komplexes auf Neuronen (Neumann et al., 1995, Neumann et al., 1997). Auch andere ZNS-Zellen zeigen in einer entzündlichen Umgebung eine Hochregulation des MHC-I-Komplexes. Somit werden auch diese Zellen zu potentiellen Zielzellen von CD8⁺ T-Zellen (Vass and Lassmann, 1990). Weiter führen auch aktivierte Mikroglia und Makrophagen zu einer Verminderung der neuronalen Erregbarkeit. Die genannten Zellen können den Auswärtsstrom von Kalium-Ionen (K⁺) durch spannungsunabhängige Kalium-Kanäle (Wang et al., 2008) verstärken. Dieser Effekt wird zusätzlich noch durch CD8⁺ T-Zellen verstärkt, die ihrerseits proinflammatorische Zytokine ausschütten und dadurch Neurone in ihrer elektrischen Aktivität hemmen. Dies führt wiederum zu einer verstärkten MHC-I-Expression und damit einhergehend zu einer vermehrten Antigen-Präsentation (Na et al., 2008).

Durch all diese genannten Mechanismen wird in einer entzündlichen Umgebung, die immun-inhibitorische Funktion des ZNS-Parenchyms vermindert und somit eine Invasion, Migration, sowie eine Antigen-Erkennung auf Zielzellen durch CD8⁺ T-Zellen ermöglicht.

1.5 CD8⁺ T-Zell-Einwanderung in das ZNS und die Suche nach antigen-präsentierenden Zielzellen

Aktivierte ZNS antigen-spezifische CD8⁺ T-Zellen migrieren durch das ZNS-Parenchym und „suchen“ nach passenden Antigenen, die im MHC-I-Kontext präsentiert werden. Neuere Arbeiten in diesem Feld untersuchten mit Hilfe der *in vivo* 2-Photonen-Mikroskopie das Migrationsverhalten von CD8⁺ T-Zellen in Tumoren und die Interaktion mit antigen-präsentierenden MHC-I-Molekülen (Ng et al., 2008). Zudem wurde das Migrationsverhalten von CD4⁺ T-Zellen ausführlich in

Modellen der autoimmunen ZNS-Inflammation untersucht (Flugel et al., 2007, Sallusto et al., 2012).

Das Migrationsverhalten von ZNS-spezifischen CD8⁺ T-Zellen im lebenden Organismus wurde mit Ovalbumin (OVA)-spezifischen T-Zellen analysiert. Diese *in vitro* aktivierten Zellen, wurden mittels adoptiven Transfers in Mäuse mit einem Thymom injiziert. Diese Mäuse waren entweder transgen für das MHC-I-präsentierende Peptid OVA oder Wildtyp (WT) (Mrass et al., 2006, Breart et al., 2008). In Mäusen, die das Antigen OVA präsentierten, konnten sowohl bewegliche als auch unbeweglich stationäre CD8⁺ T-Zellen beobachtet werden. Bei den stationären T-Zellen handelte es sich um Zellen, die zu diesem Zeitpunkt in Interaktion mit ihren Zielzellen waren (Mrass et al., 2006). Gleichzeitig initiieren diese Zellen möglicherweise über Chemokine ein Stoppsignal an benachbarte T-Zellen (Dustin et al., 1997). Insgesamt deutet dies auf eine Regulation der T-Zell-Migration hin. Im weiteren Verlauf zeigten die Zielzellen Caspase-3-Aktivierung, was auf eine Apoptose der Zellen hindeutet. Zu diesem Zeitpunkt, wechselten die stationären CD8⁺ T-Zellen wieder in einen motilen Status und gingen erneut mit potentiellen Zielzellen eine kurzzeitige Interaktion ein, um ihr entsprechendes Antigen zu finden. Zwischen den Zielzell-Kontakten der CD8⁺ T-Zellen zeigten diese T-Zellen eine charakteristische Wanderbewegung, welche das Auffinden des relevanten Antigens in weiteren Zielzellen stark erhöht.

Bei Mäusen hingegen, die das relevante Antigen nicht präsentierten, migrierten die T-Zellen zunächst mit einer hohen Beweglichkeit. Diese wurde jedoch scheinbar schnell gehemmt und somit nahm die Zahl der nicht migrierenden T-Zellen zu.

Insgesamt wird demnach für die Aufrechterhaltung einer hohen Mobilität von aktivierten CD8⁺ T-Zellen im Zielgewebe ein ständiges Signal der relevanten TZR als wichtig erachtet (Mrass et al., 2006). Zusätzlich zur Interaktion mit den Zielzellen, sind CD8⁺ T-Zellen in unmittelbarem Kontakt mit Makrophagen und Gliazellen. Dies zeigt die Notwendigkeit einer wiederholten „Cross-Präsentation“ des Antigens um eine anhaltende Migration und Zielzell-Erkennung durch CD8⁺ T-Zellen hervorzurufen (Mrass et al., 2006).

In Arbeiten unserer Forschergruppe konnten wir mittels der 2-Photonen-Mikroskopie das Migrationsverhalten und die Interaktion von aktivierten OVA-

spezifischen CD8⁺ T-Zellen in hippocampalen Schnittkulturen nachweisen. In Schnittkulturen ohne Antigen-Präsentation, konnte innerhalb des Ammonshorn (Cornus amoris, CA) das aus den Tumorexperimenten bekannte typische Migrationsverhalten von CD8⁺ T-Zellen beobachtet werden. Unter Antigenpräsentation über MHC-I-Moleküle änderten die T-Zellen auch in den Gehirnschnitten ihr Migrationsverhalten hin zu einem stationären Verhalten, um dadurch mit ihren antigenpräsentierenden Zielzellen immunologische Synapsen (IS) zu bilden und über diese mit ihnen zu interagieren. Antigen-abhängige Interaktionen von CD8⁺ T-Zellen mit hippocampalen Neuronen führten zu einem entweder zeitweiligen oder anhaltenden Anstieg der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration, was daraufhin zu neuronalem Zelltod führte. Zusammengefasst geben diese Ergebnisse einen Hinweis, dass Antigen-spezifität und TZR-Interaktion, bei Eintritt ins Zielgewebe für die CD8⁺ T-Zell-Mobilität enorm wichtig sind. Diese Faktoren sorgen dafür, dass CD8⁺ T-Zellen mit einer hohen Beweglichkeit das Zielgewebe nach ihrem spezifischen Antigen durchsuchen. Nach Erkennen eines MHC-I-exprimierenden Antigens, gehen die T-Zellen in eine stationäre Phase über und bilden mit der betreffenden Zielzelle eine IS, welche im Endeffekt zum Zelltod der Zielzelle führt. Die antigenspezifische T-Zell-Interaktion scheint zudem wichtig für die Fortsetzung der T-Zell-Migration nach einer Interaktion mit einer Zielzelle zu sein.

1.6 Ausbildung der immunologischen Synapse zwischen CD8⁺ T-Zellen und ihren Zielzellen

Das Erkennen eines MHC-I-präsentierten Antigens durch einen TZR einer aktivierten CD8⁺ T-Zelle führt zu einigen Veränderungen in der T-Zell-Organisation. Infolge des Kontaktes findet eine Umverteilung und Akkumulation des Zytoskeletts statt. Zudem kommt es zur Umverteilung von Adhäsions-, co-stimulatorischen und Signaltransduktions-Molekülen. Diese Modifizierungen innerhalb der Kontaktstelle der T-Zelle mit der Zielzelle führen schließlich zur

Bildung einer IS (Stinchcombe and Griffiths, 2007). Zur Bildung solch einer IS, bilden Signalmoleküle wie der TZR-Komplex, die CD8-Co-Rezeptoren, intrazelluläre Signalmoleküle sowie Adhäsionsmoleküle wie LFA-1 und ICAM-1 ein hoch organisiertes Molekül-Cluster. In diesem Cluster organisieren sich die Signalmoleküle im Zentrum und die Adhäsionsmoleküle bilden einen konzentrischen Ring um dieses (Abbildung 1.1). Jedoch können auch andere Moleküle eine Kontaktstelle formen. Diese Kontaktstellen werden als distaler supramolekularer Aktivations-Komplex (dSMAC) bezeichnet. Des Weiteren bilden Mikrotubuli an der Kontaktseite ein sogenanntes *Mikrotubuli-Organisations-Zentrum* (MTOC). Entlang dieser Mikrotubuli werden Lysosomen zur T-Zellmembran und zur IS transportiert. Dort angelangt fusionieren die Lysosomen mit dieser. Durch Exozytose werden in der Folge zytotoxische Effektormoleküle in den synaptischen Spalt entlassen.

Die zytotoxische CD8⁺ T-Zell-vermittelte Zell-Zell-Interaktion wird hauptsächlich über zwei voneinander unabhängige Mechanismen bewerkstelligt. Zum einen werden Granula in Richtung der Zielzelle freigesetzt, zum anderen kommt es zu einem induzierten Zelltod über die Fas/FasL-Interaktion (Kagi et al., 1994b, Lowin et al., 1994). Die erstere, granula-vermittelte Zellinteraktion wird über die Freisetzung von Perforin und verschiedenen Isoformen von Granzymen vermittelt. Aber auch die Freisetzung von Perforin alleine kann zu einer schnellen Nekrose der Zielzelle führen. Durch die Bildung von unselektiven Membranporen kommt es durch den Verlust der Membranintegrität zum Anschwellen der Zielzelle und dadurch zur Zellnekrose (Waterhouse et al., 2006). Ein weiterer, eher physiologischer Weg ist das Einschleusen von Granzymen in die Zielzelle durch zuvor von Perforin geformten Membranporen. Dieser T-Zell-vermittelte Apoptoseweg führt nach einigen Stunden zur Apoptose der Zielzelle. Insgesamt ist jedoch der genaue Mechanismus dieses Apoptosewegs noch unklar (Waterhouse et al., 2006, Pipkin and Lieberman, 2007). Ein weiterer T-Zell-induzierter Zelltod in Zielzellen wird über eine Liganden- Rezeptor Interaktion eingeleitet. In diesem Mechanismus nimmt z.B. die Fas/FasL-Interaktion eine wichtige Rolle ein. Des Weiteren können zytotoxische CD8⁺ T-Zellen in einer entzündeten Umgebung umliegende Zellen auch durch Ausschütten von potenziell proinflammatorischen Zytokinen wie IFN- γ und TNF- α schädigen (Russell and Ley, 2002).

Ob eine CD8⁺ T-Zelle ihre Zielzelle über einen granula- oder liganden-vermittelten Apoptoseweg schädigt, hängt von der Stärke des Antigensignals ab, welches die T-Zelle von der Zielzelle erhält. Dies wird von der Zahl der MHC-I-Komplexe und der Affinität dieser Komplexe zum TZR der T-Zelle beeinflusst. Änderungen in der Stärke des Antigensignals, führen in der T-Zelle zu einem veränderten Ca²⁺-Signal. Bei einer eher geringen Stimulation des TZR wird die T-Zelle ihre Zielzelle eher über den Fas/FasL-Mechanismus eliminieren, wohingegen eine starke Stimulation über den TZR, zu einer Ausschüttung von Perforin und Granzym führt (Esser et al., 1998, Kessler et al., 1998, Purbhoo et al., 2004). Bei einer sehr hohen Affinität zwischen TZR und MHC-I-Komplex ist nur eine sehr geringe Anzahl von MHC-I-Molekülen notwendig, um eine zytotoxische T-Zell-Antwort auszulösen. Um eine T-Zell-Antwort bei einer hochaffinen MHC-I-TZR-Interaktion auszulösen, reicht es beispielsweise, wenn nur 1 - 3 MHC-I-Moleküle das Antigen präsentieren (Purbhoo et al., 2004, Sykulev et al., 1996). In Anbetracht der Gesamtzahl der MHC-I-Moleküle, die auf der Membranoberfläche der Zielzellen präsentiert werden, erscheint diese Anzahl sehr gering. Im Falle einer niedrig affinen TZR-MHC-I-Interaktion jedoch, sind mehrere tausend MHC-I-Komplexe je Zielzelle nötig, um eine zytotoxische T-Zell-Antwort auszulösen (Kageyama et al., 1995). CD8⁺ T-Zellen, die *in vitro* aktiviert wurden, können Neurone entweder über den Perforin–Granzym-Weg (Malipiero et al., 1999, Rensing-Ehl et al., 1996) oder mittels des FasL-Fas-Mechanismus (Giuliani et al., 2003, Medana et al., 2000) angreifen und die Neuronen zur Apoptose bringen. Interessanterweise ist in der CD8-vermittelten neuronalen Apoptose der FasL-Fas-vermittelte T-Zell-Angriff, unabhängig von der Antigenpräsentation der Zielzellen (Giuliani et al., 2003, Choi and Benveniste, 2004).

1.7 Mechanismen der unspezifischen Zell-Schädigung durch CD8⁺ T-Zellen

Die Bildung von ringförmigen Strukturen durch Adhäsionsmoleküle bei der Formierung einer IS sorgt für einen eng begrenzten synaptischen Spalt, in dem sich eine hohe Konzentration von Effektor-Molekülen anreichert. Dadurch wird verhindert, dass umliegende Zellen von den ausgeschütteten Effektor-Molekülen geschädigt werden (Stinchcombe and Griffiths, 2007, Stinchcombe et al., 2001). Jedoch konnte gezeigt werden, dass bei der Formierung einer IS zwischen einer CD8⁺ T-Zelle und einer Zielzelle (Wiedemann et al., 2006) nicht zwingend eine Ringstruktur aus LFA-1 und ICAM-1 ausgebildet wird (Purbhoo et al., 2004). Dies führt dazu, dass die in die IS ausgeschütteten Effektor-Moleküle in den umliegenden Raum austreten.

Dieser weniger spezifische Mechanismus könnte in einem entzündlichen Milieu den Zweck haben, die Effizienz von CD8⁺ T-Zellen zu erhöhen. Da zytotoxische T-Zellen nicht in einer beliebig großen Anzahl in entzündlichen Geweben vorhanden sind, gibt es wahrscheinlich zwei verschiedene Strategien, um die Effektivität von zytotoxischen T-Zellen zu erhöhen. Damit CD8⁺ T-Zellen mit mehr als nur einer Zielzelle in kurzer Zeit interagieren können, haben sie die Möglichkeit verschiedene Zielzellen entweder schnell nacheinander, oder mehrere Zielzellen gleichzeitig in die Apoptose zu führen. Beide Strategien sind nicht sehr selektiv und bergen das Risiko, dass zytotoxische Granula nicht auf einen engen Raum begrenzt sind und dadurch einen gewissen Kollateralschaden verursachen (Abbildung 1.1). Bei zytotoxischen CD8⁺ T-Zellen wurde gezeigt, dass sie sowohl *in vivo* (Breart et al., 2008) als auch *in vitro* (Matter, 1979, Poenie et al., 1987, Rothstein et al., 1978) zu einer sequentiellen Zielzell-Interaktion fähig sind. Nach dem Lösen der IS entweichen dabei jedoch zytotoxische Effektor-Moleküle aus dem synaptischen Spalt in den umgebenden Raum (Buzza and Bird, 2006). Außerdem führt die in diesem Falle repetitive Aktivierung des TZR zu einer Resynthese von Perforin- und Granzym-Granula, die entweder gerichtet in die IS oder ungerichtet außerhalb der IS sezerniert werden (Huse et al., 2008). Beim letzteren, granulären Exozytose-Weg ist die räumliche Limitierung der Granula

somit nicht gegeben. Daher führt dieser Mechanismus zu einem sogenannten unspezifischen *bystander killing* (Isaaz et al., 1995). Die Abgabe von zytotoxischen Granula in den extrazellulären Raum, kann auch durch die Interaktion von CD8⁺ T-Zellen mit Komponenten der extrazellulären Matrix hervorgerufen werden. Diese Interaktion findet statt, wenn zytotoxische T-Zellen keine antigen-präsentierenden Zellen im Zielgewebe vorfinden (Buzza and Bird, 2006, Huse et al., 2008, Isaaz et al., 1995, Takahashi et al., 1991).

Zytotoxische CD8⁺ T-Zellen sind auch imstande mit mehreren antigen-präsentierenden Zielzellen gleichzeitig in Kontakt zu treten (Wiedemann et al., 2006, McGavern et al., 2002, Kuhn and Poenie, 2002) und diese durch lytisch aktive Granula zu schädigen. Diese Granula werden jeweils an den verschiedenen Zell- Zell-Kontaktstellen polarisiert (Wiedemann et al., 2006, McGavern et al., 2002). Diese simultanen T-Zell-Zielzell-Interaktionen finden völlig unabhängig von der Stärke des T-Zell-vermittelten Antigensignals statt. Durch diesen Interaktionsmechanismus wird die T-Zell-Effektivität erheblich erhöht, jedoch wird das antigen-unspezifische *bystander killing* gefördert (Wiedemann et al., 2006). Ein weiterer Grund für den Untergang von *bystander*-Zellen, ist der intrazelluläre Transfer von Antigenen via *gap junction*-Kanäle (Li and Herlyn, 2005, Neijssen et al., 2005). Durch diesen Mechanismus können sich diese Zellen ein schwaches antigen-präsentierendes Potential aneignen und sich dadurch in den Focus von zytotoxischen T-Zellen bringen. Ein weiterer Weg, wie eine *bystander*-Zelle zu einer antigen-präsentierenden Zelle werden kann, ist der extrazelluläre Transport von Antigenen zu den MHC-I-Proteinen (Galea et al., 2007b) dieser Zellen. Auch dadurch werden ursprünglich unbeteiligte Zellen zu Zielzellen von zytotoxischen T-Zellen.

Transgene Tiermodelle, die in verschiedenen nicht neuronalen Bereichen des ZNS ein Antigen präsentieren, zeigen nach Transfer von *in vitro* aktivierten T-Zellen, gemäß der Theorie des *bystander killing* durch CD8⁺ T-Zellen, erheblichen neuronalen und axonalen Kollateralschaden (Huseby et al., 2001, Sun et al., 2001, McPherson et al., 2006, Saxena et al., 2008). In Arbeiten unserer Forschergruppe wurde dieser Effekt des kollateralen Zellschadens anhand vitaler Gehirnschnitte von transgenen Mäusen untersucht. Hierbei wurden OVA-spezifische aktivierte CD8⁺ T-Zellen auf Gehirnschnitte von Tieren gegeben, die selektiv auf ODZ das

Antigen OVA exprimieren. In diesem experimentellen Ansatz konnte der Mechanismus und die Kinetik der Apoptose von ODZ und der kollaterale Zelluntergang von neuronalen Zellen in Neokortex und Hippocampus untersucht werden. Innerhalb dieser Gehirnregionen, verursachte eine einzige CD8⁺ T-Zelle Caspase-3-Aktivität in durchschnittlich 30 verschiedenen ODZ und 10 Neuronen. Diese T-Zell-vermittelte Apoptose war antigen-abhängig. Der kollaterale Zelluntergang der Neuronen, wurde durch einen Überschuss von Granzym und Perforin im extrazellulären Raum verursacht, der entweder direkt von den T-Zellen oder aus der IS stammt, die selektiv mit den antigen-präsentierenden ODZ geformt wurden (Gobel et al., 2010).

Diese beschriebene Freisetzung von zytotoxischen Effektor-Molekülen in den extrazellulären Raum führt zu einer Konzentrationserhöhung dieser Moleküle im Liquor bei verschiedenen entzündlichen Erkrankungen des ZNS (Malmestrom et al., 2008, Takahashi et al., 2009), aber auch zu einer Erhöhung der Konzentration bei diversen peripheren entzündlichen Erkrankungen im Blut (Spaeny-Dekking et al., 1998). Diese Befunde zeigen, dass zytotoxische Effektor-Moleküle, die bei sequentieller und simultaner Zielzell-Interaktion von CD8⁺ T-Zellen aus „leckenden“ IS und einer nicht räumlich begrenzten Abgabe in den extrazellulären Raum akkumulieren und hierbei zu kollateralem Zellschaden führen. Hierbei entsteht neuronaler Zellschaden durch zytotoxische CD8⁺ T-Zellen, die ursprünglich gegen ODZ oder Astrozyten gerichtet waren.

1.8 Unterschiedliche Angriffspunkte von CD8⁺ T-Zellen auf Neuronen des ZNS und mögliche Folgen

Ob ein Neuron durch eine antigen-abhängige CD8⁺ T-Zell-Infiltration in das ZNS beeinflusst wird, ist davon abhängig, ob die T-Zell/Neuron-Interaktion (Abbildung 1.1B) in der weißen oder grauen Substanz des ZNS stattfindet. Ist die Interaktionsseite in der grauen Substanz, also am Soma des Neurons, ist mit der Apoptose des Neurons und damit auch der Schädigung des Axons in der weißen

Substanz zu rechnen. Findet der T-Zell-Angriff jedoch in der weißen Substanz des ZNS statt, ist nur mit einer Schädigung der Axone zu rechnen. In der weißen Substanz, können die Axone entweder direkt durch CD8⁺ T-Zellen geschädigt werden oder durch die Zerstörung der umgebenden Myelinscheide. Dies ist vom Ort der Antigenpräsentation abhängig. In beiden Fällen führen diese Axonschädigungen zu einem Ca²⁺-Einstrom in das Axon. Diese intraaxonale Ca²⁺-Akkumulation führt wiederum zu einer Aktivierung von Ca²⁺-abhängigen Proteasen (Das et al., 2008, Guyton et al., 2005). Dies und die zusätzliche Sekretion von Granzym in das Axonplasma führt zur Aktivierung von Caspasen (Ahmed et al., 2002), welche die proteolytische Degeneration von Teilen des axonalen Zytoskeletts verursacht. Die Schädigung von Teilen des Zytoskeletts sowie von Transportmolekülen und Organellen beeinträchtigen den axonalen Transport. Jedoch ist diese axonale Schädigung in vielen Fällen wieder reversibel (Shriver and Dittel, 2006). Diese Schädigungen führen jedoch zusammen mit einer massiven Erhöhung des intrazellulären osmotischen Druckes durch den Ca²⁺-Einstrom (Hasbani et al., 1998) zu örtlichen Schwellungen (Medana et al., 2001b). Im Verlauf einer andauernden Axon/CD8⁺ T-Zell-Interaktion kann es auch zu einer kompletten Abtrennung des Axons kommen, was meist in einer sogenannten Waller'schen Degeneration mündet (Coleman, 2005). Die Degeneration des proximalen Axons kann bisweilen durch Übertragung von Apoptose-Signalen zum Untergang des gesamten Zellkörpers führen (Hobom et al., 2004, Meyer et al., 2001). Des Weiteren kann aber auch die Zerstörung des distalen Axons zur Apoptose des Somas in der grauen Substanz führen.

Nach Transfer von *in vitro* aktivierten CD8⁺ T-Zellen, konnte in den Empfängermausen ein axonaler Schaden beobachtet werden, der durch direkte Antigenpräsentation von Neuronen (Sanchez-Ruiz et al., 2008) und ODZ (Sun et al., 2001, Saxena et al., 2008) hervorgerufen wird. Einen weiteren indirekten Beweis für die MHC-I/Antigen-abhängige CD8⁺ T-Zell-vermittelte axonale Schädigung konnte in einem demyelinisierenden Virus-Modell nachgewiesen werden, das sogenannte *Theiler's murine encephalomyelitis virus* Modell (TMEV). Mäuse, deren ODZ mit diesem Virus infiziert sind, zeigen massiv demyelinisierte und geschädigte Axone. Mäuse, die eine Mutation in der β_2 -Mikroglobulin-Untereinheit einer Seitenkette des MHC-I-Moleküls haben, zeigen trotz einer

ausgeprägten Demyelinisierung keine Schädigungen der Axone (Rivera-Quinones et al., 1998). Werden in diesem Modell zusätzlich auch CD8⁺ T-Zellen blockiert, zeigen die Mäuse auch keine Demyelinisierung (Johnson et al., 2001). Des Weiteren konnte in diesem TMEV-Modell auch gezeigt werden, dass Perforindefiziente Mäuse, keine Demyelinisierung zeigen. Jedoch waren in TMEV-infizierten Tieren, welche für FasL- bzw. Fas-defizient waren, eine deutliche Demyelinisierung zu beobachten (Howe et al., 2007, Murray et al., 1998). Im Wesentlichen gilt dieser Mechanismus der axonalen Schädigung durch CD8⁺ T-Zellen, auch für die Destruktion von Dendriten in der grauen Substanz (Zhu et al., 2003).

Obwohl in früheren Arbeiten gezeigt wurde, dass die Interaktion zwischen neuronalem FasL und dem T-Zell-Fas-Rezeptor Neurone vor zytotoxischer Granula-Exozytose schützt (Medana et al., 2001a), können CD8⁺ T-Zellen auch direkt Neurone in der grauen Substanz des ZNS attackieren (Sanchez-Ruiz et al., 2008). Auch nach einem adoptiven Transfer von *in vitro* aktivierten Zellen gegen Antigene von ODZ oder Astrozyten, kann ein massiver, kollateraler neuronaler Zelluntergang in der grauen Substanz des ZNS festgestellt werden (Huseby et al., 2001, Troost et al., 1990)

Diese Forschungsergebnisse offenbaren, dass sowohl neuronale Perikarya als auch Neuriten in einem entzündlichen Milieu durch CD8⁺ T-Zellen geschädigt oder gar komplett zerstört werden können. Diese neuronalen Schädigungen können sowohl in der weißen als auch in der grauen Substanz des ZNS nachgewiesen werden.

1.9 Ziel der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die Funktion von CD8⁺ T-Zellen im neuroinflammatorischem Kontext zu untersuchen. Hierbei soll im Besonderen der Mechanismus herausgearbeitet werden, den CD8⁺ T-Zellen bei direktem Kontakt auf Neurone ausüben. Hierbei soll untersucht werden, ob diese neuro-

immunologische Interaktion von einer MHC-I-vermittelten Antigen-Präsentation abhängig ist. Im weiteren Verlauf dieser Arbeit sollen auch mechanistische Aspekte dieser Interaktion berücksichtigt werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden elektrophysiologische, immunhistochemische und molekularbiologische Techniken angewandt. Zunächst wurden die in dieser Arbeit verwendeten Zellen immunhistochemisch charakterisiert. Hierfür wurden die kultivierten Neurone mit dem Neuronenmarker NeuN gefärbt. Des Weiteren wurden die Neurone nach Stimulation auf MHC-I-Expression untersucht. Die verwendeten OT-I T-Zellen wurden mit Hilfe der Durchflusszytometrie auf Expression des TZR sowie CD8 geprüft. Weiterhin wurden Granzym- und Perforin-defiziente CD8⁺ OT-I T-Zellen immunhistochemisch charakterisiert.

Um den antigen-abhängigen Einfluss von CD8⁺ T-Zellen auf Neurone zu untersuchen, wurden T-Zellen des OT-I-Systems verwendet. Dabei wurden zunächst Co-Kulturen mit hippocampalen primären Neuronen und CD8⁺ OT-I T-Zellen angelegt. Anschließend wurden die Neuronen mittels histologischer Färbungen auf Apoptose untersucht. Dabei wurde zwischen antigen-präsentierenden Neuronen und Neuronen ohne Antigen-Präsentation bzw. Neuronen mit einem Kontrollantigen, welches von den OT-I Zellen nicht erkannt wird, unterschieden. Um eine zeitliche Kinetik des neuronalen Zelluntergangs zu detektieren, wurde die histologische Auswertung nach verschiedenen Zeitpunkten der OT-I/Neuronen-Interaktion vorgenommen.

Um einen genaueren Einblick in die zellphysiologischen Vorgänge eines Neurons nach einer T-Zell-Attacke zu bekommen, wurden auch elektrophysiologische Methoden verwendet. Dabei wurden während einer direkten OT-I/Neuron-Interaktion die passiven elektrischen Parameter des Neurons gemessen. Anhand des Membranwiderstandes und der Kapazität konnte der Einfluss einer OT-I Zelle auf das Neuron abgeleitet werden. Unter Applikation von Antikörpern die bestimmte Apoptose-Wege blockieren und die Verwendung von OT-I Zellen, die für diverse Zielzell-schädigende Granula defizient sind, konnte auch eine Aussage über den Mechanismus der CD8⁺ T-Zell-induzierten Apoptose getätigt werden. Um einen weiteren Einblick in den Mechanismus der CD8⁺ T-Zell-Attacke auf Neuronen des ZNS zu erlangen, wurden des Weiteren auch *Ca²⁺-Imaging*-Versuche mit Hilfe der Multi-Photonen-Mikroskopie durchgeführt. Hierbei wurde

der antigen-abhängige Effekt der Ca^{2+} -Akkumulation in Neuronen nach einer OT-I T-Zell-Attacke untersucht.

Um nicht nur eine Aussage auf Einzelzellebene nach einer ZTL/Neuron-Attacke zu erlangen, ist zusätzlich noch der Fokus auf die Aktivität des neuronalen Netzwerks nach einer ZTL-Interaktion gerichtet worden. Hierfür wurden neuronale hippocampale Primärzellen auf einem *Multi-Elektroden-Array* (MEA) kultiviert. Mit diesen MEA's ist es möglich, die spontane Aktivität dieses Neuronen-Netzwerkes zu detektieren. Nach Stimulation und Beladung mit Antigen, analog zu den elektrophysiologischen Messungen, ist es möglich den direkten Einfluss auf die spontane Netzwerkaktivität zu untersuchen.

Die aus diesen verschiedenen experimentellen Ansätzen erlangten Erkenntnisse sollen einen genaueren Einblick in die mechanistische Wirkweise und die Auswirkungen auf neuronale Eigenschaften in einer entzündlichen Läsion geben. Ziel ist es mit diesem neuen Verständnis, die Abläufe des neuronalen Zelluntergangs in neuronalen Autoimmunerkrankungen besser nachvollziehen zu können.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

| | |
|----------------------------------|--|
| 2-Photonen-Mikroskop | T.I.L.L. Photonics Martinsried, Deutschland |
| Analysenwaage | Sartorius, Göttingen Deutschland |
| Beta-Zähler | Perkin Elmer, Waltham USA |
| Elektrophysiologie Mikroskop | |
| Examiner | Zeiss Jena, Deutschland |
| EPC-10 Patch clamp-Verstärker | HEKA Elektronik Lamprecht, Deutschland |
| FACS-Calibur™ | BD Heidelberg, Deutschland |
| Fluoreszenz Mikroskop Axio Scope | Zeiss Jena, Deutschland |
| Inkubator | Heraeus Hanau, Deutschland |
| Magnetrührer | IKA Labortechnik Staufen, Deutschland |
| Mikromanipulator | Luigs Neumann Ratingen, Deutschland |
| Multielektroden-Array (MEA) | Multi Channel Systems Reutlingen, Deutschland |
| Photometer Thermomultiscan | Thermofisher Schwerte, Deutschland |
| Pipette-Puller PIP 6 | HEKA Elektronik Lamprecht, Deutschland |
| Präparierbesteck | Fine Science Tools Heidelberg, Deutschland |
| Stereomikroskop Stemi 1000 | Zeiss Jena, Deutschland |
| Sterilbank Heraeus, Hanau | Heraeus Hanau, Deutschland |
| Zentrifuge | Heraeus Hanau, Deutschland |

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

| | |
|-------------------------------|---|
| 1,5 ml Reaktionsgefäße | Eppendorf Hamburg, Deutschland |
| 15 ml / 50 ml Reaktionsgefäße | Greiner Bio-One, Frickenhausen |
| 50 ml Reaktionsgefäße | Greiner Bio-One, Frickenhausen |
| Borosilikatglaspipetten | Clark Electromedical Instruments, Pangbourne; Großbritannien |
| Deckgläser Ø 12mm | Menzel Gläser Braunschweig, Deutschland |
| Mikrotiterplatten (ELISA) | Nunc Wiesbaden, Deutschland |
| Objektträger | Menzel Gläser Braunschweig, Deutschland |
| Pipettenspitzen | Sarstedt Nümbrecht, Deutschland |
| Schutzhandschuhe | Braun Melsungen, Deutschland |
| Sterilfilter | Nalgene Hereford, Großbritannien |
| Zellkulturplatten | Nunc Wiesbaden, Deutschland |

2.1.3 Chemikalien

| | |
|----------------------------------|---|
| BAPTA | Sigma-Aldrich Schnelldorf, Deutschland |
| CaCl | Merck Darmstadt, Deutschland |
| Dextrose | Merck Darmstadt, Deutschland |
| Glucose | Merck Darmstadt, Deutschland |
| HEPES | Sigma-Aldrich Schnelldorf, Deutschland |
| K ₃ -Citrat | Sigma-Aldrich Schnelldorf, Deutschland |
| KCl | Merck Darmstadt, Deutschland |
| K-Gluconat | Sigma-Aldrich Schnelldorf, Deutschland |
| Mg-ATP | Sigma-Aldrich Schnelldorf, Deutschland |
| MgSO ₄ | Merck Darmstadt, Deutschland |
| NaCl | Merck Darmstadt, Deutschland |
| Na-GTP | Merck Darmstadt, Deutschland |
| NaH ₂ PO ₄ | Merck Darmstadt, Deutschland |
| Natriumbicarbonat | Gibco (life technologies) Darmstadt, Deutschland |

| | |
|----------------|---|
| Natriumpyruvat | Gibco (life technologies) Darmstadt, Deutschland |
| Triton-X100 | Sigma-Aldrich Schnelldorf, Deutschland |

2.1.4 Puffer und Lösungen

| | |
|-----------------------|---|
| ELISA-Waschpuffer | 0,05% Tween-20 in PBS |
| extrazelluläre Lösung | 120mM NaCl 2,5mM KCl 1,25mM NaH ₂ PO ₄ 30mM HEPES 2mM MgSO ₄ 2mM CaCl ₂ 10mM Dextrose pH auf 7,25 einstellen |
| FACS Puffer | 0,1% BSA 0,1% Natriumazid in PBS |
| interne Lösung | 95mM K-Glukonat 20mM K3-Citrat 10mM NaCl 10mM HEPES 1mM MgCl ₂ 0,5mM CaCl ₂ 3mM BAPTA 3mM Mg-ATP 0,5mM Na-GTP pH auf 7,25 einstellen |

| | |
|--------------------------------|---|
| Lysepuffer | 150 mM NH ₄ Cl 10 mM KHCO ₃ 0,1 mM EDTA pH auf 7,3 einstellen |
| Phosphat-gepufferte Salzlösung | 0,14 M NaCl 2,7 mM KCl 3,2 mM Na ₂ HPO ₄ 1,5 mM KH ₂ PO ₄ pH auf 7,4 einstellen |

2.1.5 Biochemikalien, Medien und Supplemente

| | |
|--------------------------|---|
| 0,05% Trypsin-EDTA | Gibco (life technologies) Darmstadt, Deutschland |
| Arabinosyl-Cytosin | Sigma-Aldrich Schnelldorf, Deutschland |
| B27 Supplement | Gibco (life technologies) Darmstadt, Deutschland |
| Bis-Fura-2 | Molecular Probes (life technologies) Darmstadt, Deutschland |
| DABCO | Sigma-Aldrich Schnelldorf, Deutschland |
| DAPI | Sigma-Aldrich Schnelldorf, Deutschland |
| DMEM | PAA Pasching, Österreich |
| Fetales Kälber Serum | PAA Pasching, Österreich |
| Gentamicin | Gibco (life technologies) Darmstadt, Deutschland |
| HBSS | Gibco (life technologies) Darmstadt, Deutschland |
| HEPES | Gibco (life technologies) Darmstadt, Deutschland |
| Interferon- γ | PeptoTech Rocky Hill, USA |
| Interleukin-2 | PeptoTech Rocky Hill, USA |
| Ionomycin | Sigma-Aldrich Schnelldorf, Deutschland |
| L-Glutamin | Gibco (life technologies) Darmstadt, Deutschland |
| MEM | PAA Pasching, Österreich |
| Mercaptoethanol | Gibco (life technologies) Darmstadt, Deutschland |
| Non-Essential Amino Acid | Gibco (life technologies) Darmstadt, Deutschland |

| | |
|---------------------------|--|
| Nystatin | Sigma-Aldrich Schnelldorf, Deutschland |
| Penicillin / Streptomycin | Biochrom Berlin, Deutschland |
| Pferdeserum | PAA Pasching, Österreich |
| Poly-D-Lysin | Sigma-Aldrich Schnelldorf, Deutschland |
| Propidium Iodid | Sigma-Aldrich Schnelldorf, Deutschland |

2.2 Tierexperimentelle Methoden

Alle Versuchstiere wurden in der Institutseigenen Tierhaltung gehalten, unter pathogenfreien Bedingungen und freiem Zugang zu Futter und Wasser. Die Experimente wurden durchgeführt unter Einhaltung des deutschen Tierschutzgesetzes und mit Genehmigung der zuständigen Behörde (Regierung von Unterfranken).

2.3 OT-I Maus-System

Die OVA-spezifischen CD8⁺ T-Lymphozyten (OT-I) wurden direkt aus Milzen von TZR spezifischen Mäusen gewonnen. Diese Mäuse sind transgen für einen einzigen TZR (Hogquist et al., 1994), welcher ausschließlich eine Peptidsequenz des aus dem Huhn stammenden OVA-Protein erkennt.

Die Mäuse wurden mit CO₂ getötet, bevor die Milz zügig entnommen und in „*Dulbecco's Modified Eagle Medium*“ (DMEM) (PAA Pasching, Österreich) mit der folgenden Zusammensetzung (1% fetalem Kälberserum (FKS) (PAA Pasching, Österreich), 1% L-Glutamin (Invitrogen Karlsruhe, Deutschland) und 1% Penicillin/Streptomycin (Biochrom Berlin, Deutschland)) überführt wurde. Durch entsprechendes Zerkleinern und Zerstoßen der Milz konnten die darin enthaltenen

Zellpopulationen, wie zum Beispiel T- und B- Lymphozyten, Vorläuferzellen der T- und B- Lymphozyten und Erythrozyten, isoliert und in DMEM gewaschen werden. Um die Zellen noch weiter zu vereinzeln und um sie von extrazellulärem Gewebe zu trennen, wurden die Zellen im Waschmedium mit folgender Zusammensetzung (DMEM; 1% L-Glutamin, 200mM; 1% Penicillin/Streptomycin; 1% FKS) durch ein Nylonsieb mit einer Porenweite von 70µm gefiltert. Nach Zentrifugieren der Zellen bei 1500 rpm für 5 min wurde das Pellet im Verhältnis 2:1 für 5 min in Lysepuffer (in mM: 150 NH₄Cl, 10 KHCO₃, 0,1 EDTA, pH 7,3) inkubiert. Durch diesen Schritt wird gewährleistet, dass durch osmotische Lyse die Erythrozyten in der Zellpopulation zerstört werden. Nach diesem Schritt wurden die verbliebenen Lymphozyten erneut bei 1500 rpm für 5 min zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen und das Pellet wurde in 10 ml DMEM mit 1% FKS aufgenommen und mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer quantifiziert. Daraufhin wurden die OT-I T-Lymphozyten in Aliquots von 1x10⁷ Zellen in Einfriermedium der folgenden Zusammensetzung: 45% DMEM, 45% FKS, 10%Dimethylsulfoxid (DMSO) bei -80°C eingefroren.

2.4 Aktivierung und Stimulation von T-Lymphozyten

Wie oben erwähnt wurden für die Experimente ZTL aus bei -80°C tiefgefrorenen Aliquots verwendet. Hierbei war es wichtig, die tiefgefrorenen Zellen schnell aufzutauen und in Splenozyten-Medium zu überführen. Dazu wurde in einem 15 ml Reaktionsgefäß 9 ml Splenozyten-Medium (DMEM; 10 mM HEPES; 25 µg/ml Gentamicin; 50 µM Mercaptoethanol; 5% FCS; 2 mM L-Glutamin; 1% *Non-Essential Amino Acid* (NEAA)) vorgelegt. Im nächsten Schritt wurden die Zellen im Wasserbad bei 37°C aufgetaut und unverzüglich ins vorgelegte Splenozyten-Medium überführt. Daraufhin wurden die Zellen bei 1500 rpm für 5 min abzentrifugiert und der Überstand wurde verworfen. Das Zellpellet wurde in 5 ml Splenozyten-Medium resuspendiert. Zum Aktivieren und „Primen“ der T-Lymphozyten wurden 2,5 µl IL-2 (500 U/ml) und 1 nM OVA Peptid zu den Zellen

gegeben. Die so stimulierten Zellen wurden in eine 6-well-Kulturschale überführt und für insgesamt fünf Tage in einem Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Nach zwei Tagen wurden nochmals 2,5 µl IL-2 zur Aktivierung zugegeben. Nach fünf Tagen Kultivierung und Stimulation haben die OT-I Lymphozyten den optimalen Stimulationsgrad erreicht (Hogquist et al., 1994).

2.5 Präparation embryonaler Hippocampus-Neuronen

Der Hippocampus wurde aus 18 Tage alten Embryonen (Embryonalstadium: E18) von C57/Bl6 isoliert.

Hierfür wurden trächtige C57/Bl6 Mäuse durch Genickbruch getötet. Nach Öffnen des Bauchraumes durch jeweils einen Schnitt medial und quer, konnten die Embryonen mit dem Uterus entnommen werden. Unmittelbar nach der Entnahme wurden die Embryonen in eine Kulturschale mit einem Durchmesser von 10 cm mit vorgekühlter *Hanks balanced salt solution* (HBSS) (10% 10xHBSS (Invitrogen Karlsruhe, Deutschland, 1% Penicillin/Streptomycin (Biochrom AG Berlin, Deutschland), 10 mM HEPES (Invitrogen Karlsruhe, Deutschland) überführt. Durch einen Schnitt in die Plazenta konnten die Embryonen aus dem Uterus entnommen werden. Daraufhin wurden die Embryonen dekapiert und die Köpfe wurden in eine neue Kulturschale mit frischem HBSS überführt. Unter sterilen Bedingungen und mit Hilfe einer Stereolupe wurden die Schädeldecken mit dünnen Pinzetten entfernt und das gesamte Gehirn aus dem Schädel entnommen. Nach Entfernen der Meningen wurden die beiden Hemisphären des Telencephalon abgetrennt. Aus den beiden Hemisphären konnte nun der Hippocampus präpariert werden. Unmittelbar nach Präparation der Hippocampi wurden diese in 5 ml 1x 0,05% Trypsin-mit Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) (Invitrogen Karlsruhe, Deutschland) überführt und in einem Wasserbad bei 37°C für 5 min inkubiert. Im Anschluss daran wurden die Hippocampi 3x mit 5 ml HBSS gewaschen und in 1 ml Neuronenmedium (10% 10x *modified earl's medium* (MEM), 0.2205% Natriumbikarbonat, 1 mM Natriumpyruvat, 2 mM L-Glutamine;

2% B27 Supplement (Invitrogene Karlsruhe, Deutschland); 3.8 mM Glucose, 1% Penicillin/Streptomycin (Biochrom AG Berlin, Deutschland)) aufgenommen. Die Neuronen wurden durch mehrmaliges Triturieren des Gewebes, mittels Pasteurpipetten mit abnehmendem Spitzendurchmesser vereinzelt. Nach quantitativer Bestimmung der Zellen wurden diese jeweils mit 1 ml in 4-well-Kulturschalen zu 60.000 Zellen pro Vertiefung ausplattiert. Zuvor wurde in jede Vertiefung ein entfettetes mit *Poly-D-Lysin* (Sigma-Aldrich Schnelldorf, Deutschland) beschichtetes Deckglas platziert und mit 500 µl DMEM gefüllt. Nach Aussaat der Zellen wurden diese im Inkubator bei 5% CO₂ und 37°C kultiviert. Zur Verhinderung, dass neben den postmitotischen Neuronen sonstige Zellen proliferieren, (z.B Astrozyten) wurde nach 48 h das Basenanalogen Arabinosyl-Cytosin (Sigma-Aldrich Schnelldorf, Deutschland) in einer Endkonzentration von 3 µM zugegeben.

5 – 10 Tage nach der Präparation zeigten die neuronalen Zellen ein typisches Wachstum und konnten für die Experimente verwendet werden.

2.6 Immunhistochemie von neuronalen Zellkulturen

Bevor die primären Neuronenkulturen für weitere immunhistochemische Untersuchungen verwendet wurden, wurde zunächst das Kulturmedium abgenommen und die Zellen wurden in der Kulturschale mit 1 ml 1x Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS) gewaschen. Im folgenden Schritt wurden die Zellen zur Fixierung in 1 ml 4% Paraformaldehyd (PFA) für 20 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Nach der Fixierung wurden die Zellen ein weiteres Mal mit 1 ml 1x PBS gewaschen. Um unspezifische Proteinbindungsstellen zu blockieren und somit falsch-positive Antikörperbindungen zu vermeiden, wurden die Zellen für 20 min bei RT in 1 ml 10% Blockreagenz (1x PBS 10% Pferdeserum (NHS), 0,2% Triton-X-100) inkubiert. Nach einem erneuten Waschschriff mit 1 ml 1% Blockreagenz (1xPBS, 1% NHS) wurde der primäre Antikörper in entsprechender Verdünnung (Tabelle 2.1) in 1% Blockreagenz und in einem Volumen von jeweils

200 µl pro Kulturschale bei 4°C über Nacht auf die Zellkulturen gegeben. Alle verwendeten Antikörper wurden in Vorexperimenten zur Dosisfindung in entsprechenden Probefärbungen austitriert.

Tabelle 2.1

| primäre Antikörper | Klon | Firma | Verdünnung |
|---------------------------------|-------------|-----------------------------|-------------------|
| Maus anti-MAPIIa/b | AP20 | Abcam | 1:200 |
| Ratte anti-MHC-I | ER-HR 52 | Abcam | 1:200 |
| Kaninchen anti-Granzym B | polyclonal | Abcam | 1:100 |
| Ratte anti-Perforin | CB 5.4 | Abcam | 1:100 |
| Kaninchen anti-Caspase 3 | 5A1E | CellSignaling Technology | 1:200 |
| Hamster anti-FasL | MFL4 | BD Pharmingen | |
| sekundäre Antikörper | | Firma | Verdünnung |
| Alexa Fluor 488 Ziege anti-Maus | polyklonal | Invitrogen | 1:100 |
| Cy-3 Ziege anti-Kaninchen | polyklonal | Dianova | 1:100 |
| Cy-3 Ziege anti-Ratte | polyklonal | Dianova | 1:100 |

Im Anschluss wurden die Zellen 3x jeweils 5 min in 1xPBS gewaschen. Danach wurde der sekundäre Antikörper jeweils in einem Volumen von 200µl je Kulturschale in der angegebenen Verdünnung in 1xPBS für 1h bei RT auf die Neurone gegeben. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen ein weiteres Mal (je 3x 5min in 1 ml 1xPBS) gewaschen. Im Anschluss an die Antikörperfärbung wurde eine Kernfärbung mit 4'6 Diamidino-2-phenylidole dihydrochloride (DAPI) (Sigma Aldrich Deisenhofen, Deutschland) durchgeführt. Hierfür wurde eine DAPI Stocklösung 1:5000 auf eine Endkonzentration von 0.5 g/ml mit PBS verdünnt. Hiervon wurde jeweils 200 µl je Deckglas auf die Neuronenkulturen gegeben.

Um zu gewährleisten, dass die fluoreszenz-markierten Zweitantikörper nicht unspezifisch an Epitope binden, wurden für alle histologischen Färbungen auch Negativkontrollen durchgeführt. Hierbei wurden die Färbungen analog wie oben beschrieben durchgeführt, nur mit dem Unterschied, dass die Neuronenkulturen nicht mit den entsprechenden primären Antikörper behandelt wurden und somit keine spezifischen Bindestellen für die Zweitantikörper vorhanden waren.

Zur Auswertung und Archivierung der histologischen Präparate, wurden die Zellen auf Objektträger mit DABCO® (Sigma Aldrich Deisenhofen, Deutschland) eingebettet und lichtgeschützt bei +4°C gelagert.

2.7 Charakterisierung neuronaler Zellkulturen mit Propidium-Iodid

Um den Zelltod von Hippocampusneuronen, nach Co-Kultivierung mit ZTL zu bestimmen, wurden die Neuronen mit dem Nekrosemarker Propidium Iodid (PI) gefärbt. PI ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der sich in die *minor groove* von DNA Molekülen interkaliert und unter Bindung an die DNA bei einer Anregung von 488 nm fluoresziert. Aufgrund der Molekülstruktur kann PI keine intakten Zellmembranen passieren und damit nur Zellkerne nekrotischer Zellen färben.

Um die Anzahl von nekrotischen Hippocampusneuronen nach Co-Kultivierung mit ZTL zu bestimmen, wurden die Neuronenkulturen 1x 5 min mit 1 ml PBS gewaschen. Im nächsten Schritt, wurden die Neuronen mit 4% PFA für 20 min bei RT fixiert. Danach wurden die Zellen nochmal mit 1 ml 1xPBS gewaschen. Nach diesem Waschschrift wurden die Neuronen mit 57.14 ng/ml PI (Merck Darmstadt, Deutschland) für 5 min inkubiert. Anschließend wurden die Zellkerne analog zur immunhistochemischen Färbung mit DAPI (Sigma Aldrich Deisenhofen, Deutschland) gefärbt und mit DABCO®(Sigma Aldrich Deisenhofen, Deutschland) eingebettet.

2.8 Immunhistochemische Charakterisierung von T-Lymphozyten

Zur histologischen Charakterisierung der zytotoxischen CD8⁺ OT-I T-Zelllinien sowie der Granzym B- und Perforin-defizienten OT-I-T-Zellen wurden die Lymphozyten nach Stimulation analog zu den primären Neuronen auf PDL beschichteten Deckgläschen kultiviert. Nachdem sich die T-Lymphozyten nach 24 h auf dem Boden der Kammer angehaftet hatten, konnten die Zellen mit 4% PFA bei 4°C für 1 h fixiert werden. Im Anschluss wurden die Zellen mit 1 ml 1xPBS gewaschen. Im nächsten Schritt wurden die Zellen zur Blockierung der unspezifischen Bindungsstellen in 10% BSA, 1% Ziegen-Serum und 0,3% Triton-X100 in PBS für 1 h bei RT geblockt. Nach Entfernen des Blockierungsreagenz wurde mit dem jeweiligen Primärantikörper (Tabelle 2.1) in entsprechender Verdünnung in PBS (1% BSA) über Nacht bei 4°C inkubiert. Danach wurden die Zellen 3x für 5 min in 1 ml 1xPBS gewaschen. Die Inkubation mit dem jeweiligen sekundären Antikörper erfolgte in der aufgeführten Verdünnung in 1xPBS für 1 h bei RT (Tabelle 2.1). Im Anschluss erfolgten drei weitere Waschschrte. Zur Kerngegenfärbung wurden die Zellen mit DAPI in der Verdünnung 1:5000 für 5 min bei RT gefärbt und danach 3x 5 min in 1xPBS gewaschen.

Analog zur immunhistologischen Färbung der Neuronenkulturen wurde auch hier eine Negativkontrolle ohne primären Antikörper durchgeführt.

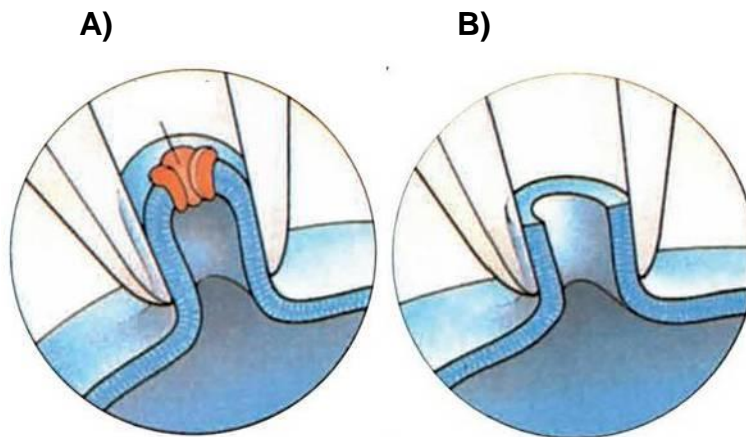
Zum Auswerten und Archivieren der Präparate wurden die Zellen mit DABCO[®] eingebettet und bei 4°C gelagert.

2.9 Elektrophysiologie

Elektrische Parameter spielen nicht nur in Zellen des Nervensystems eine entscheidende Rolle, auch in nahezu allen anderen Körperzellen übernehmen

diese Parameter wichtige Aufgaben der Zellkommunikation und des Zellmetabolismus. Schon seit den 50-iger Jahren ist es möglich, elektrische Ströme, die durch Ionen über die Zellmembran fließen, zu messen. Allerdings war diese Technik bis in die 70-iger Jahre so niedrigauflösend, dass damit keine Aussagen über das Verhalten zum Beispiel einzelner Ionenkanäle getätigt werden konnten. 1976 wurde von Erwin Neher und Bert Sakmann die sogenannte „*patchclamp*“-Technik eingeführt, für die sie im Jahr 1991 den Nobelpreis für Physiologie oder Medizin erhalten haben. Das Grundprinzip dieser Technik besteht darin, eine äußerst dünne Glaspipette so auf eine Zelle aufzusetzen, dass diese durch dichtes Abschließen mit der Zellmembran einen sogenannten Membranfleck (*patch*) von der Umgebung isoliert. Dabei müssen der Rand der Pipettenöffnung und die Zellmembran so dicht abschließen, dass so gut wie kein elektrischer Strom zwischen Pipette und Membran vorbeifließen kann. Der Widerstand einer solchen Konfiguration sollte größer als 1 Million Ohm ($G\Omega$) sein und wird auch als „*Gigaseal*“ bezeichnet. Dieser Zustand wird auch „*Cell-Attached-Konfiguration*“ genannt (Abbildung 2.1 A). Ist dieser Serienwiderstand erreicht, kann man nun entweder einzelne Kanäle, die man so im Membranfleck isoliert hat, ableiten oder man versucht durch vorsichtiges ruckartiges Saugen an der Pipette den Membranfleck aus der Zellmembran herauszulösen (*wholecell-Konfiguration* Abbildung 2.1B). Dadurch kann man sowohl sämtliche Ionenströme, die über die Zellmembran fließen, ableiten, als auch durch Manipulation des Zytoplasmas oder der extrazellulären Flüssigkeit die Aktivität bestimmter Ionenkanäle isolieren. Des Weiteren kann man mit dieser Technik auch die elektrische Kapazität bestimmen, die an der Zellmembran anliegt, und dadurch Aussagen über die Fläche der Zellmembran tätigen.

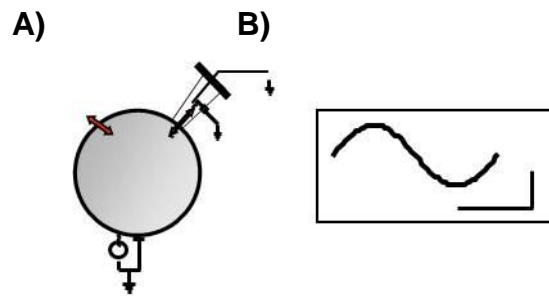
Abbildung 2.1



Schematische Darstellung einer „cellattached“ Konfiguration (A). In diesem Modus schließt die Patchpipette dicht mit der Zellmembrane ab und isoliert somit einen Membranleck. **(B)** Darstellung einer „wholecell“ Konfiguration. In dieser Konfiguration ist der Membranleck in der Pipette entfernt und es können alle Ströme, die über die Zellmembran fließen, gemessen werden (Grafik modifiziert nach Neher und Sakman SdW 5 1992).

Um funktionell-mechanistische Aussagen über die Zell-Zellkontakt-abhängige Interaktion zwischen ZTL und Neuronen des ZNS beschreiben zu können, wurden die folgenden passiven elektrophysiologischen Parameter direkt von den betroffenen Neuronen mit Hilfe der *wholecell-Patch-Clamp*-Technik abgeleitet: Membranwiderstand (R_m), Membrankapazität (C_M) und Serienwiderstand (R_s). Dabei ist zu beachten, dass sich der Membranwiderstand umgekehrt proportional zur Membranleitfähigkeit verhält ($R_M = 1/G_M$). Um diese passiven elektrischen Parameter zu untersuchen, wurden primäre murine hippocampale Neurone mit einem sinus-förmigen Reizprotokoll (Frequenz 500Hz, Amplitude von ± 20 mV; Abbildung 2.2) bei einem Haltepotential von -80 mV stimuliert (Hallermann et al., 2003).

Abbildung 2.2



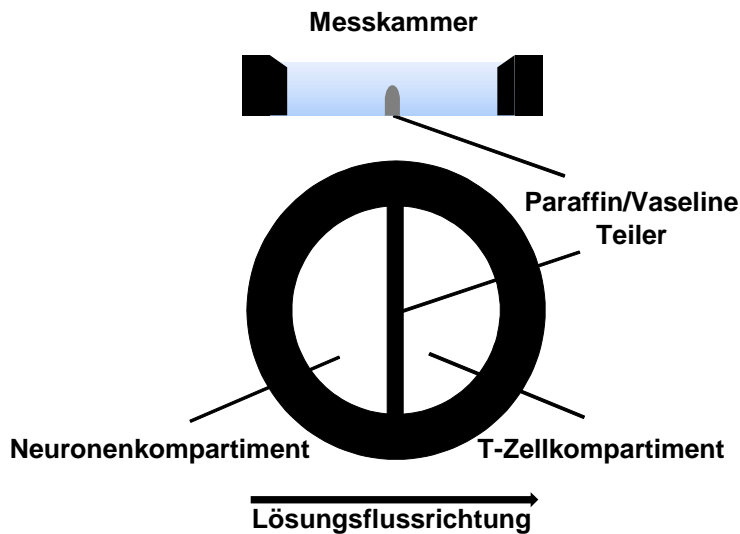
Ersatzschaltbild (A) und Reizprotokoll (B). Im Ersatzschaltbild ist schematisch die *wholecell*-Konfiguration der Neuronenableitung mit Reizelektrode, Erdung und über die Membran fließenden Ströme (roter Doppelpfeil) gezeigt. Das Reizprotokoll (B) zeigt das 500 Hz Sinus-Protokoll mit der Amplitude von 20mV.

Um zu verhindern, dass bei diesem Reizprotokoll spannungsgesteuerte Ionenkanäle aktiviert werden, wurden die Zellen bei einem Haltepotential von -80 mV geklemmt und entsprechend langsame Änderungen der Membranauslenkung (500 Hz) ausgelöst. Alle Zellen wurden vor Applikation des Reizprotokolls für 5 min unter Kontrollbedingungen gemessen; nur Zellen mit einem Membranruhepotential unter -55 mV wurden in die Untersuchungen aufgenommen. Die Messung wurde für 10 -15 min ausgeführt. Es wurden nur Messungen zur Auswertung verwendet, bei denen Schwankungen des Serienwiderstandes <15% über den gesamten Messzeitraum vorlagen.

2.10 *Patch-Clamp*-Ableitungen in primären Neuronenkulturen

Um selektiv die Interaktion zwischen Neuronen und ZTL charakterisieren zu können, wurden beiden Zelltypen zunächst getrennt in einer Messkammer gehalten. Zu diesem Zweck wurde die Messkammer mittels eines Paraffin-Vaseline-Gemisches in zwei getrennte Segmente aufgeteilt (Abbildung 2.3).

Abbildung 2.3

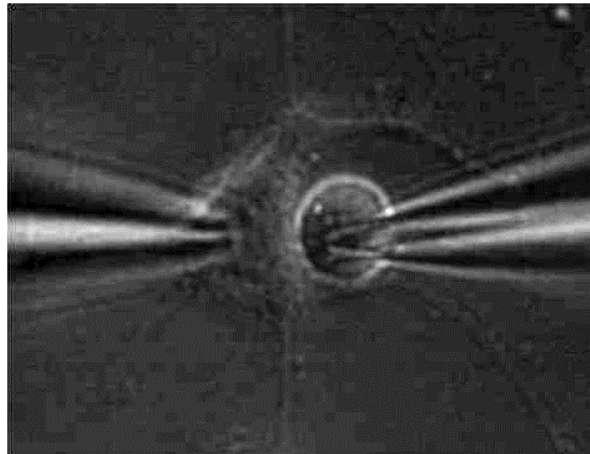


Schematische Darstellung der in zwei Kompartimente unterteilten Messkammer.

Hierfür wurde dieses Gemisch zunächst bei ca. 100°C geschmolzen. Danach kann es mit einem feinen Pinsel in der Mitte der Messkammer aufgebracht werden, so dass es diese nach dem Erstarren in zwei Kompartimente unterteilt. Nach Einbringen des Deckglases mit den adhärenenten primären murinen Neuronen in die linke Seite der Messkammer und der anschließenden Zugabe der OT-I ZTL in die rechte Seite der Messkammer, konnte diese unter die Optik eines Mikroskops (Axioskop Zeis, Deutschland) eingebracht werden. Um die Zellen konstant mit Sauerstoff und Glukose zu versorgen, wurde ein konstanter Durchfluss einer extrazellulären Messlösung (siehe unten) mit einer Schlauchpumpe etabliert. Dabei wurde stets darauf geachtet, dass der Fluss dieser Lösung auf der Seite der Neuronen ein- und auf der Seite der Immunzellen ausgeleitet wurde, so dass davon ausgegangen werden konnte, dass neben der oben beschriebenen Separation der Zellen auch keine löslichen Faktoren von Immunzellen an die Neuronen gelangen konnten. Mittels einer Manipulationspipette (Pipette2), die mit einem Mikromanipulator (Luigs-Neumann, Deutschland) gesteuert wurde, wurden einzelne T-Zellen aus dem T-Zellkompartiment in das Neuronkompartiment

transferiert (Abbildung 2.4) und dort mit einem einzelnen Neuron in Kontakt gebracht.

Abbildung 2.4



Zell-Zell-Kontakt zwischen einem primären murinen Neuron und einer OT-I Zelle. Links Messpipette in *wholecell*-Konfiguration auf einem Neuron. Rechts, Manipulationspipette mit OT-I Zelle, die mit dem Neuron in Kontakt gebracht wird.

Alle Ableitungen wurden bei RT an primären murinen hippocampalen Neuronen von C57Bl/6 Mäusen an Tag 5 -10 nach der Präparation durchgeführt. Dabei wurden die Zellkulturen in einer extrazellulären Lösung der folgenden Zusammensetzung gehalten (in mM): NaCl, 120; KCl, 2.5; NaH₂PO₄, 1.25; HEPES, 30; MgSO₄, 2; CaCl₂, 2; und Dextrose; 10. Der pH-Wert wurde mittels HCL auf 7.25 eingestellt. Die elektrophysiologischen Signale wurden mit Borosilikatglaspipetten (GC150TF-10, Clark Electromedical Instruments, Pangbourne; Großbritannien), die über einen chlorierten Silberdraht mit einem EPC-10 Verstärker (HEKA Elektronik, Lamprecht, Deutschland) verbunden wurden, aufgezeichnet. Der Elektrodenwiderstand der Pipetten lag bei 4 – 6 MΩ. Der Eingangswiderstand entsprach dem 2 - 3 fachen Pipettenwiderstand. Die Pipetten wurden mit einer internen Lösung mit folgender Zusammensetzung gefüllt (in mM): K-Glukonat, 95; K₃-Citrat, 20; NaCl, 10; HEPES, 10; MgCl₂, 1; CaCl₂, 0.5; BAPTA, 3; Mg-ATP, 3; Na-GTP, 0.5. Der pH-Wert wurde mittels HCl auf einen

Wert von pH 7.25 gesetzt. Die Osmolalität lag bei 295mOsm/kg. Einige Experimente wurden unter Zugabe des aus der *perforated patch-clamp*-Technik bekannten Antimykotikums Nystatin (200µg/ml), welches Membranporen bildet, durchgeführt (Holz and Finkelstein, 1970)

2.11 Kalzium-Imaging mittels 2-Photonen-Mikroskopie

In den zellulären Mechanismen, die zur Apoptose und Nekrose von Nervenzellen führen, spielt ein massiver Einstrom von Ca^{2+} -Ionen in die Zielzelle eine wesentliche Rolle und trägt somit zum Zelltod bei. Um Aussagen über den durch ZTL induzierten Kalziumstrom im Neuron nach T-Zell-Interaktion treffen zu können, wurde die 2-Photonen-Mikroskopie eingesetzt. Hierfür wurde ein analoges experimentelles Design wie bei den elektrophysiologischen Messungen verwendet.

Um intrazelluläre Ca^{2+} -Änderungen in den Neuronen detektieren zu können, wurden diese mit dem Ca^{2+} -Chelator Bis-Fura-2 (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) beladen. Bis-Fura-2 ist ein Ca^{2+} -Chelator, der mit einer Anregungswellenlänge von 338 nm angeregt wird und Licht im sichtbaren Bereich (ca. 510 nm) emittiert. Dabei ist die Emmisionsrate direkt proportional zur Ca^{2+} -Konzentration. Somit ist es möglich über die Änderung der Emmisionsrate eine direkte Aussage über die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration zu treffen. Als Positivkontrolle für einen selektiven Ca^{2+} -Einstrom wurde Ionomycin verwendet. Ionomycin bildet in der Membran eine Ca^{2+} -selektive Pore (Liu and Hermann, 1978). Über die extrazelluläre Lösung wurde Ionomycin (50 µM) den Neuronen zugegeben. Alle Messungen wurden mit einem 2-Photonen-Mikroskop (T.I.L.L. Photonics, Martinsried, Deutschland; Meis et al. 2007) durchgeführt. Die Anregung wurde durch einen Ti/saphir Laser (Verdi, Coherent, Santa Clara) realisiert. Das Mikroskop war mit einer FV300 Software (Olympus, Japan) ausgestattet. Der Laser wurde durch ein 40x Wasserinversionobjektiv (LUMPlanFI/IR, N.A. 0.8, Olympus, Japan) fokussiert. Das vom Fluoreszenzfarbstoff emittierte Licht, wurde

nach Passieren eines IR Filters (BG39, Chroma Technology Corp., Rockingham, VT, USA) von einem externen Photomultiplier (Hamamatsu Photonics, Deutschland) detektiert.

2.12 Charakterisierung der OT-I T-Lymphozyten sowie der Granzym B- und Perforin-defizienten OT-I T-Lymphozyten mit Hilfe der Durchflusszytometrie

Nach fünf Tagen Stimulation der OT-I ZTL wurden die Zellen mittels der Durchflusszytometrie auf ihre Reinheit untersucht. Hierfür wurden 1×10^6 Zellen in 100 μ l Splenozyten-Medium aufgenommen und sowohl mit PE-markierten CD8 anti-Maus Antikörpern als auch mit FITC-markierte CD4 anti-Maus Antikörpern für 20 min bei 4°C inkubiert. Als Isotypkontrolle wurden die T-Zellen entweder mit PE-markierten anti-Maus IgG1 oder FITC-markierten anti-Maus IgG1 (Tabelle 2.2) inkubiert. Nach der Antikörperfärbung wurden die Zellen mit 1500 rpm bei 4°C zentrifugiert und in 100 μ l FACS-Puffer mit folgender Zusammensetzung: 0,1% BSA, 0,1% Natriumazid in 1xPBS, resuspendiert. Unmittelbar darauf folgte die Messung der markierten Oberflächenproteine mit dem FACS-Calibur™ System (BD Heidelberg, Deutschland). Die Auswertung der Daten erfolgte mit der Cell Quest™ Software.

Tabelle 2.2

| Antikörper | Klon | Firma | Verdünnung |
|------------------------------|--------|---------------|------------|
| FITC-markiert anti-Maus CD4 | RPA-T4 | BD Pharmingen | 1 :50 |
| FITC-markiert anti-Maus IgG1 | | BD Pharmingen | 1 :50 |
| PE-markiert anti-Maus CD8 | 53-6.7 | BD Pharmingen | 1 :50 |
| PE-markiert anti-Maus IgG1 | | BD Pharmingen | 1 :50 |

2.13 INF- γ ELISA

Um die Effektor-Funktion der OT-I T-Lymphozyten sowie der Granzym B- und Perforin-defizienten OT-I T-Lymphozyten zu zeigen, wurde die INF- γ Sekretion mit Hilfe eines *enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA) gemessen.

Basierend auf dem Sandwich-Prinzip ist es möglich, mittels immobilisierter spezifischer Antikörper, in Lösung befindliche Verbindungen, wie z.B. Proteine oder niedermolekulare Verbindungen, zu detektieren und zu quantifizieren. Die Detektion erfolgt indirekt mithilfe eines Zweitantikörpers, der mit einem weiteren enzym-gekoppelten Antikörper und dem Antigen-gebundenen immobilisierten primären Antikörper einen Komplex bildet. Durch Zugabe eines geeigneten Substrates erfolgt die Umsetzung eines Chromogens zu einem Farbstoff. Anhand der Intensität des Farbstoffes, die proportional zu den gebundenen Antikörpern ist, kann die Menge der zu detektierenden Verbindung quantifiziert werden.

Um die INF- γ Sekretion der ZTL zu bestimmen, wurde der Überstand nach 5 Tagen Stimulation entnommen. Die Proben wurden mit einem ELISA Kit (R&D Systems, Abingdon, England) gemäß den Empfehlungen der Hersteller durchgeführt. Nach Abstoppen der Reaktion mit $2\text{NH}_2\text{SO}_4$ wurde die Farbtintensität unverzüglich an einem Photometer-Thermomultiskan (Thermofisher Schwerte, Deutschland) bei 450 nm Wellenlänge bestimmt.

2.14 ^3H Thymidin-Inkorporationsassay

Ein weiterer Marker für T-Zellaktivität und Vitalität ist neben der Zytokinsekretion die Zellproliferation nach geeigneter Stimulation. Dafür wurden die OT-I ZTL wie oben beschrieben mit IL-2 stimuliert.

Eine Methode die Zellproliferation zu quantifizieren, bietet der Einbau von radioaktiv markiertem ^3H -Thymidin. Bei dieser Methode ist der Einbau von

radioaktivem Thymidin in die neu synthetisierte DNA bei der Zellteilung direkt proportional zur messbaren Radioaktivität.

In den letzten 16 h des 5 Tage dauernden OT-I-Stimulationsprotokolls wurden die Zellen in eine 96-*well*-Kulturplatte ausgesät. Pro *well* wurden ca. 1×10^5 Zellen in 100 μl Medium plattiert. Danach wurde jeweils in ein *well* 25 μl ^3H Thymidin zugegeben. Daraufhin wurden die Zellen für die verbleibenden 16 h im Inkubator bei 37°C und 5% CO_2 kultiviert. Am Ende der Inkubationszeit wurden die Zellen mit einem Zellerntegerät auf Glasfaserfilterplatten übertragen und nicht eingebautes ^3H -Thymidin durch mehrmaliges Waschen entfernt. Nach einer 30-minütigen Trockenphase wurden die Vertiefungen der Glasfaserfilterplatten mit 20 μl Szintillationsflüssigkeit versehen und die Radioaktivität wurde mit Hilfe eines Beta-Zählers (Perkin Elmer, Waltham, USA) analysiert.

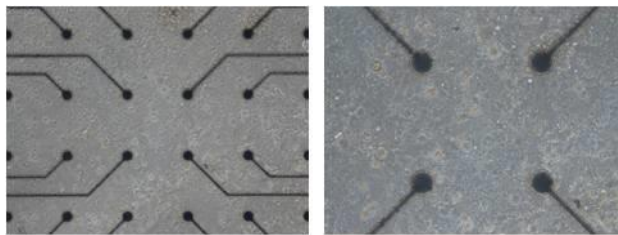
2.15 Elektrophysiologische Ableitung extrazellulärer Potentiale im Neuronennetzwerk mittels eines Multi-Elektroden-Arrays

Um den Einfluss einer antigenspezifischen T-Zell/Neuronen-Interaktion auf Netzwerkparameter eines Neuronennetzwerks untersuchen zu können, wurden verschiedene Parameter zur Netzwerkaktivität mittels eines Multielektroden-Arrays (MEA) genutzt.

Das Prinzip der MEA-Technik beruht darauf, mit extrazellulären Elektroden die Summenfeldpotentiale von Neuronen, die in unmittelbarer Umgebung zu einer der Elektroden liegen, zu detektieren. Hochdichte Neuronenkulturen sind befähigt ein Netzwerk auszubilden, welches spontane Aktivität in Form von rhythmischen Aktionspotentialen (AP) in Gruppen von Neuronen zeigt. Diese Aktivität ruft eine extrazelluläre Änderung der Summenfeldpotentiale hervor, welche von den Elektroden in Form von einzelnen *spikes* und *bursts* aufgezeichnet wird.

Für die Messungen wurden tiefgefrorene murine hippocampale Neurone (QBM Cell Science, Ottawa, Kanada) auf einem poly-D-Lysin und Laminin beschichteten MEA-Chip ausgesät und kultiviert. Die Dichte der Neuronen betrug 2×10^5 Zellen pro cm^2 . Im Boden des MEA waren 60 Ti/TiN-Mikroelektroden mit einem Eingangswiderstand von $< 50 \text{ k}\Omega$ platziert (Multi Channel Systems, Reutlingen, Deutschland). Der Durchmesser der Elektroden betrug $30 \mu\text{m}$ und der Abstand zur Nachbarelektrode betrug $200 \mu\text{m}$ (Otto et al., 2003). Die Signale aller 60 Elektroden wurden mit 25 kHz mittels MC_Rack Standard Software (Multi Channel Systems, Reutlingen, Deutschland) aufgezeichnet.

Abbildung 2.5



Elektroden-Anordnung auf einem MEA. Mikroskopische Aufnahme einer hoch dichten murinen Neuronenkultur auf einem MEA, mit den darunterliegenden Mikroelektroden.

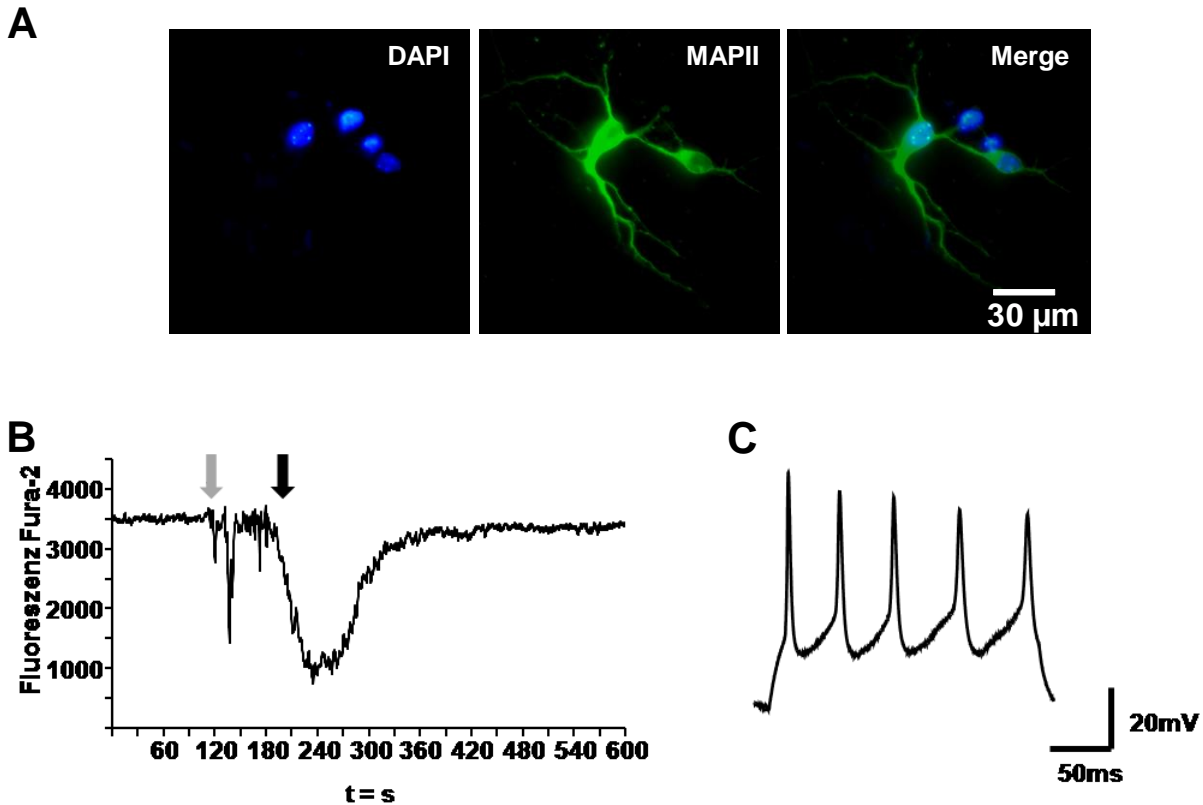
Folgende Aktivitätsparameter des Netzwerkes wurden aufgezeichnet: *Spikes pro Minute (NoS/minute)*, *inter Spike Intervall (ISI)*, *Bursts pro Minute (NoB/minute)*, *inter Burst Intervall (IBI)*, *inter Spike Intervall im Burst (interBurstISI)*, *Spike pro Burst (NoS/Burst)*, *Burst Dauer (Burst duration)* sowie das *Spike Level*.

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung der Vitalität von murinen primären Hippocampus-Neuronen

Die genauen Mechanismen der immunvermittelten Neurodegeneration in autoimmun-entzündlichen Erkrankungen des ZNS, wie z.B. der MS sind noch weitgehend ungeklärt. Zur Untersuchung dieser Fragestellung wurde murine, hippocampale Neuronenkulturen verwendet. Mit immunzytochemischen Färbungen gegen das Microtubuli Protein MABII (Abbildung 3.1 A) konnte gezeigt werden, dass diese primären Neuronenkulturen eine Reinheit von ca. 80% besitzen. Um die Vitalität der in Kultur befindlichen Neurone zu prüfen, wurden zum einen Messungen zur Ca^{2+} -Kinetik durchgeführt, zum anderen elektrophysiologische Ableitungen verwendet. Für die Ca^{2+} -Messungen wurden die Zellen mit dem Kalziumchelator Bis-Fura-2 beladen. Dieser Kalziumindikator zeigt nach Bindung eines Ca^{2+} -Ions eine Erniedrigung der Fluoreszenzintensität. Nach Zugabe einer HEPES-gepufferten hochmolaren Kaliumlösung (50 mM; Abbildung 3.1 B; grauer Pfeil), welche zur Depolarisation der Zellen führt, konnte ein massiver Ca^{2+} -Einstrom in die Neurone gemessen werden. Im Anschluss konnte durch den Wechsel des extrazellulären Mediums (ca. 100 s später) hin zu einer physiologischen HEPES-gepufferten Lösung mit 2,5 mM Kalium (Abbildung 3.1 B; schwarzer Pfeil) eine Rückführung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration beobachtet werden. Ein weiterer Nachweis zur Funktionalität und Vitalität der kultivierten Neuronen, konnte mittels elektrophysiologischer Ableitungen erbracht werden. Hierzu wurden die Zellen im *whole-cell current-clamp*-Modus der *patch-clamp*-Technik depolarisiert. Als Reaktion auf diese Depolarisation zeigten die kultivierten murinen Neurone typische Muster von AP (Abbildung 3.1 C)

Abbildung 3.1



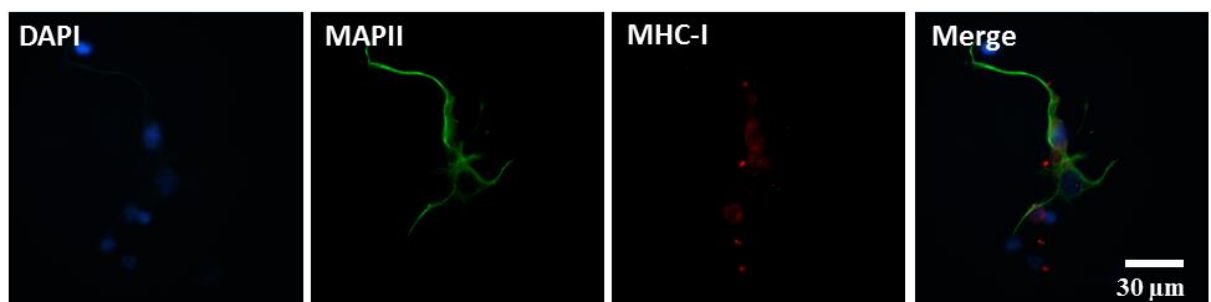
Immunhistochemische Darstellungen und funktionelle Charakterisierung muriner hippocampaler Neurone *in vitro*. (A) Immunhistochemische Darstellung von murinen hippocampalen Primärneuronen. Die Neurone wurden nach der Präparation für fünf Tage kultiviert. Danach wurden die neuronalen Zellen mittels Antikörperfärbung gegen MAPII (grün) gefärbt. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt (blau). (B) Die Funktionalität der kultivierten Neurone wurden mittels Ca^{+} -Imaging nach Zugabe einer externen Lösung mit 50 mM K^{+} (grauer Pfeil) und Wiederherstellung der physiologischen externen K^{+} -Konzentration mit 2,5 mM K^{+} (schwarzer Pfeil) gemessen. (C) Des Weiteren wurde die Vitalität der Neurone elektrophysiologisch durch Generierung einer AP-Serie gezeigt. Das AP wurde im *current clamp*-Modus, durch einen 300 ms langen 100 – 200 pA depolarisierenden Strompuls ausgelöst.

3.2 Expression von MHC-I auf murinen Neuronen nach IFN- γ Stimulation

Um gewährleisten zu können, dass Neurone unter inflammatorischen Bedingungen zu einer MHC-I vermittelten Antigen-Präsentation befähigt sind,

wurden murine Neuronenkulturen über 48 h mit 100 U/ml IFN- γ inkubiert. Der Nachweis des MHC-I-Komplexes auf den Neuronen wurde im Anschluss mittels einer immunzytochemischen Doppelfärbung gegen MAPII und MHC-I erbracht. In der Überlagerung der beiden Emissionskanälen (Abbildung 3.2), ist die Co-Expression der beiden Marker zu erkennen. Die MHC-I-Expression ist sowohl am Soma, als auch auf den Neuriten lokalisiert, was frühere Arbeiten bestätigt (Medana et al., 2001b). Unter Kontrollbedingungen (ohne IFN- γ -Inkubation) lag die neuronale MHC-I-Expression unterhalb der Detektionsgrenze immunzytochemischer Färbungen.

Abbildung 3.2

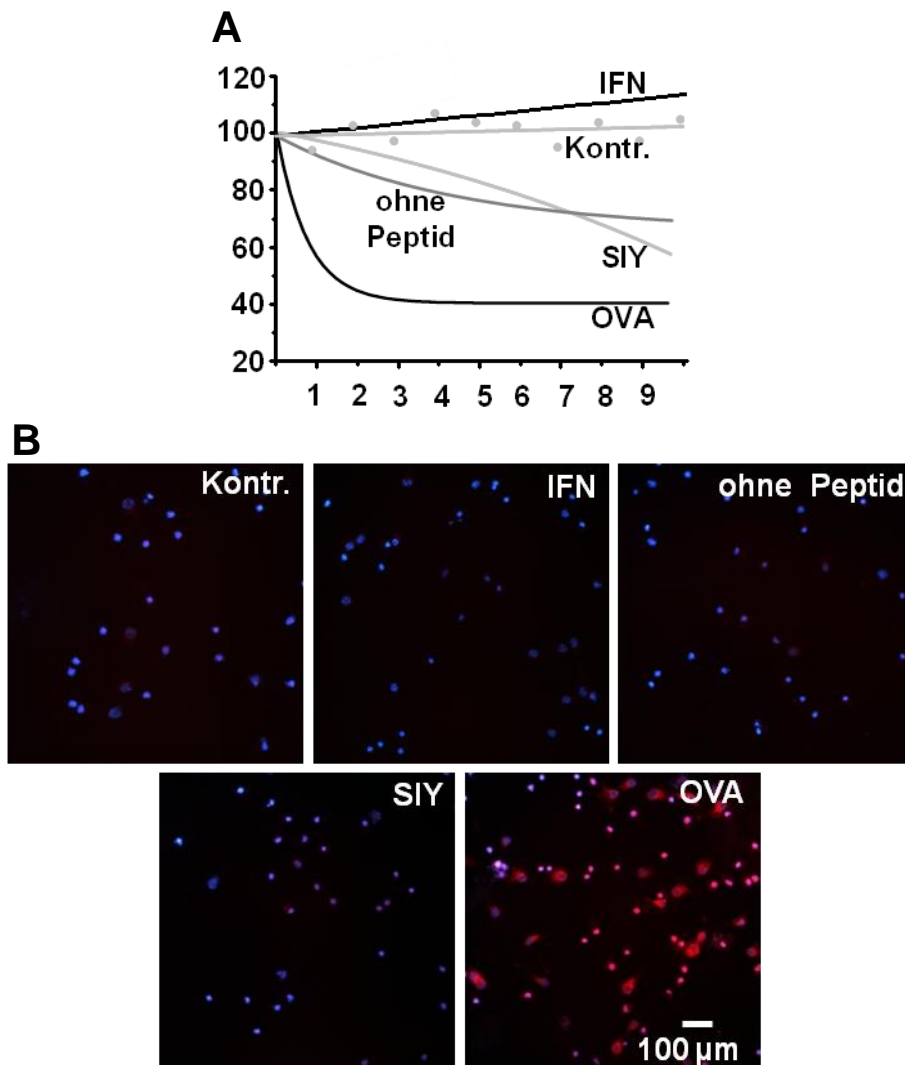


Immunhistochemische Darstellung der Expression von MHC-I auf murine hippocampale Neurone nach IFN- γ -Stimulation. Immunhistochemische Färbung von MHC-I-Molekülen (rot) nach 48h Behandlung mit 100U IFN- γ . Des Weiteren wurden die Zellen mit dem Neuronenmarker anti-MAPII (grün) gefärbt. Die Zellkerne wurden mit dem Kernfarbstoff DAPI (blau) gefärbt.

3.3 Antigen-abhängiger Effekt von OT-I T-Lymphozyten gegenüber murinen Hippocampus-Neuronen

Um zu untersuchen, ob OT-I Zellen das Potenzial haben, Neuronen Antigen-spezifisch zu schädigen, wurden beide Zelltypen unter verschiedenen Bedingungen co-kultiviert. Die Vitalität der Neurone wurde jeweils mittels einer DAPI/PI Färbung dargestellt (Abbildung 3.3 B).

Abbildung 3.3

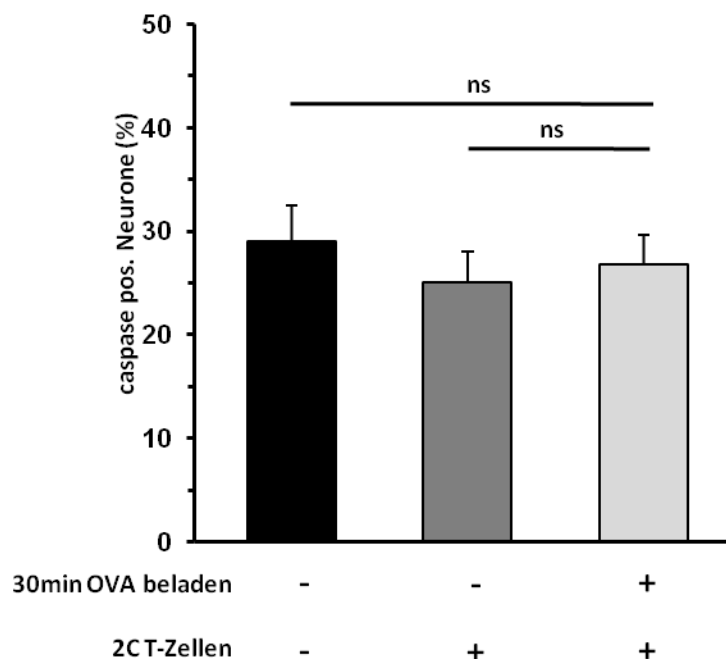


Zeitabhängige Vitalanalyse von primären hippocampalen Neuronen unter Co-Kultivierungsbedingungen mit OT-I Zellen. (A) (Kontr.) Graphische Darstellung der Überlebensrate von Neuronen über ein Zeitfenster von 10 h. Alle weiteren Kultivierungsbedingungen wurden auf diese Kontrollgruppe normalisiert. (IFN) Überlebensrate der Neurone nach 48 h Stimulation mit 100U IFN- γ (ohne Peptid). Überlebensrate der Neurone nach Co- Kultivierung mit aktivierten OT-I T-Lymphozyten, ohne Zugabe von Peptid. (SIY) Vitalität der Neurone nach Beladen mit Kontrollpeptid und Co-Kultivierung mit aktivierten OT-I T-Zellen. (OVA) Vitalität der Neurone nach Beladen mit OVA Peptid und Co-Kultivierung mit aktivierten OT-I T-Zellen. (B) Die Vitalanalyse wurde mit DAPI (blau) und Propidium Iodid (rot) durchgeführt. Die histologischen Abbildungen zeigen repräsentative Färbungen der verschiedenen Gruppen.

Die normale Nekroserate von murinen Hippocampus-Neuronen in der Kultur betrug etwa 20%. Alle Werte der verschiedenen Kulturbedingungen wurden auf diese Kontrollwerte normalisiert. Nach Zugabe von 100 U/ml IFN- γ konnte bis 6 h nach Zugabe kein Effekt auf die Zellvitalität beobachtet werden. Unter Co-

Kultivierungsbedingungen mit OT-I Lymphozyten nach Stimulation der Neurone mit IFN- γ sowie Beladung mit OVA-Peptid, zeigte sich ein signifikanter Untergang von Neuronen mit einer Zeitkonstanten τ von ~ 72 Minuten (Abbildung 3.3 A). Diese Kinetik ist charakteristisch für eine Perforin-vermittelte Zelloptose (Waterhouse et al., 2006). Nach 6 h waren im Vergleich zu den Kontrollbedingungen nur noch $36\% \pm 16\%$ ($n = 5$, $p = 0.0213$) der Neurone PI negativ. Wurden die IFN- γ stimulierten Neurone ohne Peptidbeladung, bzw. mit dem irrelevanten Peptid SIY mit OT-I Lymphozyten co-kultiviert, zeigte sich in diesem antigen-unabhängigen Versuchsansatz eine signifikant geringere Necroserate nach 6 h (Abbildung 3.3 A) ohne Peptid: $72 \pm 4\%$ PI negative Neurone, $n = 5$, $p = 0.001$; SIY-Peptid: $83 \pm 7\%$ negative Neuronen, $n = 5$, $p = 0.045$).

Abbildung 3.4



Vitalanalyse von primären murinen Hippocampus-Neuronen nach 6 h Co-Kultivierung mit CD8⁺ 2C T-Zellen. Die Neurone wurden nach Stimulation mit 100 U/ml IFN- γ für 48 h mit dem Apoptosemarker Caspase-3 immunzytologisch gefärbt. Caspase-positive Neurone unter Kontrollbedingungen (schwarze Säule), nach Co-Kultur mit aktivierten 2C T-Zellen nach 6 h (dunkelgraue Säule), sowie nach 30 min Beladung mit OVA und 6 h Co-Kultivierung mit aktivierten 2C Zellen (hellgraue Säule).

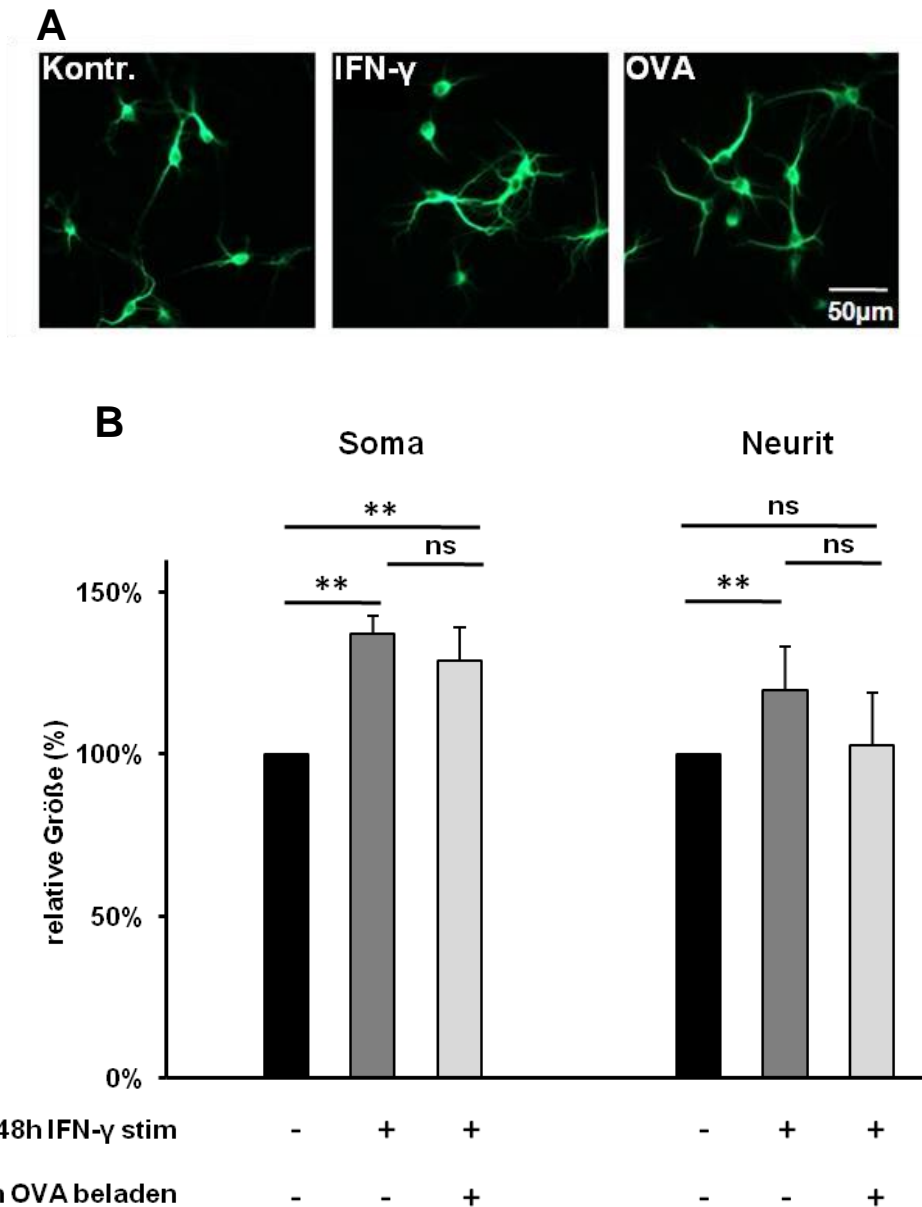
Als weiteren Beleg dafür, dass der erhöhte neuronale Zelluntergang unter MHC-I-vermittelter OVA-Präsentation durch OT-I ein strikt antigen-abhängiger Prozess ist, wurden die Neurone in einer weiteren Serie von Experimenten mit aktivierten $CD8^+$ ZTL aus 2C transgenen Mäusen co-kultiviert (Stefanski et al., 2001). Diese T-Lymphozyten erkennen mittels ihres TZR, anstelle des OVA-Peptides, ausschließlich SIY-Peptid, welches in den vorher beschriebenen Experimenten als Kontrollantigen verwendet wurde (Sha et al., 1988a, Sha et al., 1988b). Durch dieses Kontrollexperiment sollte nochmals gezeigt werden, dass die OT-I T-Lymphozyten die jeweiligen Zielzellen ausschließlich antigen-spezifisch und nicht über antigen-unabhängige zytotoxische Mechanismen „attackieren“. Hierfür wurden vergleichbar mit dem zuvor beschriebenen Ansatz aktivierte 2C T-Lymphozyten 6 h mit IFN- γ stimulierten Neuronen co-kultiviert (Abbildung 3.4). Unter Kontrollbedingungen zeigten $28,99 \pm 3,53\%$ der Neuronen positive Signale für Caspase-3, welche als früherer Marker apoptotischer Prozesse verstanden wird (Porter and Janicke, 1999) (Abbildung 3.4; schwarze Säule). Die Co-Kultivierung der neuronalen Zellkulturen mit 2C Zellen führte unabhängig davon, ob die Neurone mit OVA-Peptid beladen wurden, zu keinen Veränderungen hinsichtlich der Caspase-3 Reaktivität (Abbildung 3.4; dunkel- und hellgraue Säule; ohne Peptid: $25,06 \pm 3,0\%$, $n = 3$, $p = 0,687$; mit OVA-Peptid: $26,74 \pm 2,86\%$, $n = 3$, $p = 0,624$).

3.4 Morphologischer Einfluss durch IFN- γ Stimulation und MHC-I Beladung mit OVA auf primären murine Hippocampus-Neuronen

Nachdem im vorangegangenen Teil der Arbeit bereits beschrieben wurde, dass die Inkubation mit IFN- γ und/oder OVA zu keiner Erhöhung der Caspase-3 Aktivierung führt, sollte zudem untersucht werden, ob die Neuronen nach diesen experimentellen Manövern morphologische Änderungen aufweisen. Daher wurden

sowohl die Somagröße als auch die Anzahl bzw. die Morphologie der Neuriten als Korrelate apoptotischer bzw. nekrotischer Prozesse untersucht. Um diese Parameter zu bestimmen, wurden die Zellen mit dem neuronalen Marker MAPII immunzytologisch angefärbt. Die Parameter Somagröße und Neuritenlänge wurden in den fluoreszenz-mikroskopischen Abbildungen (Abbildung 3.5 A) mit Hilfe der ImageJ-Software vermessen (Pool et al., 2008). Die Durchschnittsgröße der Somata bzw. durchschnittliche Neuritenlänge unbehandelter Neurone wurden auf 100% normiert. Die Größenänderungen der IFN- γ (dunkelgraue Säule) bzw. IFN- γ und OVA (hellgraue Säule) behandelten Zellen wurden relativ dazu aufgetragen. Dabei zeigen sich durch das experimentelle Vorgehen bedingt Größenzunahmen der Somata nach IFN- γ bzw. IFN- γ /OVA Inkubation sowie eine Zunahme der Neuritenlänge nach IFN- γ Behandlung (Abbildung 3.5; Somata: IFN- γ - $137,06 \pm 5,55\%$, $n=16$, $p = 0,00009$; Neuriten: IFN- γ - $119,90 \pm 13,19\%$, $n = 16$, $p = 0,043$; Somata: IFN- γ + Ova - $128,91 \pm 10,18\%$, $n = 16$, $p = 0,02$; Neuriten: IFN- γ + Ova $102,75 \pm 16,09\%$, $n = 16$, $p = 0,794$).

Abbildung 3.5

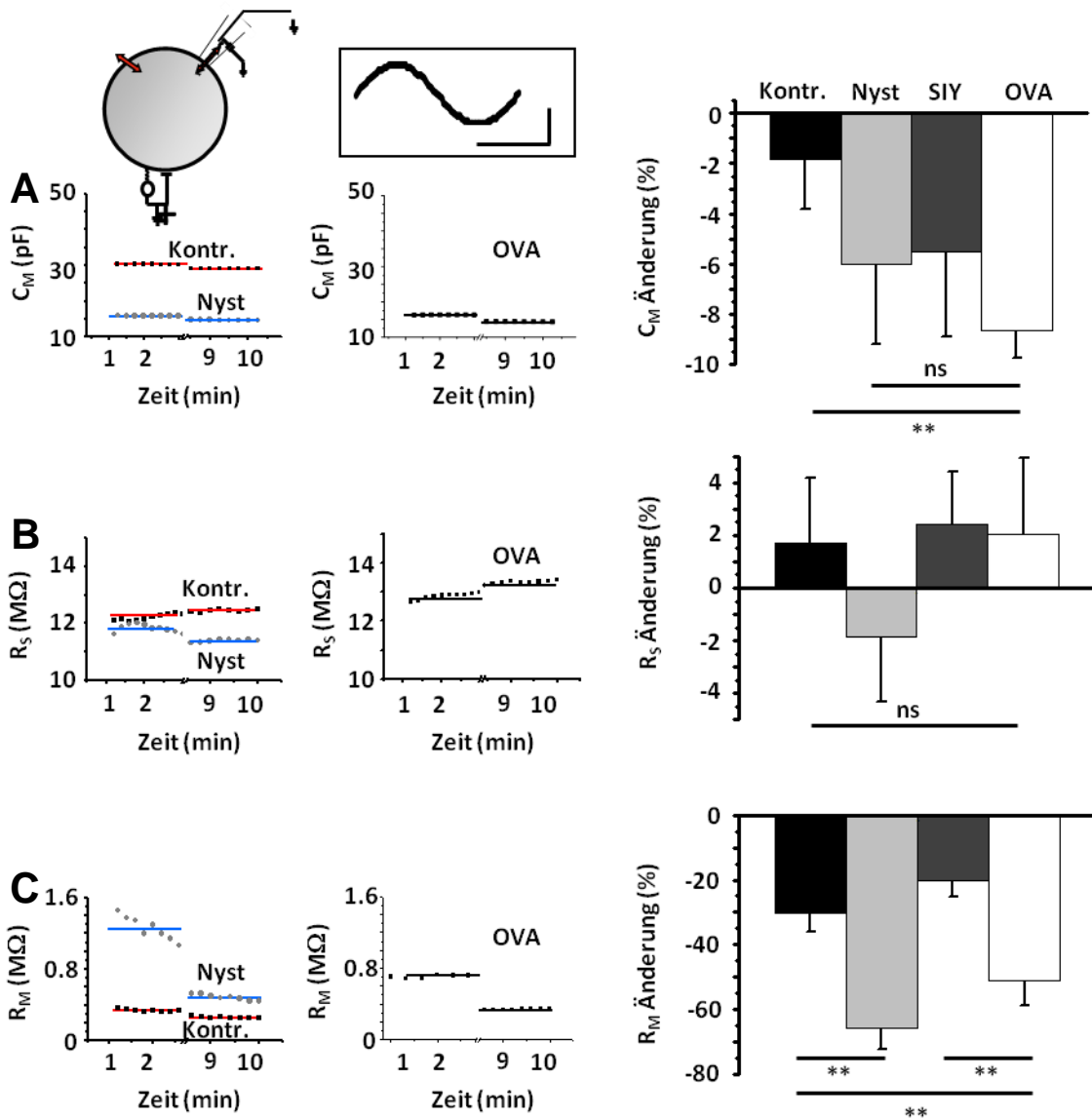


Einfluss der IFN- γ Stimulation und OVA Beladung auf Somagröße und Neuritenlänge bei primären murinen Hippocampus-Neuronen. Größenänderung von Somata und Neuriten, bezogen auf den Durchschnittswert von unbehandelten primären murinen Hippocampus-Neuronen. **(A)** Die Neurone wurden entweder unter Kontrollbedingungen (Kontr.) oder nach 48 h mit 100 U/ml IFN- γ sowie nach 30 min Beladung mit 0,1 nM OVA-Peptid mit MAPII-Antikörpern immunzytochemisch gefärbt. **(B)** Die Somagröße und Neuritenlängen von unbehandelten Neuronen (schwarze Säule) wurden auf 100% normiert. Die Änderung der Durchschnittswerte der nach 48 h IFN- γ Stimulation (dunkelgraue Säule) und nach 30 min Beladung mit 0,1 nM OVA (hellgraue Säule) wurde auf die unbehandelten Neuronen bezogen.

3.5 Änderung passiver elektrophysiologischer Parameter in Neuronen nach Zell-Zellkontakt mit OT-I Lymphozyten

In obigen Co-Kultivierungsversuchen konnte gezeigt werden, dass OT-I Lymphozyten über einen MHC-I-vermittelten, antigen-spezifischen Weg neuronalen Zelltod herbeiführen können. Um die funktionellen Konsequenzen des MHC-I-vermittelten antigen-spezifischen Zell-Zellkontaktes durch OT-I Lymphozyten auf die neuronalen Zielzellen näher zu charakterisieren, wurden mit Hilfe elektrophysiologischer Methoden passive Membraneigenschaften bestimmt. Hierfür wurden zunächst die beiden Zelltypen mit einer geteilten Messkammer unter die Optik eines elektrophysiologischen Mikroskops gebracht. Mittels einer Manipulationspipette konnte eine einzelne OT-I Zelle im *cell attached*-Modus der *patch-clamp*-Technik zu einem Neuron transferiert werden (Abbildung 2.4), um einen unmittelbaren Zell-Zellkontakt herzustellen. In dieser Versuchsanordnung wurden die Membrankapazität (C_M) als Maß für die Oberfläche der Zellmembran $C = \frac{\epsilon_0 * \epsilon_r * A}{d}$ sowie der Membranwiderstand ($R_M = 1/G_M$) als umgekehrt proportionaler Parameter der Membranleitfähigkeit bestimmt. Als Maß für die Qualität der Ableitungen wurde zusätzlich noch der Serienwiderstand (R_S) registriert. Die Neurone wurden von einem Haltepotential von -80 mV ausgehend mit einem sinusförmigen Spannungsprotokoll der Amplitude ± 20 mV und einer Frequenz von 500 Hz ausgelenkt (Hallermann et al., 2003). Die Messdauer betrug ca. 10 - 15 min und es wurden ausschließlich Zellen in die Auswertung aufgenommen, bei denen der Serienwiderstand über die Messdauer konstant blieb (Abbildung 3.6).

Abbildung 3.6



Änderungen der elektrischen Parameter von Neuronen nach Kontakt mit aktivierten OT-I Zellen. Messungen der Neuronen in der *whole cell patch-clamp*-Konfiguration. Um passive elektrische Parameter zu bestimmen, wurden die Neurone mit einem sinusförmigen Reizprotokoll mit der Amplitude 20 mV und einer Frequenz von 500 Hz stimuliert (siehe Ersatzschaltbild). Repräsentative Einzelmessungen für die Parameter **(A)** Membrankapazität (C_m) **(B)** Serienwiderstand (R_s) sowie **(C)** Membranwiderstand (R_m). Repräsentative Messungen für Kontrollbedingungen (Kontr.), nach Beladung der Neurone mit OVA sowie nach Applikation des porenbildenden Agens Nystatin (Nys), jeweils linke Spalte. Prozentuale Änderung ($\Delta\%$) der passiven Parameter über den Messzeitraum von 10-15 min für C_m **(A)**, R_s **(B)** sowie R_m **(C)** Messung unter Kontrollbedingungen (schwarze Säule), Positivkontrolle nach Zugabe von 200 $\mu\text{g/ml}$ Nystatin in die interne Lösung (hellgraue Säule). Messung nach Beladung der Neurone mit Kontrollpeptid (SIY) (dunkelgraue Säule), sowie Änderungen der Parameter nach Zugabe von OVA (weiße Säule) jeweils in der rechten Spalte.

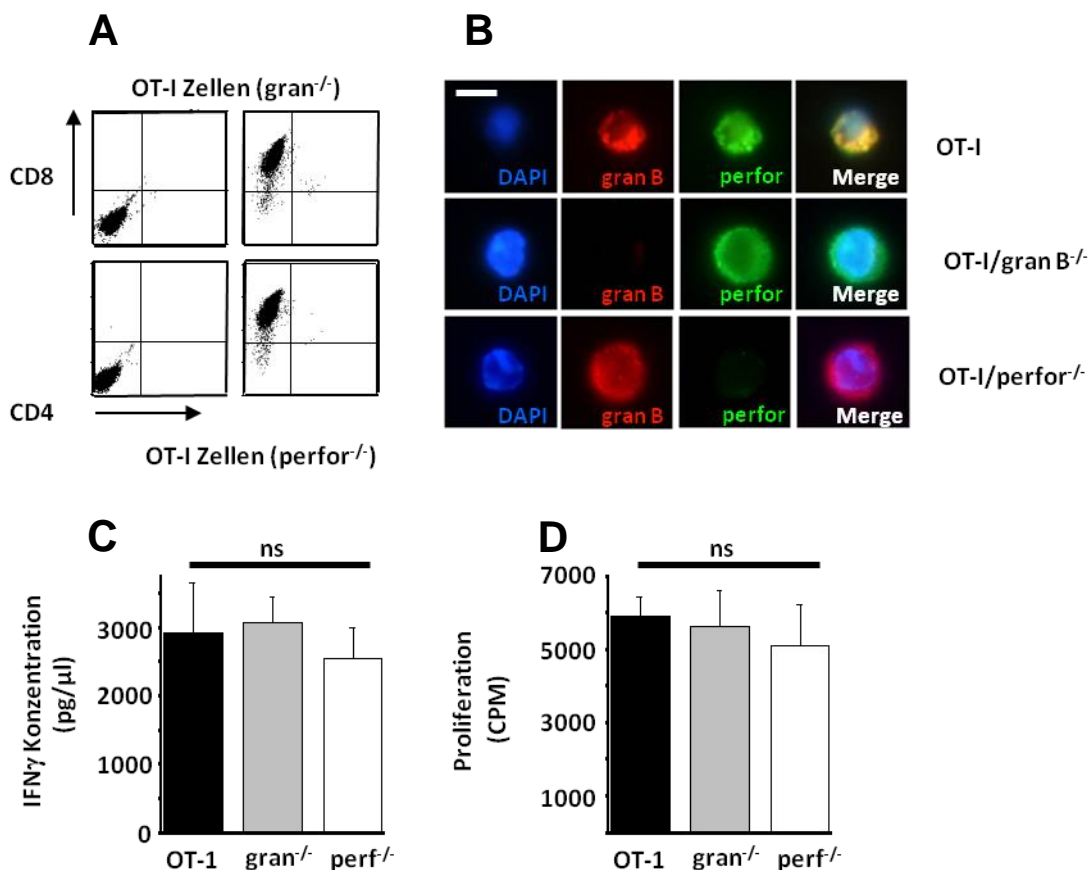
Als Kontrolle für die Stabilität der ausgewerteten Parameter, wurden die Neurone alleine mit dem oben beschriebenen Sinusprotokoll über 10 - 15 min abgeleitet. Unter Kontrollbedingungen (Abbildung 3.6 B; jeweils schwarze Säule) zeigten sich Änderungen in ΔC_M von $-1,85 \pm 1,95\%$ sowie ΔR_M $-30.38 \pm 5.76\%$. Als Positivkontrolle wurde den Neuronen über die interne Pipettenlösung 200ng des porenformenden Antimykotikums Nystatin zugeführt (Holz and Finkelstein, 1970) (Abbildung 3.6; jeweils hellgraue Säule). Unter dem Einfluss von Nystatin zeigten die Neurone eine Abnahme der Kapazität ΔC_M von $-5,99 \pm 3,17\%$, sowie eine Reduktion des Membranwiderstands ΔR_M um $-65.92 \pm 6.5\%$ ($n = 10$; $p = 0,001$). Mit diesem Vorgehen konnte gezeigt werden, dass anhand des verwendeten Messprotokolls Änderungen in der erwarteten Größenordnung aufgelöst werden können. Nach Applikation einer OT-I Zelle auf ein antigen-präsentierendes Neuron (Abbildung 3.6; jeweils weiße Säule), betrug diese Änderungen in ΔC_M $8,61 \pm 1,01\%$ ($n = 12$; $p = 0,003$) sowie eine Reduktion des ΔR_M von $-51.18 \pm 7.8\%$ ($n = 12$; $p = 0.0009$). Bei MHC-I-vermittelter Präsentation eines irrelevanten durch OT-I Zellen nicht erkennbaren Peptids (SIY), waren die Änderungen dieser passiven elektrophysiologischen Parameter signifikant geringer als in der vorbeschriebenen antigen-abhängigen Konfiguration (Abbildung 3.6 B; jeweils dunkelgraue Säule; ΔC_M $5,5 \pm 3,4\%$, $n = 11$; ΔR_M $20.01 \pm 5.03\%$, $n = 11$; $p = 0,001$). Interessanterweise zeigten die Messung mit Nystatin und OT-I Zellen (SIY/OVA) jeweils eine signifikante Reduktion der Membrankapazität im Vergleich zu Kontrollbedingungen. Diese Abnahme der Membranoberfläche könnte durch Retraktion der Neuriten entstehen, wobei diesem Effekt das sogenannte *swelling* gegenübersteht, welches, die nach wenigen Minuten auftretende, typische Erscheinungsform Perforin- und Granzym-induzierter Zellapoptose darstellt (Waterhouse et al., 2006).

Zusammenfassend belegen die Ergebnisse der elektrophysiologischen Messungen, dass die Interaktion zwischen OT-I Lymphozyten und Neuronen antigen-abhängig verläuft und zu signifikanten Veränderungen der Membrankapazität und des Widerstands führt.

3.6 Charakterisierung der OT-I Lymphozyten

Um zu zeigen, dass das hier verwendete OT-I Zellmodell bezüglich Reinheit und Funktionalität den beschriebenen Eigenschaften von CD8⁺ T-Lymphozyten entspricht, wurden die Zellen in Bezug auf ihre Vitalität und Effektor-Funktion untersucht. Diese Untersuchungen wurden jeweils für OT-I T-Lymphozyten, sowie für Perforin- und Granzym-B-defiziente OT-I Lymphozyten durchgeführt. In der Durchflusszytometrie wiesen alle untersuchten Zellen eine Oberflächenexpression des Zellmarkers CD8 auf (Abbildung 3.7 A).

Abbildung 3.7



Charakterisierung der OT-I sowie Granzym B- und Perforin-defizienten OT-I Zellen. Durchflusszytometrische Analyse (A) bezüglich der CD8/CD4 Oberflächenexpression von Granzym B-defizienten (*gran B*^{-/-}) und Perforin-defizienten (*perf*^{-/-}) OT-I Zellen. Immunzytologischer Nachweis (B) von Granzym B (rot) und Perforin (grün) in OT-I Zellen (OT-I), Granzym B-

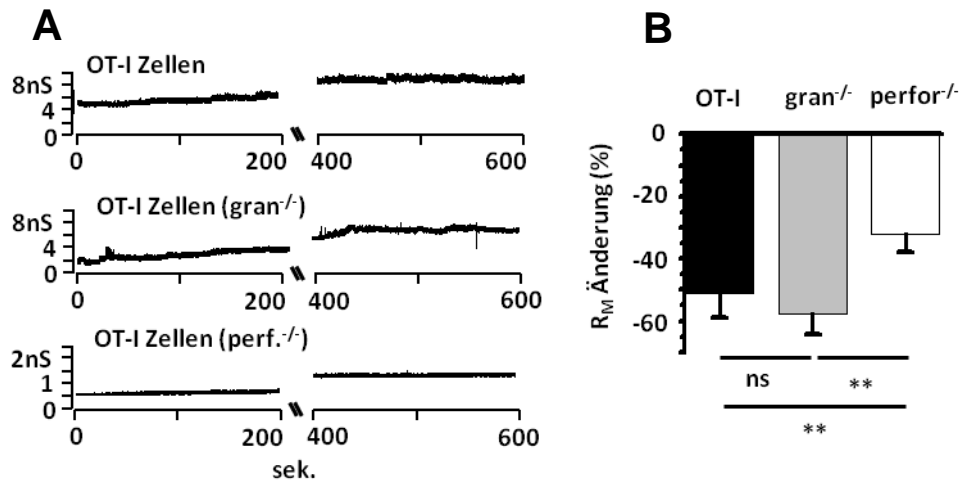
defizienten OT-I Zellen ($\text{gran}^{-/-}$) sowie Perforin-defizienten OT-I Zellen ($\text{perfor}^{-/-}$). Der Zellkern wurde mit DAPI (blau) gefärbt. Der Größenbalken entspricht 10 μm . (C) Analyse mittels ELISA Nachweis zur IFN- γ Synthese in OT-I Zellen (schwarze Säule) sowie in Granzym B-defizienten (graue Säule) und Perforin-defizienten OT-I Zellen (weiße Säule). Proliferation der OT-I Zellen (schwarze Säule), Granzym B-defizienten (graue Säule) und Perforin-defizienten OT-I Zellen (weiße Säule) $p > 0,05$, ns= nicht signifikant.

Das verwendete, transgene OT-I-Mausmodell zeichnet sich dadurch aus, dass die Tiere nur eine T-Zellpopulation mit ausschließlich OVA-spezifischen T-Zellrezeptoren bilden. Bezüglich der T-Zell-Effektor-Funktion wiesen die drei OT-I T-Zelltypen in der Sekretion von IFN- γ (Abbildung 3.7 C) und in der Zellproliferation (Abbildung 3.7 D) keine Unterschiede auf. Mit Hilfe einer immunzytologischen Fluoreszenzfärbung konnten in OT-I Zellen Granzym B und Perforin nachgewiesen werden (Abbildung 3.7 B). In den modifizierten OT-I Zellen bestätigte sich bei einer immunzytochemischen Färbung, die Defizienz für Granzym B (rot) und Perforin (grün).

3.7 Änderung passiver elektrophysiologischer Parameter in Neuronen nach direktem Zell-Zellkontakt mit Perforin-defizienten und Granzym B-defizienten OT-I Zellen

Die Reduktion des neuronalen Membranwiderstands nach Kontakt mit zytotoxischen CD8⁺ T-Zellen kann durch unterschiedliche Ursachen hervorgerufen werden. Um den unterliegenden pathophysiologischen Mechanismus näher aufklären zu können, wurden OT-I Zellen verwendet, denen entweder Perforin (OT-I, $\text{perfor}^{-/-}$); (Kagi et al., 1994a) oder der Granzym B-Cluster (OT-I, $\text{gran}^{-/-}$); (Heusel et al., 1994) molekularbiologisch entfernt wurden. Aus der Literatur ist bekannt, dass zytotoxischen CD8⁺ T-Zellen das porenformende Molekül Perforin sowie Granzym B durch Exozytose sezernieren können (Young et al., 1986, Persechini et al., 1990, Pipkin and Lieberman, 2007).

Abbildung 3.8



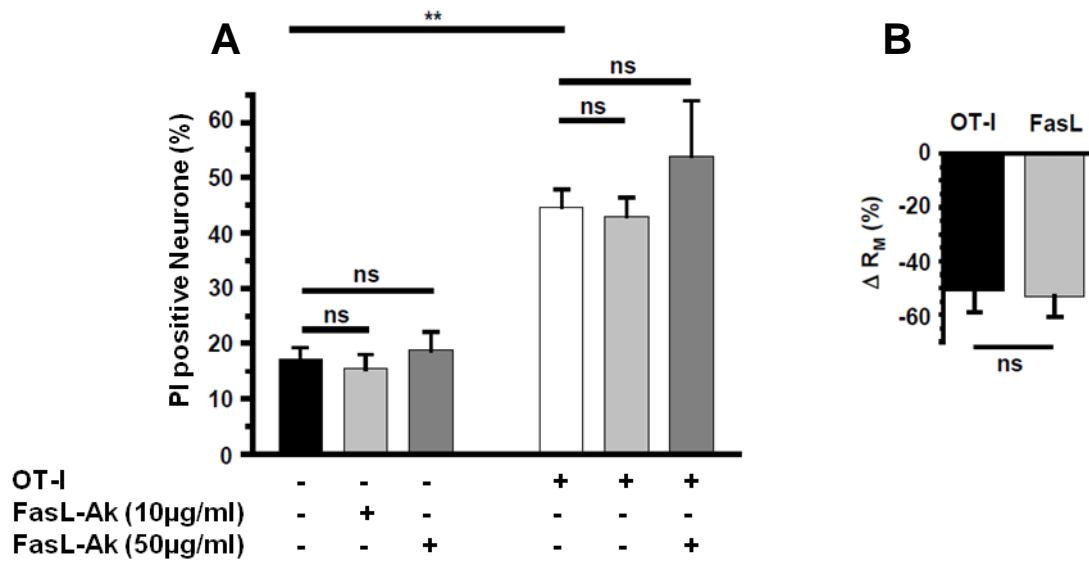
Die Änderung des neuronalen Membranwiderstandes nach T-Zellkontakt ist abhängig von Perforin jedoch nicht von Granzym B. (A) Repräsentative Einzelmessung von Neuronen mit OT-I Zellkontakt, sowie mit Granzym B-defizienten ($gran^{-/-}$) und Perforin-defizienten ($perfor^{-/-}$) OT-I Zellen. (B) Messung der gesamten neuronalen Leitfähigkeit in der *whole cell patch-clamp*-Konfiguration nach direktem Zell-Zellkontakt mit OT-I Zellen (schwarze Säule), Granzym B-defizienten OT-I Zellen (graue Säule) und Perforin-defizienten OT-I Zellen (weiße Säule). Im Diagramm ist die prozentuale Reduktion des Membranwiderstandes aufgezeigt, der dem Kehrwert der Membranleitfähigkeit ($1/G_s$) entspricht.

Nach Etablierung eines Zell-Zellkontakts von Neuronen mit OT-I Zellen, die defizient für Perforin oder Granzym B waren, konnte gezeigt werden, dass $gran^{-/-}$, (Abbildung 3.8 A, B; graue Säule) einen ähnlichen Effekt auf den neuronalen Membranwiderstand ausüben wie die WT OT-I Zellen (Abbildung 3.8 A, B; schwarze Säule; WT: ΔR_M : -51.17 ± 7.82%, OT-I ($gran^{-/-}$): -57.7 ± 6.6%; n = 10; p = 0.23). Hingegen führten Perforin-defiziente ($perfor^{-/-}$, Abbildung 3.8 A, B; weiße Säule) Zellen zu einer signifikant geringeren Abnahme des neuronalen Membranwiderstands (ΔR_M : OT-I ($perfor^{-/-}$): -32 ± 6%; n = 10, p = 0,008). Diese Daten deuten darauf hin, dass ein Großteil des durch OT-I Zellen bedingten Einflusses auf den neuronalen Membranwiderstand durch Perforin vermittelt wird. Demgegenüber führte das Fehlen von Granzym B zu keinem signifikanten Effekt bezüglich der Reduktion des Membranwiderstands.

3.8 Neuronale Apoptose und Membranwiderstands Effekte nach Interaktion von OT-I FasL mit neuronalem Fas Rezeptor

Ein weiterer möglicher Mechanismus für OT-I vermittelte neuronale Apoptose bzw. ein Erklärungsansatz für die Abnahme des ΔR_M nach antigen-abhängigem Neuron-T-Zellkontakt könnte die Interaktion des Fas-Rezeptors (CD95) mit dem FasL (CD95L) sein. Der Fas-Rezeptor wird in nahezu allen Zellen exprimiert, wobei der lösliche FasL hauptsächlich von Zellen des Immunsystems bzw. im besonderen Maße von aktivierten T-Zellen freigesetzt wird (Choi and Benveniste, 2004). Die Kinetik des Fas-FasL induzierten Zelltods ähnelt sehr dem Zeitverlauf Perforin/Granzym-abhängiger Prozesse (Denecker et al., 2001a, Denecker et al., 2001b). Daher wurde im Rahmen der vorgelegten Arbeit die Relevanz dieses möglichen Apoptosewegs untersucht. Hierfür wurde analog zu den schon durchgeführten Co-Kultivierungsversuchen, nochmals Vitalitätsassays mit primären murinen hippokampalen Neuronen und aktivierten OT-I Zellen durchgeführt.

Abbildung 3.9



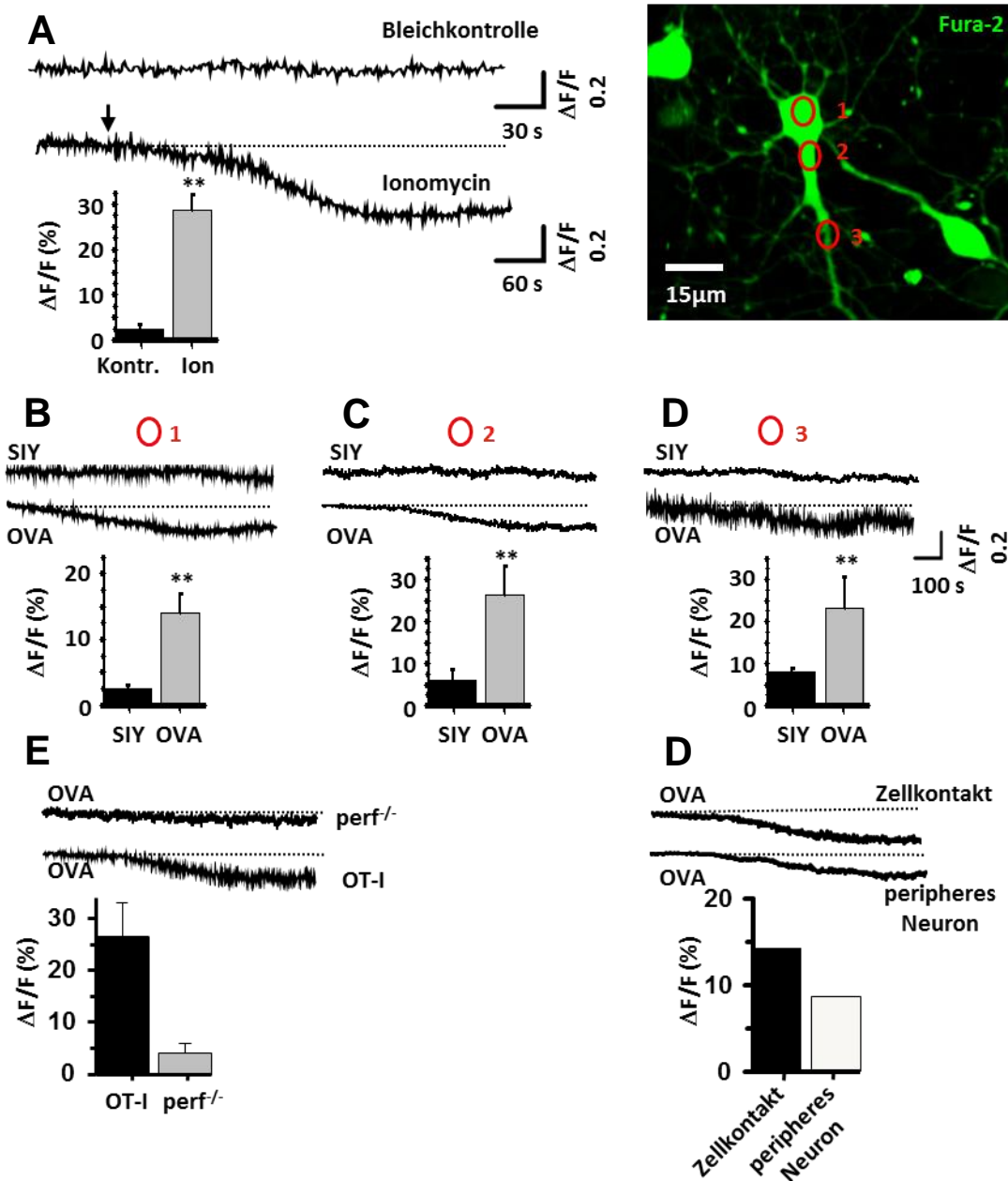
Die Fas/FasL abhängige Interaktion zeigt keine Effekte bezüglich der Überlebensrate von primären Neuronen nach OT-I Co-Kultivierung oder bezüglich der Änderung des Membranwiderstandes nach Neuron/T-Zellkontakt. (A) PI positive Neurone unter Kontrollbedingungen (schwarze Säule) nach Zugabe von 10 µg/ml (hellgraue Säule) und 50 µg/ml (dunkelgraue Säule) anti-FasL Antikörper. (B) Änderung des Membranwiderstandes nach Zell-Zellkontakt mit antigen-präsentierenden primären Neuronen und OT-I Zellen (schwarze Säule) und unter Zugabe des FasL blockierenden Antikörper (graue Säule).

In diesem Ansatz wurde FasL mit einem Blockierungsantikörper (MFL4 BD Pharmingen, 10µg/ml und 50 µg/ml,) neutralisiert (Kayagaki et al., 1997) (Abbildung 3.9 A). Nach 6 h Co-Kultivierung und Färbung der Neuronen mit PI konnte kein protektiver Effekt durch die Blockade der Fas-FasL Interaktion nachgewiesen werden. Des Weiteren wurde auch untersucht, ob die Inhibition der Fas-FasL-Interaktion Einfluss auf die Erniedrigung des Membranwiderstandes der Zielzelle nach direktem Kontakt mit einer aktivierten OT-I Zelle hat (Abbildung 3.9 B). Hierfür wurde in dem oben beschriebenen System zur Messung der passiven elektrischen Parameter von Neuronen die Fas-FasL-Interaktion mit 10 µg/ml anti-FasL Antikörper blockiert. Auch unter diesen Bedingungen konnte im verwendeten System keine Veränderung gegenüber den Kontrollbedingungen gefunden werden, sodass in dem gewählten Versuchsansatz kein wesentlicher Effekt des Fas-FasL-Signalwegs gefunden werden konnte.

3.9 Antigen- und Perforin-abhängiger Kalziumeinstrom in Neurone nach direktem OT-I-Zellkontakt

Aufgrund der erhöhten neuronalen Apoptose-Rate, sowie der Reduktion von ΔR_M bei Antigen-Präsentation und Co-Kultivierung bzw. Zell-Zellkontakt mit OT-I Zellen, wurde der Fokus nun auf die Untersuchung des möglicherweise unterliegenden Mechanismus gelenkt. Da die Abnahme von ΔR_M gleichbedeutend mit der Zunahme der Membranleitfähigkeit ist und in unserem Falle mit einer Depolarisation der Zellen und im Langzeitverlauf mit apoptotischen Prozessen assoziiert zu sein scheint, deuten viele Faktoren auf einen Kalziumeinstrom in die Zellen als ursächlichen Mechanismus hin.

Abbildung 3.10



Kinetik des Ca²⁺-Einstroms in primäre murine Hippocampus-Neurone, nach direktem Zell-Zellkontakt mit OT-I Zellen. (A) Repräsentative Ca²⁺-Kinetik in primären murinen Hippocampus-Neuronen unter Kontrollbedingungen (Bleichkontrolle) und nach Zugabe von 200 mg/ml des Ca²⁺-poren-bildenden Agens Ionomycin (Ionomycin). (B-D) Repräsentative Ca²⁺-Kinetik nach OVA Beladung in verschiedenen Zellregionen, am Soma (ROI O1) am proximalen Neuriten (ROI O2) und am distalen Neuriten (ROI O3). (E) Ca²⁺-Ionenstrom in OVA präsentierenden primären murinen Hippocampus-Neuronen nach Zell-Zellkontakt mit Perforin^{-/-} OT-I Zellen. (F) Ca²⁺-Ionenstrom in primäre Neuronen nach Neuron/OT-I-Kontakt bei einem benachbarten Neuron. Die Säulendiagramme zeigen die prozentuale Änderung ($\Delta F/F$) der Fluoreszenzintensitäten.

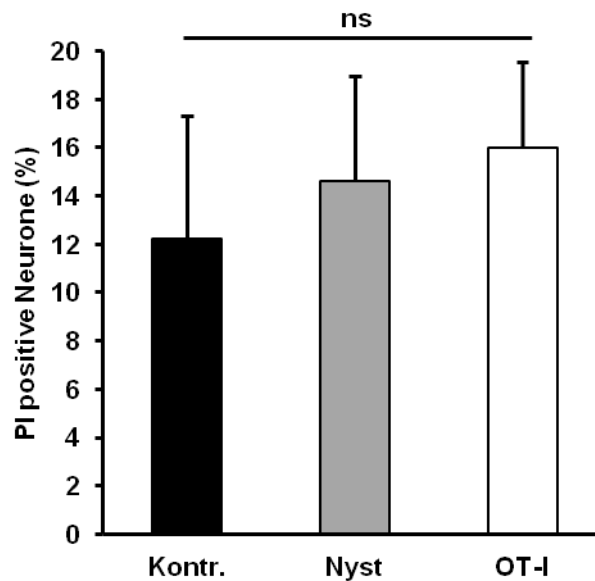
Um Kalziumkinetiken in einzelnen Neuronen zu messen, wurden diese mit 5 μM des Ca^{2+} -sensitiven Esterfarbstoffes *Bis-Fura-2 AM* beladen. Die Neurone wurden analog zu den elektrophysiologischen Experimenten für 48 h mit $\text{INF-}\gamma$ stimuliert und mit den Peptiden OVA bzw. SIY beladen. Des Weiteren wurden auch die OT-I Lymphozyten wie in den vorangegangenen Versuchen über 5 Tage *in vitro* stimuliert. Gleichfalls wurden auch in diesem experimentellen Design die Zellen in einer geteilten Messkammer in das Mikroskop eingebracht und das *Ca²⁺-Imaging* erfolgte an den mittels Mikromanipulatoren hergestellten Neuron-T-Zellinteraktionen. Vor Beginn der eigentlichen Messung wurde die Eignung des gewählten Farbstoffes mit einer Bleichkontrolle (*bleaching*) überprüft (Abbildung 3.10 A). Dabei konnte gezeigt werden, dass der Ca^{2+} -bindende Farbstoff über den Zeitraum von 15 min nahezu keinem Photobleicheffekt unterliegt ($\Delta\text{F}/\text{F}$: $2.5 \pm 0.94\%$). Als Positivkontrolle wurden extrazellulär 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ des Ca^{2+} -selektiven Porenbildners Ionomycin (Liu and Hermann, 1978) zugegeben (Abbildung 3.10 A). Bis-Fura-2 AM zeigt unter Bindung von freiem Kalzium eine Erniedrigung der Fluoreszenzintensität, was sich in der Ionomycin-Gruppe signifikant bestätigte ($\Delta\text{F}/\text{F}$: $28.6 \pm 3.48\%$, $n = 4$; $p = 0.004$). Im eigentlichen experimentellen Ansatz wurden die Neurone erneut mit OVA bzw. dem Kontrollpeptid SIY beladen. Die Kalziumkinetik der Neurone wurde unmittelbar nach Interaktion mit den OT-I Zellen an drei verschiedenen Regionen der Zelle gemessen: I.) dem Soma (Abbildung 3.10 B), II.) dem proximalen Dendriten (Abbildung 3.10 C) sowie III.) sowie am distalen Dendriten (Abbildung 3.10). Auch in diesen Messungen, konnte ein antigen-abhängiger Ca^{2+} -Effekt nach Zell-Zellinteraktion gezeigt werden. Interessanterweise zeigt der intrazelluläre Ca^{2+} -Anstieg an den drei gemessenen Zellregionen kaum einen Unterschied, obwohl der Zellkontakt des Neurons mit der T-Zelle am Soma stattfand ($\Delta\text{F}/\text{F}$, Soma: $13.97 \pm 3.07\%$, proximaler Dendrit: $26.4 \pm 6.7\%$, distaler Dendrit: $23.1 \pm 7.4\%$; $n = 4$; $p = 0.0021$; Abbildung 3.10 A, inset). In einer weiteren experimentellen Serie wurden antigen-präsentierende Neurone mit Perforin-defiziente OT-I Zellen in unmittelbaren Kontakt gebracht. Auch hier konnte gezeigt werden, dass Perforin-defiziente OT-I Zellen keine Änderung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration in Neuronen hervorrufen können, was analog zu den elektrophysiologischen Messungen Perforin als entscheidendes Molekül in der Neuron-T-Zellinteraktion hervorhebt (Abbildung 3.10 E). Zudem konnte belegt

werden, dass durch die Interaktion von OT-I Zellen mit antigen-präsentierenden Neuronen auch direkt benachbarte Neurone einen Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration zeigen (Abbildung 3.10 F).

3.10 Einfluss auf die Neuronen Apoptose durch die Reduktion des Membranwiderstandes mittels porenformende Agenzien

Um zu klären, ob alleine die OT-I-induzierte Freisetzung von Perforin und der damit einhergehende Rückgang des Membranwiderstandes zum Zelltod in Neuronen führt, wurden Neurone mit dem porenformenden Agenz Nystatin behandelt. Nystatin, bildet ähnlich wie Perforin Ionen-unselektive Poren in der Zellmembran und soll damit den porenformenden Effekt von Perforin auf Neuronen simulieren. In diesem experimentellen Ansatz wurden die Neurone für 10 min mit 200 $\mu\text{g/ml}$ Nystatin behandelt, analog zu ihrer Exposition mit Perforin aus OT-I T-Zellen. Des Weiteren wurden antigen-präsentierende Neurone für 10 min mit OT-I T-Zellen co-kultiviert, entsprechend zu den Experimenten zuvor. Anschließend wurden die Neurone mit PI histologisch gefärbt, um den Einfluss der membranporenformenden Stoffe auf den neuronalen Zelltod zu untersuchen.

Abbildung 3.11



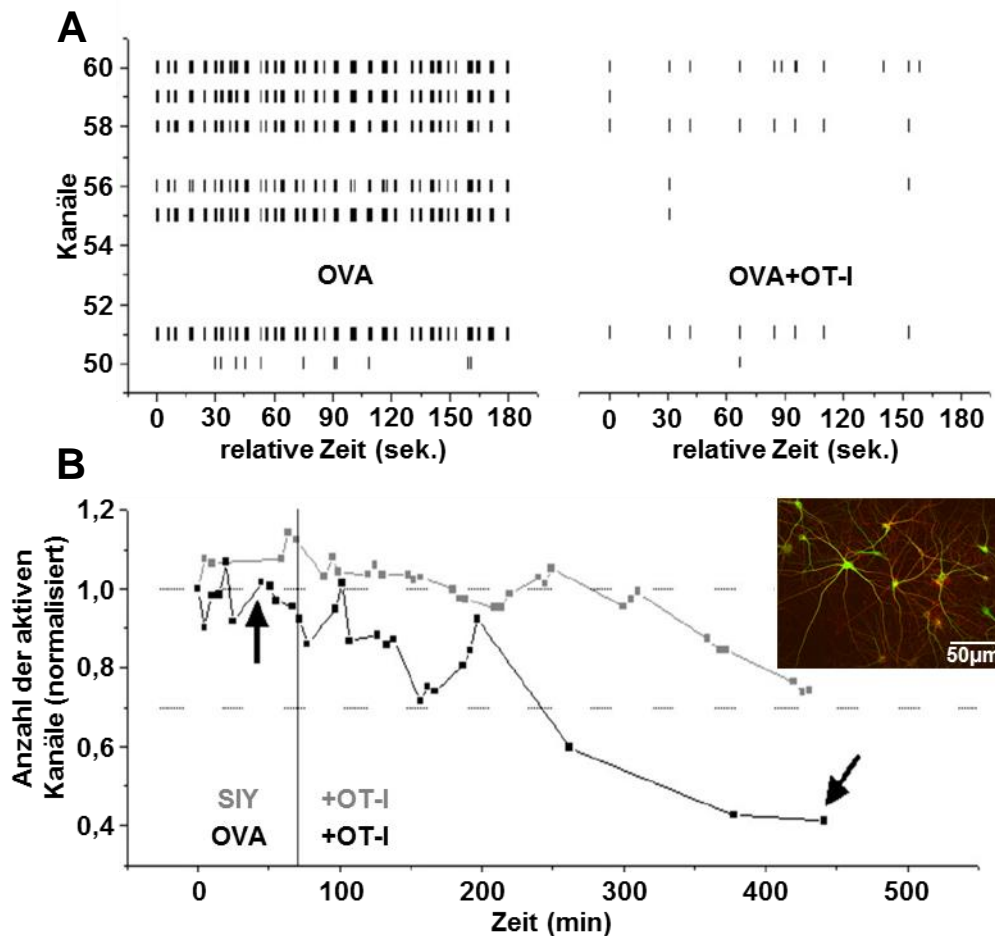
Die Reduktion des Membranwiderstandes, hervorgerufen durch Nystatin und OT-I T-Zellen, führt nicht unmittelbar zu neuronaler Nekrose. Unbehandelte primäre murine Hippocampus-Neurone wurden zur Kontrolle mit PI gefärbt (schwarze Säule). PI positive Neurone, nach 10min Inkubation mit 200 µg/ml Nystatin (graue Säule). PI positive Neurone nach 10 min Co-Kultivierung mit OT-I T-Zellen (weiße Säule).

Der Anteil der PI positiven Neuronen nach Nystatin-Behandlung (graue Säule 14,63% PI positiv n=24) wurde mit unbehandelten Neuronen (schwarze Säule 12,24% n=21) sowie mit Neuronen, die das OT-I spezifische Antigen OVA präsentieren und für 10 min mit OT-I T-Zellen co-kultiviert wurden, (weiße Säule 15,97% n=20) verglichen. Nystatin und OT-I Co-Kultivierung führen zur Reduktion des Membranwiderstandes, wie die elektrophysiologischen Messungen bereits zeigen konnten (Abbildung 3.6). Jedoch führt diese Senkung des neuronalen Membranwiderstandes nicht zum unmittelbaren Zelluntergang der Neurone. Neurone, bei denen aufgrund der Gabe von Nystatin die Membranleitfähigkeit erhöht und damit einhergehend die elektrische Erregbarkeit gesenkt wurde, weisen, im Vergleich zu den Kontroll-Neuronen, keine signifikante Erhöhung des PI-Signals auf

3.11 Auswirkungen der antigen-abhängige Interaktion von Neuronen und zytotoxischen T-Zellen auf die neuronale Netzwerkaktivität

Nach den Untersuchungen der antigen-abhängigen T-Zell-Neuron-Interaktion auf Einzelzellebene, sollte nun die Relevanz dieser Interaktion für neuronale Netzwerke charakterisiert werden. Hierfür wurde eine neuronale Zellkultur mit einer Zelldichte von $2 \times 10^5/\text{cm}^2$ auf einem MEA-Chip kultiviert. Solche hochdichten neuronalen Kulturen sind dazu befähigt, aktive synaptische Verbindungen zwischen den Neuronen auszubilden (inset, Abbildung 3.12 B). Weiterhin zeigen solche Kulturen Netzwerkaktivität in Form von spontanen Salven bzw. einzelnen AP. Diese Aktivitätsmuster wurden nun unter Kontrollbedingungen und unter dem Einfluss von OT-I Zellen untersucht. Hierfür wurden die neuronalen Zellen sowie die OT-I Zellen wie oben beschrieben vorstimuliert.

Abbildung 3.12



Einfluss der antigen-abhängigen T-Zellinteraktion auf die neuronale Netzwerkaktivität, gemessen auf MEA. Um den Einfluss der antigen-abhängigen $CD8^+$ T-Zell/Neuroneninteraktion auf der Ebene der neuronalen Netzwerkaktivität zu untersuchen, wurden primäre Neurone mit der Dichte von $2 \times 10^9/cm^2$ auf einem Poly-D-Lysin und Laminin beschichteten MEA Chip ausgesät und kultiviert. **(A)** Spike-Raster Diagramm, von 10 Elektroden, als repräsentative 3 min der Aufzeichnung (links OVA beladene Neurone, rechts OVA beladene Neurone nach OT-I-Applikation). **(B)** Zeitlicher Verlauf der normalisierten Aktivität der Elektroden nach Beladung mit Kontrollpeptid (graue Spur) oder OVA (schwarze Spur). Die immunzytologische Färbung zeigt die Co-Expression von MAPII (grün) und dem Synapsenprotein Synaptosin (rot).

Im Spike-Raster-Protokoll (Abbildung 3.12 A) sind repräsentative Aufzeichnungen von 10 Elektroden (3 Minuten) unter Beladung mit OVA bzw. nach Inkubation mit den ZTL (OVA + OT-I) dargestellt. Das Netzwerk zeigt eine deutliche Aktivitätsabnahme nach antigen-abhängigem OT-I-Einfluss (Abbildung 3.12 A; rechter Abbildungsteil). Im Spike-Raster-Protokoll ist zu erkennen, dass die Applikation des OVA-Peptids alleine die Aktivität nicht beeinflusst (linker

Abbildungsteil). Um die Antigen-spezifität der OT-I Zellen auf die Aktivität des Netzwerkes zu zeigen, wurden auch in diesem Versuchsansatz Neurone nach Stimulation mit dem Kontrollpeptid SIY beladen. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Netzwerkaktivität unter antigen-abhängigen Bedingungen signifikant stärker abnimmt (Abbildung 3.12 B; schwarze Linie) im Vergleich zur Beladung mit SIY (graue Linie).

4 Diskussion

CD8⁺ T-Lymphozyten werden in vielen entzündlichen und neurodegenerativen Autoimmunerkrankungen als pathophysiologisch relevante Effektor-Zellen des Immunsystems betrachtet (Melzer et al., 2009). Es wird vermutet, dass der Untergang von Neuronen in Erkrankungen wie z.B. der MS durch einen direkten „Angriff“ von ZTL auf MHC-I-präsentierende neuronale Zellen zustande kommen könnte (Neumann et al., 2002, Aktas et al., 2007). In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb mittels eines *in vitro* Co-Kultivierungs-Systems mit murinen ZTL und Neuronen sowie elektrophysiologischen Methoden der Effekt von CD8⁺ ZTL auf Antigen-präsentierende Neurone unter inflammatorischen Bedingungen untersucht.

4.1 Methodenkritische Aspekte

Um den Antigen-abhängigen Effekt von CD8⁺ ZTL auf Neuronen zu untersuchen, wurde in der vorliegenden Arbeit mit dem OT-I-Modell gearbeitet. Dieses artifizielle Modell bietet den Vorteil, bei *in vitro* Studien gut vergleichbare und reproduzierbare Bedingungen bezüglich der Antigenaffinität von ZTL zu erforschen, da diese transgene T-Zelllinie eine hohe Affinität zu ihrem spezifischen Antigen aufweist. Des Weiteren ist dieses Modell schon in zahlreichen früheren Arbeiten gut vorcharakterisiert (Na et al., 2008).

Der Focus lag in dieser Arbeit auf elektrophysiologischen Messungen. Mit dieser Methode ist es möglich, physiologische Änderungen im Neuron nach unmittelbarem Kontakt mit einer CD8⁺ T-Zelle auf Einzelzellebene zu erfassen. Dafür wurden die Neurone in diesen Messungen mit einer sinusförmigen Spannung stimuliert, die es ermöglichte die physiologischen Parameter in einer

hohen zeitlichen Auflösung zu detektieren (Hallermann et al., 2003). Hiermit konnte gezeigt werden, wie sich die Zellkapazität und der Membranwiderstand im Laufe einer Neuron-T-Zell-Interaktion ändern. Die so gewonnenen Resultate ließen einen Rückschluss zu, auf welche Weise eine CD8⁺ T-Zelle auf die Physiologie eines Neurons Einfluss nehmen kann. Aus diesen Ergebnissen, ergab sich eine messbare Änderung der Membranleitfähigkeit nach direktem Kontakt mit einer CD8⁺ T-Zelle, allerdings nur wenn der TZR sein spezifisches Antigen am Neuron erkennen konnte. Aus zahlreichen Vorarbeiten, lagen schon mechanistische Ansätze vor, auf welche Weise ZTL ihre spezifischen Zielzellen schädigen (Medana et al., 2001b, Neumann et al., 2002). Aus diesen Erkenntnissen und den eigenen Daten konnte gezeigt werden, dass in unserem verwendeten Modell Perforin der entscheidende Mediator für den unmittelbaren Rückgang des neuronalen Membranwiderstandes ist.

4.2 Morphologische und funktionelle Charakterisierung der verwendeten Zellmodelle

Für alle in dieser Arbeit durchgeführten Experimente wurde ein Maus-Modell verwendet. Um die Interaktion zwischen ZTL und neuronalen Zellen zu untersuchen, wurde zunächst eine primäre murine Neuronenkultur etabliert. Um den Nachweis zu führen, dass es sich bei den kultivierten Zellen tatsächlich um Neurone handelt, wurde die Kultur nach fünf Tagen histologisch und funktionell untersucht. Dabei konnte mittels einer immunhistologischen MAP2-Antikörperfärbung (Abbildung 3.1 A) gezeigt werden, dass die kultivierten Zellen bereits nach fünf Tagen, die für sie charakteristische Morphologie zeigen. Darüber hinaus wurden verschiedene Untersuchungen zur Überprüfung der Vitalität und funktionellen Aktivität der präparierten Neurone durchgeführt. Zunächst wurde mittels *patch-clamp*-Techniken analysiert, ob die primären Neuronenkulturen zur AP-Generierung befähigt sind. Der aktive Transport von verschiedenen Ionen über die Zellmembran ist essentieller Bestandteil lebender Zellen, insbesondere von

Neuronen, da diese zur Aufrechterhaltung des Membranruhepotentials, sowie zur Generierung von AP auf den aktiven und passiven Transport von Ionen über die Zellmembran angewiesen sind. Das physiologische Gleichgewichtspotential von Kalium liegt bei ca. -91 mV. Um zu demonstrieren, dass die in dieser Arbeit verwendeten primären murinen Hippocampus-Neurone volle Vitalität zeigen, wurde die extrazelluläre Lösung von 2,5 mM auf 50 mM Kalium erhöht. Durch die massive Erhöhung der extrazellulären Kaliumkonzentration und der damit einhergehenden Depolarisation, zeigten die Zellen einen starken passiven Ca^{2+} -Einwärtsstrom (Abbildung 3.1 B). Nach Wiederherstellen der physiologischen extrazellulären Kaliumkonzentration von 2,5 mM, konnte die Wiederherstellung der ursprünglichen intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration entgegen dem Konzentrationsgefälle durch aktiven Ionentransport beobachtet werden, so dass davon ausgegangen werden kann, dass die hier verwendeten Kulturen „voll funktionsfähig“ waren.

Zur weiteren Untersuchung der funktionellen Aktivität der Neuronen, wurden Na^+/K^+ AP's in primären Neuronenkulturen durch depolarisieren in der *whole cell patch-clamp*-Konfiguration abgeleitet. Dabei ist eine für Neuronen typische Salvenaktivität ausgelöst worden (Abbildung 3.1 C). Auch durch diese morphologischen und funktionellen Tests konnte gezeigt werden, dass es sich bei den hier verwendeten primären Neuronenkulturen um vitale und funktionell aktive Zellen handelt.

Um primäre murine Hippocampus-Neurone als Modell für Antigen-präsentierende Zielzellen für ZTL verwenden zu können, ist die Präsentation eines spezifischen Antigens im MHC-I-Kontext an der Zelloberfläche notwendig. Die Expression von MHC-I-Molekülen konnte in den neuronalen Zellkulturen mittels des proinflammatorischen Zytokins IFN- γ (100 U/ml, 48 h) induziert werden (Medana et al., 2001b). Die Expression von MHC-I auf Proteinebene wurde nach fünf Tagen Kultivierung immunhistochemisch nachgewiesen (Abbildung 3.2). Damit konnte gezeigt werden, dass die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Neuronenkulturen unter inflammatorischen Bedingungen MHC-I-Moleküle auf der Zelloberfläche exprimieren.

4.3 Zytotoxische Effekte von TZR transgenen CD8⁺ OT-I T-Zellen auf primäre murine Hippocampus-Neurone

Um zu untersuchen, ob ZTL einen zytotoxischen Einfluss auf Neurone ausüben können, wurden Co-Kultivierungsversuche mit murinen hippocampalen Neuronen und OT-I Zellen unter verschiedenen experimentellen Bedingungen durchgeführt. Nach neun Stunden Kultivierung wurden die Neurone mit dem Farbstoff PI angefärbt, mit dessen Hilfe lebende von toten Zellen unterschieden werden können (Ockleford et al., 1981). Es zeigte sich, dass aktivierte TZR transgene CD8⁺ OT-I T-Zellen in der Lage sind, in MHC-I-exprimierenden und OVA-präsentierenden Neuronen Zelltod zu induzieren. Im Gegensatz hierzu konnte in der Co-Kultur von beispielsweise OT-I Zellen mit Neuronen, die mit einer randomisierten Kontrollpeptidvariante beladen waren, signifikant weniger neuronaler Zelluntergang nachgewiesen werden (Abbildung 3.3 B). Der prozentuale Zelluntergang in Kontrollpeptid-beladenen Neuronen unterschied sich nicht signifikant von Co-Kulturen mit Neuronen, die kein Peptid und damit kein Antigen auf ihrer Zelloberfläche präsentierten. Um einen weiteren Hinweis zu liefern, dass der höhere neuronale Zelluntergang nicht auf einem sogenannten „*bystander killing*“-Effekt beruht (McPherson et al., 2006, Isaaz et al., 1995), wurden Neurone, die das OVA-Peptid als Antigen präsentierten, mit 2C Zellen co-kultiviert (Stefanski et al., 2001). 2C Zellen sind analog zu OT-I Zellen TZR transgene CD8⁺ ZTL, welche allerdings ausschließlich die Peptidsequenz „SIY“ als Antigen erkennen im Gegensatz zu OT-I, welche die Peptidsequenz SII des OVA Peptides erkennen. Folgerichtig führten 2C Zellen bei OVA-beladenen Neuronen zu keinem signifikant höheren Zelluntergang im Vergleich zu unbeladenen Neuronen. In der Zusammenschau dieser Versuche konnte geschlossen werden, dass der zytotoxische Effekt von OT-I Zellen auf Neurone streng Antigen-abhängig ist und nicht auf unspezifischen zytotoxischen Eigenschaften beruht.

4.4 Beteiligung Perforin- und Granzym B beinhaltender zytotoxischer Granula an der OT-I-vermittelten neuronalen Apoptose

Über die genauen molekularen und biochemischen Mechanismen, durch die CD8⁺ Lymphozyten befähigt werden, in ihren Zielzellen Zelltod zu induzieren, gibt es verschiedene Vorarbeiten (Brunner et al., 1995, Kayagaki et al., 1997, Gobel et al., 2010). Die wichtigsten beschriebenen durch ZTL vermittelten Apoptosewege sind zum einen liganden-vermittelte Wege z.B. über Fas-FasL (Kagi et al., 1994b, Choi and Benveniste, 2004) oder andere „Todesrezeptoren“ wie TRAIL (Hoffmann et al., 2009), zum anderen ein durch zytotoxische Granula induzierter Mechanismus z.B. Granzym und/oder Perforin vermittelt (Pipkin and Lieberman, 2007).

Um den Beitrag der FasL-vermittelten Apoptose zu untersuchen, wurde dieser liganden-vermittelte Apoptoseweg als *pars pro toto* mit Hilfe eines blockierenden Antikörpers in Co-Kultivierungs-Experimenten inhibiert. Die Blockierung dieses Signalweges zeigte in den Versuchen keinen Unterschied zur intakten ZTL-Neuroninteraktion und konnte somit als Mechanismus für den antigen-abhängigen neuronalen Zelluntergang - soweit experimentell möglich - ausgeschlossen werden. Dennoch gibt es in der Literatur Hinweise auf „Todesliganden“-vermittelte Interaktionen zwischen T-Zellen und Neuronen (Hoffmann et al., 2009).

Im Kontext der beschriebenen immun-neuronalen Interaktion betrug der Zeitgang bis zum Auftreten PI positiver Zielzellen ca. 72 min (Zeitkonstante τ , Abbildung 3.3 A). Dieser Befund passt sehr gut zur vorhandenen Literatur, denn in früheren Arbeiten (Waterhouse et al., 2006) konnte bereits gezeigt werden, dass die Zellmembran der Zielzelle nach Gabe einer nicht toxischen Konzentration von Perforin und unter Zugabe von Granzym ihre glatte Oberflächenstruktur verliert und im Verlauf eine inhomogene Struktur zeigt, welches als sog. „*blebbing*“ bezeichnet wird. Nach dieser Phase verliert die Zellmembran ihre Integrität, woraufhin PI die Membran passieren und von der Zelle aufgenommen werden kann. Dieser Vorgang benötigt ein bis zwei Stunden (Waterhouse et al., 2006).

Hingegen verliert die Zellmembran einer Zelle nach Zugabe einer toxischen Konzentration von Perforin innerhalb von Minuten ihre Integrität. Zusammenfassend kann man aus den oben beschriebenen Ergebnissen und dem vorliegenden Zeitgang der neuronalen Apoptose schlussfolgern, dass wahrscheinlich ein durch zytotoxische granula-vermittelter Mechanismus im verwendeten Zellsystem für die Induktion des Zelltodes in der Zielzelle verantwortlich zeichnet.

4.5 Elektrophysiologische Charakterisierung von murinen Neuronen während des direkten Kontakts mit zytotoxischen CD8⁺ T-Zellen

Ein wichtiger Aspekt dieser Arbeit lag auf der Untersuchung von elektrischen neuronalen Parametern nach direktem Zell-Zell-Kontakt mit CD8⁺ ZTL. Mit Hilfe eines 500 Hz Sinus-Stimulationsprotokolls wurde das Neuron nach T-Zellkontakt von -60 mV nach -100 mV elektrisch ausgelenkt. Diese Parameter wurden gewählt, da es mit ihnen möglich war, die passiven elektrischen Parameter R_m und C_m zu detektieren (Hallermann et al., 2003). Um ausschließen zu können, dass nach elektrischem Auslenken des Neurons spannungsgesteuerte Ionenkanäle den Membranwiderstand beeinflussen, wurde das Haltepotential des Reizprotokolls so gewählt, dass ausschließlich die passiven Zellparameter gemessen wurden, d.h. das Neuron wurde soweit hyperpolarisiert, dass keine spannungsgesteuerten Ionenkanäle aktiviert wurden. Dieser Umstand implizierte jedoch auch, dass eventuelle Effekte der T-Zelle auf spannungsgesteuerte Kanäle des Neurons nicht erfasst werden konnten.

Der direkte Zellkontakt eines antigen-präsentierenden Neurons mit einer aktivierten OT-I Zelle führte innerhalb von 10 min zu einer Erniedrigung des R_M um insgesamt ~50%. Aufgrund der Tatsache, dass Neurone bei einer elektrophysiologischen Messung für diesen Zeitraum unter Kontrollbedingungen

eine R_M Reduktion um 25% zeigten, kann man davon ausgehen, dass in etwa die Hälfte des R_M Rückganges nach OT-I-Kontakt durch die OT-I Zelle vermittelt wird. Aufgrund des Haltepotentials von -80 mV ist weitgehend ausgeschlossen, dass diese R_M Reduktion durch aktiven Transport über spannungsgesteuerte Ionenkanäle zustande kommt. Viel eher ist anzunehmen, dass die erhöhte Leitfähigkeit der Membran auf passive Ionenströme entlang des Konzentrationsgefälles beruht. Diese massive Änderung der passiven elektrischen Parameter eines Neurons hat somit starke Veränderungen für sämtliche elektrische Eigenschaften eines Neurons zur Folge, da aufgrund der erhöhten passiven Ionenströme über der Neuronenmembran eine langsame, aber stetige Depolarisation des Neurons stattfindet. Zu ähnlichen Ergebnissen führten auch schon frühere Arbeiten (Binah et al., 1992b, Felzen et al., 1994). In diesen konnte zum einen gezeigt werden, dass in ventrikulären Herzmuskelzellen sowohl der Kontakt mit ZTL, als auch nach direkter Exposition der Zellen mit lytischen Granula die AP-Rate und Amplitude sinkt. Des Weiteren zeigten diese Muskelzellen eine Depolarisation des Membranpotentials. Durch diese Effekte wird eine elektrisch aktive Zelle elektrisch „stumm geschaltet“, was in der Literatur als „*electrical silencing*“ bezeichnet wird. Es konnte in früheren Arbeiten gezeigt werden, dass diese sogenannte „elektrische Stummschaltung“ in einem Neuron (in der Gegenwart eines inflammatorischen Milieus) wiederum mit einer Hochregulation der MHC-I-Expression verbunden ist (Neumann et al., 1995, Neumann et al., 1998) und somit eine antigen-abhängige Erkennung und Interaktion der ZTL mit ihrer Zielzelle erleichtert wird. Somit hat der ZTL-abhängige Effekt auf die passiven elektrischen Parameter eines Neurons direkten Einfluss auf die mögliche Interaktion zwischen einer Immunzelle mit einem Neuron. Es entsteht in gewisser Weise ein sich selbst verstärkender Kreislauf.

4.6 Die Rolle von Perforin und Granzym B bei der Antigen-abhängigen Änderung von passiven elektrischen Parametern von Neuronen

Wie in den Co-Kultivierungsversuchen gezeigt wurde, scheint die OT-I vermittelte neuronale Apoptose über die aus zytotoxischen Granula freigesetzten Moleküle Granzym B und/oder Perforin induziert zu werden. Um den Effekt des „*electrical silencing*“ auch mechanistisch zu untersuchen, wurde in einer weiteren Versuchsserie geprüft, ob diese Mediatoren hierbei eine Rolle spielen. Hierfür wurde in den elektrophysiologischen Versuchen, OT-I Zellen mittels einer *patch-clamp*-Elektrode mit Neuronen in einen Zell-Zellkontakt gebracht. Hierbei wurden stimulierte OT-I T-Zellen von WT-Tieren sowie Granzym B- und Perforin-defiziente OT-I T-Zellen verwendet (Kagi et al., 1994a). In diesen Versuchen konnte gezeigt werden, dass ausschließlich Perforin für die Verringerung des R_M von antigen-präsentierenden Neuronen verantwortlich ist (Abbildung 3.8): Antigen-präsentierende Neurone, die mit Perforin-defizienten OT-I Lymphozyten in Kontakt gebracht wurden, zeigten keine signifikante R_M -Reduktion im Vergleich zu Kontrollmessungen mit nicht-defizienten OT-I Lymphozyten über den genannten Zeitraum. Im Gegensatz dazu hat das Fehlen des Granzym B-Clusters nahezu keinen Effekt auf die R_M -Reduktion im Vergleich zu nicht-defizienten OT-I Lymphozyten, so dass eine Beteiligung von Granzym B an der Reduktion des Membranwiderstandes weitgehend ausgeschlossen werden kann. Diese Ergebnisse ergänzen sich mit publizierten Ergebnissen (Pipkin and Lieberman, 2007) über die Wirkweise von Granzymen und Perforin. In früheren Untersuchungen wurde postuliert, dass Perforin als kalzium-durchlässiger unselektiver Membranporenbildner fungiert und dabei Granzymen über diese Poren ermöglicht, die Zellmembran zu passieren. Im Zytosol der Zielzelle spaltet Granzym B das zytosolische Protein Bid, welches daraufhin mit den mitochondrialen Membranproteinen Bax/Bak interagiert und schließlich zur Lyse der Mitochondrienmembran führt (Bolitho et al., 2007). Dies wiederum führt zur

Freisetzung von Cytochrom C in das Zytosol, welches daraufhin zu einer Aktivierung von Caspase 3 und somit zur Apoptose beiträgt.

Trotz der Fähigkeit einer Zelle, Schäden in der Membran in einem Zeitraum von Sekunden zu beheben (McNeil and Steinhardt, 2003), führt die Zugabe einer hohen Konzentration von Perforin zum Versagen dieser Kompensationsmechanismen. Durch diesen Mechanismus verliert die Membran ihre Integrität und die Zelle geht unabhängig von Granzym in die Nekrose (Pipkin and Lieberman, 2007, Waterhouse et al., 2006). Jedoch reicht die endogene Perforin-Konzentration einer einzelnen ZTL nicht aus, um die Zielzelle durch Lyse zu zerstören. Weitere Arbeiten, die in unserer Forschungsgruppe (Meuth et al., 2009, Gobel et al., 2010) durchgeführt wurden, zeigten allerdings, dass auch eine Perforin-unabhängige Granzym B vermittelte Zell-Apoptose existiert. Hierbei könnten die Granzyme über die Aktivierung des Mannose-6-Phosphat-Rezeptors in die Zielzelle gelangen (Motyka et al., 2000) und dort die Apoptose mit den begleitenden morphologischen Veränderungen induzieren. Diese Arbeiten zeigten, dass für durch zytotoxische Granula induzierten Zelltod nicht notwendigerweise Perforin und Granzyme parallel erforderlich sind. Im Gegensatz hierzu konnte mit dem in der vorgelegten Arbeit verwendeten experimentellen Ansatz gezeigt werden, dass zumindest für die Erniedrigung des R_M Perforin notwendig ist. Nur durch die Bildung Perforin-abhängiger unselektiver Poren, ist der Rückgang des R_M der Zielzellen im gemessenen Zeitraum zu erklären. Dass diese Zunahme des Membranleckstroms jedoch nicht zwangsläufig mit erhöhter Apoptose einhergeht, zeigt die Tatsache, dass durch Applikation von Nystatin zwar die elektrische Membranleitfähigkeit der Neurone sinkt (Abbildung 3.6), jedoch die Zellen nicht notwendiger Weise eine erhöhte Apoptoserate aufweisen (Abbildung 3.11).

Dieser Umstand zeigt, dass von OT-I Zellen sezerniertes Perforin für die Änderungen der passiven elektrischen Parameter in Neuronen verantwortlich ist, jedoch dieser Effekt in den Zellen nicht zwingend zur Apoptose führen muss. Man kann mutmaßen, dass die Induktion des Zelluntergangs maßgeblich von der Länge und Intensität des zum „*electrical silencing*“ führenden Stimulus abhängig ist.

4.7 Antigen-abhängiger Einfluss von OT-I Zellen auf elektrische Parameter in einem neuronalen Netzwerk

Für eine weitere Untermauerung der elektrophysiologischen Messdaten auf Einzelzellebene wurde ein Experiment konzipiert, bei dem die antigen-abhängige Neuron/OT-I-Interaktion auf der Ebene eines neuronalen Netzwerkes untersucht wurde. Für diese Untersuchung wurde ein hochdichtes Netzwerk aus hippocampalen Neuronen der Maus auf einem MEA kultiviert. Hochdichte primäre Neuronenkulturen erzeugen spontane Aktivität in Form von „bursts“-Entladungen, die letztendlich summierte Feldpotentiale einzelner neuronaler AP („spikes“) darstellen. Mit Hilfe eines MEA ist es möglich, diese Summenpotentiale zu detektieren. Ein intaktes neuronales Netzwerk zeigt rhythmische Salven von „bursts“-Aktivität (Abbildung 3.12, Abbildung 2.11). Nach Inflammation der Neurone mit IFN- γ und Beladung mit OVA bzw. mit dem Kontrollpeptid SIY analog zu den elektrophysiologischen Messungen auf Einzelzellebene, wurden die MEA-Neuronenkulturen mit OT-I Zellen inkubiert. Dieser Versuch zeigte neben den zuvor beschriebenen Änderungen der passiven elektrischen Parameter auch einen Effekt auf die Funktionalität auf der neuronalen Netzwerkebene. Auch dieser direkte Einfluss von ZTL auf Neuronen unterliegt einer deutlichen Antigen-Abhängigkeit (Abbildung 3.12). Dieser Ansatz zeigt, dass der Einfluss von ZTL auf Neurone nicht unbedingt nur über die Apoptose der Zielzelle ausgeübt werden muss, sondern dass die Änderung unterliegender elektrischer Parameter zu funktionellen Effekten auf der Netzwerkebene führt. Es kann vermutet werden, dass diese Effekte auch auf systemphysiologischer Ebene eine große Relevanz haben und helfen könnten, den Einfluss entzündlicher Läsionen auf das Verhalten bzw. die Funktionsausfälle von Tieren mit experimenteller autoimmuner Enzephalomyelitis bzw. Patienten mit MS zu erklären.

4.8 Antigen-abhängiger ZTL-Effekt und die Rolle von Perforin auf den intrazellulären Kalziumhaushalt primärer Neurone

Die Messergebnisse aus den elektrophysiologischen Untersuchungen und Daten aus früher publizierten Arbeiten (Felzen et al., 1994) legen den Verdacht nahe, dass ein Großteil der R_M -Reduktion über die Zunahme des Ca^{2+} -Einstroms durch die von Perforin gebildeten unselektiven Membranporen zustande kommt. Für Perforin-Poren ist bekannt, dass sie besonders für niedermolekulare Stoffe passierbar sind (Young et al., 1986) und dadurch eine hohe Leitfähigkeit für Ca^{2+} besitzen. Um diesen Sachverhalt im gewählten experimentellen Kontext zu untermauern sowie die in dieser Arbeit postulierte These zu bestätigen, dass die deutliche Erhöhung der Membranleitfähigkeit durch OT-I-attackierte Neurone Perforin-abhängig ist, wurde ein Experiment zur Analyse der Kalziumkinetik durchgeführt. Der experimentelle Ansatz wurde analog zu den elektrophysiologischen Messungen gewählt. Hierbei zeigte sich ein massiver Ca^{2+} -Einstrom in das Antigen-präsentierende Neuron nach Kontakt mit einem aktivierten OT-I Lymphozyt. Dabei zeigte der induzierte Ca^{2+} -Einstrom eine nahezu identische Kinetik wie die zuvor beschriebene R_M Reduktion. Weitere Messungen mit Neuronen, die das Kontrollpeptid SIY präsentierten, zeigten dagegen kaum eine Zunahme der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration (Abbildung 3.10). Somit scheint der OT-I-vermittelte Ca^{2+} -Einstrom klar Antigen-abhängig zu sein. Um zu klären, ob dieser Ca^{2+} -Einstrom über die Perforin-abhängigen Membranporen zustande kommt, wurde eine Einzelzell- Ca^{2+} -Messung in OVA-beladenen Neuronen nach Interaktion mit Perforin-defizienten OT-I Zellen durchgeführt. Passend zu den elektrophysiologischen Messungen zeigten auch Perforin-defiziente OT-I Zellen kaum einen Effekt auf den Ca^{2+} -Einstrom im interagierenden Neuron. Die Kalziumkonzentration im betroffenen Neuron blieb nach Kontakt mit einer Perforin-defizienten OT-I Zelle nahezu auf dem Ausgangsniveau, ähnlich wie in den Ca^{2+} -Messungen mit dem Kontrollpeptid und den Bleichkontrollen (Abbildung 3.10 E). Aufgrund dieser Datenlage ist davon

auszugehen, dass der massive Ca^{2+} -Einstrom über Perforin-abhängige Membranporen stattfindet und mit der Verringerung des Membranwiderstands vergesellschaftet ist.

4.9 Vergleich der Membranleitfähigkeit nach direktem OT-I-Kontakt mit einem theoretischen Modell der Leitfähigkeit von Perforin-haltigen Poren

Aufgrund der Annahme, dass die Zunahme des Stromes über die Neuronenmembran nach ZTL-Kontakt über Perforin-abhängige Poren zustande kommt, wurde ein theoretisches Modell über die angenommene Zahl der benötigten Poren, für die gezeigte Stromzunahme erstellt. Die Abnahme von R_M , die sich aus dem Kehrwert des Membranstroms ergibt, ($G_M = 1/R_M$) beträgt bei OT-I WT-Zellen ca. 0.5 G Ω , wobei R_M von etwa 1 G Ω auf 0.5 G Ω reduziert wird. Hingegen nimmt R_M bei Neuronen nach Kontakt mit Perforin-defiziente OT-I Zellen innerhalb von 10 min nur bis zu etwa 0.75 G Ω ab. Anhand dieser Daten ist davon auszugehen, dass alleine die Perforinporen für eine Zunahme der Leitfähigkeit über die gesamte neuronale Membran von 1,3 μS auf 2 μS verantwortlich sind. Unter Annahme einer „Offen-Wahrscheinlichkeit“ der Perforinporen von nahezu $p = 1$ und unter Ausschluss von spannungsabhängigen Einzelkanalströmen ist eine Einzelkanalleitfähigkeit von $\sim 1 - 2 \mu\text{S}$ publiziert worden (Young et al., 1986, Persechini et al., 1990). Anhand dieser Daten kann die hier gemessene Erhöhung der Membranleitfähigkeit durch Perforin-abhängige Poren [$n = \Delta G_M / \gamma p$] um ca. 700 pS nicht erklärt werden. Jedoch wurde in den genannten publizierten Arbeiten die Leitfähigkeit der Perforinporen ausschließlich mit exogen zugeführtem Perforin in einer nicht physiologischen, sehr hohen Konzentration gemessen (Young et al., 1986, Persechini et al., 1990, Binah et al., 1992a, Felzen et al., 1994). Die in dieser Arbeit gemessenen Werte der Membranleitfähigkeit resultieren aus einer physiologischeren Situation nach direktem Neuron-ZTL-Kontakt. Dieser Umstand

erklärt eine wesentlich geringere „Offen-Wahrscheinlichkeit“ der Perforinporen. Diese Tatsache und eine wesentlich geringere Perforin-Konzentration könnten für den kleineren Anstieg der Membranleitfähigkeit verantwortlich sein.

Abschließend zeigen die hier erzielten Ergebnisse, dass $CD8^+$ T-Zellen nach direktem Kontakt innerhalb von Minuten in der Lage sind, in Neuronen eine massive Änderung der passiven elektrischen Parameter hervorzurufen. Diese Erniedrigung des R_M in den Zielzellen ist zu einem überwiegenden Teil durch Perforin hervorgerufen, das durch die Bildung von Membranporen einen Kalziumeinstrom in die Zielzelle verursacht. Jedoch konnte demonstriert werden, dass dieses sogenannte „*electrical silencing*“ nicht zwingend zum Zelltod führt.

5 Zusammenfassung

Zytotoxische CD8⁺ T-Lymphozyten spielen in vielen inflammatorischen, aber auch primär neurodegenerativen Erkrankungen eine wichtige Rolle. Daher besitzt die Fragestellung inwiefern CD8⁺ ZTL Neurone direkt schädigen und ggf. welche mechanistischen Aspekte dieser Schädigung zugrunde liegen, eine hohe Relevanz. Um diese Fragestellung eingehender zu beleuchten, wurde mit dem OT-I-System gearbeitet. Dieses gut vorcharakterisierte CD8⁺ T-Zell-Modell besitzt den Vorteil, dass diese transgenen Zellen nur eine Peptidsequenz des Ovalbumin (OVA) Protein als spezifisches Antigen erkennen.

Zunächst wurden in der vorliegenden Arbeit Co-Kultivierungs-Experimente durchgeführt. Hierzu wurden akut isolierte murine Hippokampus-Neurone unter verschiedenen Bedingungen mit OT-I Lymphozyten co-kultiviert. Hierbei konnte gezeigt werden, dass unter Antigenpräsentation der Neurone signifikant mehr Neurone in die Apoptose/Nekrose geführt werden, als unter Kontroll-Bedingungen, in denen entweder kein Antigen oder ein Antigen, das nicht von OT-I Lymphozyten erkannt wird, präsentiert wird.

Nachdem die Antigen-abhängigen zytotoxischen Effekte auf Neurone gezeigt werden konnten, wurde mithilfe elektrophysiologischer Techniken die mechanistischen und funktionellen Konsequenzen des direkten neuronalen/OT-I-vermittelten Zellkontakts untersucht. Bei diesem experimentellen Ansatz wurde durch elektrisches Auslenken eines Neurons nach Kontakt mit einem OT-I Lymphozyt die passiven elektrischen Parameter der Neuronenmembran gemessen. In diesen Messungen konnte gezeigt werden, dass nach unmittelbarem Kontakt eines Neurons mit einem OT-I Lymphozyt der neuronale Membranwiderstand reduziert wird bzw. die Leitfähigkeit der Zellmembran erhöht wird. Diese Änderung der neuronalen Membran-Leitfähigkeit findet in einem Zeitraum von 10 min nach dem Zell-Zell-Kontakt statt. Auch hier konnte gezeigt werden, dass dieser Einfluss von OT-I Lymphozyten auf Neurone strikt Antigen-abhängig ist. Zur Untersuchung des Mechanismus der OT-I T-Lymphozyten auf Neurone wurde das Augenmerk auf verschiedene T-Zell-induzierte Apoptosewege

gelegt. Es konnte gezeigt werden, dass durch Blockieren der Fas/FasL-Interaktion mittels eines Antikörpers kein Unterschied, weder in der neuronalen Apoptoserate nach Co-Kultivierung, noch eine Änderung der passiven neuronalen Membran-Leitfähigkeit auftritt. Weiterhin wurde die Rolle der von T-Zellen sezernierten Granula Perforin und Granzym B untersucht. Um den Einfluss dieser Granula aufzuklären, wurden OT-I Lymphozyten verwendet, die entweder defizient für Perforin oder Granzym B waren. In diesem experimentellen Ansatz wurde gezeigt, dass ausschließlich Perforin für die Erniedrigung des passiven neuronalen Membran-Widerstandes verantwortlich ist.

Diese Erhöhung der neuronalen Membranleitfähigkeit führte aber nicht direkt zum neuronalen Zelltod. Vielmehr wurde durch die einhergehende Depolarisation des Neurons die elektrische Aktivität der Zelle vermindert, sodass es zu einem sogenannten „*electrical silencing*“ kommt. Dieser Umstand konnte auch in der Betrachtung der spontanen Netzwerkaktivität von Neuronenkulturen gezeigt werden. Hierfür wurden hoch dichte Neuronenkulturen auf MEA-Chips kultiviert. Mit Hilfe dieser MEA konnten die Summenfeldpotentiale der Neuronenkulturen detektiert werden. Hierbei wurde beobachtet, dass nach Beladung der Neuronen mit dem spezifischen OT-I-Antigen und OT-I Zellen eine Verringerung der spontanen Netzwerkaktivität einhergeht. Auch in diesem Effekt konnte eine Antigen-Spezifität nachgewiesen werden.

Da der Prozess der zellulären Apoptose mit einem Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration einhergeht, und Perforin als Ca^{2+} -durchlässiger unselektiver Porenbildner fungiert, wurden zur Überprüfung der Hypothese *calcium imaging*-Experimente durchgeführt. Analog zu den elektrophysiologischen Messungen wurde gezeigt, dass nach direktem Zell-Zell-Kontakt zwischen Neuron und OT-I Lymphozyt eine Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration zu messen ist. Dass diese Änderung des neuronalen Ca^{2+} -Einstroms durch Perforin-abhängige Membranporen hervorgerufen wird, konnte durch die Verwendung von Perforin-defizienten OT-I Lymphozyten bewiesen werden. Unter Verwendung von Perforin-defizienten OT-I Lymphozyten wurde keine Änderung der neuronalen Ca^{2+} -Konzentration ermittelt. Weiterhin wurde in diesem experimentellen Ansatz gezeigt, dass auch der OT-I-vermittelte neuronale Ca^{2+} -Anstieg strikt Antigen-abhängig ist.

Zusammengefasst konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass MHC-I/Antigen-vermittelte CD8⁺ Lymphozyten-Interaktion mit einem Neuron zu „*electrical silencing*“ des Neurons führt. Dieser Prozess ist klar Perforin-abhängig, führt jedoch nicht zum unmittelbaren Zelltod des Neurons.

5.1 Abstract

Cytotoxic CD8⁺ T cells are considered as important effector cells contributing to neuronal damage in inflammatory and primary degenerative disorders in the CNS. Hence, it is highly relevant to know to what extent CD8⁺ T-lymphocytes can contribute to neuronal damage in these disorders. To challenge this question, we used the murine OT-I system. The advantage of this well-characterized transgenic model is that OT-I CD8⁺ T-lymphocytes are restricted to one single antigen – one peptide sequence of Ovalbumin (Ova). In a first set of experiments, OT-I lymphocytes were co-cultured with neurons that presented Ova in a MHC-I specific context on their surface. As control, neurons without any antigen or neurons that presented a scrambled peptide form (SIY) were used. These co-culture experiments indicates that neuronal killing by OT-I lymphocytes is a MHC-I and antigen-dependent mechanism.

To clarify the underlying mechanism and the functionally consequences in this OT-I/neuron interaction, we performed electrophysiological patch-clamp analysis to measure the influence from one single OT-I T-cell on a single neuron. For this purpose, we established a special protocol to stimulate the neuronal membrane to measure the passive electrical parameters after a direct OT-I contact. These measurements revealed a significant antigen restricted reduction in neuronal membrane resistance. This effect could be detected within 10 min after the direct cell-cell contact. To challenge the underlying cellular mechanisms we analyzed several known apoptosis pathways. In a first set of experiments, we investigated the Fas/FasL interaction. To answer this question, we used a blocking FasL antibody, to interrupt this pathway. These experiments showed no changes in

neuronal apoptosis, neither in co-cultivation experiments nor in the electrophysiological situation. As next step we investigate the role of CD8⁺ lymphocyte derived granula perforin and granzyme B. Therefore we used OT-I T-cells that are either deficient for perforin or granzyme B. Using these experimental conditions, we could show that only perforin is responsible for changing passive electrical parameters.

However, these reductions in neuronal membrane resistance did not lead immediately in neuronal cell death, but rather led to a depolarization and therefore to an electrical silencing of the neuron. This electrical silencing was also shown to occur in the spontaneous network activity in a neuronal network. The network activity was measured on a high density neuron network cultivated on a MEA. These MEA measurements revealed a decrease in the total spike activity after loading of OT-I lymphocytes on an antigen presenting neuronal network.

Due to the increase of the intracellular Ca²⁺ level in the process of cell death and the Ca²⁺ selectivity of perforin membrane pores, we hypothesized that neuronal silencing and neuronal cell death elicited by perforin pores might lead to an intracellular Ca²⁺ increase. To proof this hypothesis we established a calcium imaging experiment in an OT-I/neuron contact situation. These measurements were done in the same manner as the electrophysiological measurements. Ca²⁺ imaging indicated increasing Ca²⁺ levels in neurons after application of perforin releasing OT-I lymphocytes. Furthermore, these experiments revealed a strictly antigen dependence for Ca²⁺ increase in target cells.

In conclusion, we could show that MHC-I/antigen-mediated CD8⁺ lymphocyte interactions with neurons led to their electrical silencing. This process was perforin dependent. However this process was not causally linked to neuronal cell death.

6 Literatur

- ACKERMAN, A. L. & CRESSWELL, P. 2004. Cellular mechanisms governing cross-presentation of exogenous antigens. *Nat Immunol*, 5, 678-84.
- AHMED, Z., DOWARD, A. I., PRYCE, G., TAYLOR, D. L., POCOCK, J. M., LEONARD, J. P., BAKER, D. & CUZNER, M. L. 2002. A role for caspase-1 and -3 in the pathology of experimental allergic encephalomyelitis : inflammation versus degeneration. *The American journal of pathology*, 161, 1577-86.
- AKTAS, O., ULLRICH, O., INFANTE-DUARTE, C., NITSCH, R. & ZIPP, F. 2007. Neuronal damage in brain inflammation. *Archives of neurology*, 64, 185-9.
- ALBERT, M. L., AUSTIN, L. M. & DARNELL, R. B. 2000. Detection and treatment of activated T cells in the cerebrospinal fluid of patients with paraneoplastic cerebellar degeneration. *Ann Neurol*, 47, 9-17.
- ALBERT, M. L., DARNELL, J. C., BENDER, A., FRANCISCO, L. M., BHARDWAJ, N. & DARNELL, R. B. 1998. Tumor-specific killer cells in paraneoplastic cerebellar degeneration. *Nature medicine*, 4, 1321-4.
- ALBERT, M. L. & DARNELL, R. B. 2004. Paraneoplastic neurological degenerations: keys to tumour immunity. *Nat Rev Cancer*, 4, 36-44.
- BAUER, J., ELGER, C. E., HANS, V. H., SCHRAMM, J., URBACH, H., LASSMANN, H. & BIEN, C. G. 2007. Astrocytes are a specific immunological target in Rasmussen's encephalitis. *Ann Neurol*, 62, 67-80.
- BEAUVILLAIN, C., DONNOU, S., JARRY, U., SCOTET, M., GASCAN, H., DELNESTE, Y., GUERMONPREZ, P., JEANNIN, P. & COUEZ, D. 2008. Neonatal and adult microglia cross-present exogenous antigens. *Glia*, 56, 69-77.
- BECHER, B., BECHMANN, I. & GRETER, M. 2006. Antigen presentation in autoimmunity and CNS inflammation: how T lymphocytes recognize the brain. *J Mol Med*, 84, 532-43.
- BECHMANN, I., MOR, G., NILSEN, J., ELIZA, M., NITSCH, R. & NAFTOLIN, F. 1999. FasL (CD95L, Apo1L) is expressed in the normal rat and human brain: evidence for the existence of an immunological brain barrier. *Glia*, 27, 62-74.
- BIEN, C. G., BAUER, J., DECKWERTH, T. L., WIENDL, H., DECKERT, M., WIESTLER, O. D., SCHRAMM, J., ELGER, C. E. & LASSMANN, H. 2002. Destruction of neurons by cytotoxic T cells: a new pathogenic mechanism in Rasmussen's encephalitis. *Ann Neurol*, 51, 311-8.
- BINAH, O., MAROM, S., RUBINSTEIN, I., ROBINSON, R. B., BERKE, G. & HOFFMAN, B. F. 1992a. Immunological rejection of heart transplant: how lytic granules from cytotoxic T lymphocytes damage guinea pig ventricular myocytes. *Pflugers Archiv : European journal of physiology*, 420, 172-9.
- BINAH, O., MAROM, S., RUBINSTEIN, I., ROBINSON, R. B., BERKE, G. & HOFFMAN, B. F. 1992b. Immunological rejection of heart transplant: how lytic granules from cytotoxic T lymphocytes damage guinea pig ventricular myocytes. *Pflugers Arch*, 420, 172-9.
- BITSCH, A., SCHUCHARDT, J., BUNKOWSKI, S., KUHLMANN, T. & BRUCK, W. 2000. Acute axonal injury in multiple sclerosis. Correlation with demyelination and inflammation. *Brain : a journal of neurology*, 123 (Pt 6), 1174-83.

- BO, L., VEDELER, C. A., NYLAND, H., TRAPP, B. D. & MORK, S. J. 2003. Intracortical multiple sclerosis lesions are not associated with increased lymphocyte infiltration. *Multiple sclerosis*, 9, 323-31.
- BOLITHO, P., VOSKOBOINIK, I., TRAPANI, J. A. & SMYTH, M. J. 2007. Apoptosis induced by the lymphocyte effector molecule perforin. *Current opinion in immunology*, 19, 339-47.
- BOOSS, J., ESIRI, M. M., TOURTELLOTTE, W. W. & MASON, D. Y. 1983. Immunohistological analysis of T lymphocyte subsets in the central nervous system in chronic progressive multiple sclerosis. *J Neurol Sci*, 62, 219-32.
- BREART, B., LEMAITRE, F., CELLI, S. & BOUSSO, P. 2008. Two-photon imaging of intratumoral CD8+ T cell cytotoxic activity during adoptive T cell therapy in mice. *The Journal of clinical investigation*, 118, 1390-7.
- BRISEBOIS, M., ZEHNTNER, S. P., ESTRADA, J., OWENS, T. & FOURNIER, S. 2006. A pathogenic role for CD8+ T cells in a spontaneous model of demyelinating disease. *J Immunol*, 177, 2403-11.
- BROCHARD, V., COMBADIÈRE, B., PRIGENT, A., LAOUAR, Y., PERRIN, A., BERAY-BERTHAT, V., BONDUËLLE, O., ALVAREZ-FISCHER, D., CALLEBERT, J., LAUNAY, J. M., DUYCKAERTS, C., FLAVELL, R. A., HIRSCH, E. C. & HUNOT, S. 2009. Infiltration of CD4+ lymphocytes into the brain contributes to neurodegeneration in a mouse model of Parkinson disease. *The Journal of clinical investigation*, 119, 182-92.
- BRUNNER, T., MOGIL, R. J., LAFACE, D., YOO, N. J., MAHBOUBI, A., ECHEVERRI, F., MARTIN, S. J., FORCE, W. R., LYNCH, D. H., WARE, C. F. & ET AL. 1995. Cell-autonomous Fas (CD95)/Fas-ligand interaction mediates activation-induced apoptosis in T-cell hybridomas. *Nature*, 373, 441-4.
- BUZZA, M. S. & BIRD, P. I. 2006. Extracellular granzymes: current perspectives. *Biol Chem*, 387, 827-37.
- CARBONE, F. R., KURTS, C., BENNETT, S. R., MILLER, J. F. & HEATH, W. R. 1998. Cross-presentation: a general mechanism for CTL immunity and tolerance. *Immunol Today*, 19, 368-73.
- CARDONA, A. E., PIORO, E. P., SASSE, M. E., KOSTENKO, V., CARDONA, S. M., DIJKSTRA, I. M., HUANG, D., KIDD, G., DOMBROWSKI, S., DUTTA, R., LEE, J. C., COOK, D. N., JUNG, S., LIRA, S. A., LITTMAN, D. R. & RANSOHOFF, R. M. 2006. Control of microglial neurotoxicity by the fractalkine receptor. *Nature neuroscience*, 9, 917-24.
- CHOI, C. & BENVENISTE, E. N. 2004. Fas ligand/Fas system in the brain: regulator of immune and apoptotic responses. *Brain Res Brain Res Rev*, 44, 65-81.
- COLEMAN, M. 2005. Axon degeneration mechanisms: commonality amid diversity. *Nature reviews. Neuroscience*, 6, 889-98.
- DAS, A., GUYTON, M. K., MATZELLE, D. D., RAY, S. K. & BANIK, N. L. 2008. Time-dependent increases in protease activities for neuronal apoptosis in spinal cords of Lewis rats during development of acute experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of neuroscience research*, 86, 2992-3001.
- DENECKER, G., VERCAMMEN, D., DECLERCQ, W. & VANDENABEELE, P. 2001a. Apoptotic and necrotic cell death induced by death domain receptors. *Cell Mol Life Sci*, 58, 356-70.
- DENECKER, G., VERCAMMEN, D., STEEMANS, M., VANDEN BERGHE, T., BROUCKAERT, G., VAN LOO, G., ZHIVOTOVSKY, B., FIERS, W., GROOTEN, J., DECLERCQ, W. & VANDENABEELE, P. 2001b. Death receptor-

- induced apoptotic and necrotic cell death: differential role of caspases and mitochondria. *Cell death and differentiation*, 8, 829-40.
- DUSTIN, M. L., BROMLEY, S. K., KAN, Z., PETERSON, D. A. & UNANUE, E. R. 1997. Antigen receptor engagement delivers a stop signal to migrating T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, 3909-13.
- ESSER, M. T., HAVERSTICK, D. M., FULLER, C. L., GULLO, C. A. & BRACIALE, V. L. 1998. Ca²⁺ signaling modulates cytolytic T lymphocyte effector functions. *The Journal of experimental medicine*, 187, 1057-67.
- FELZEN, B., BERKE, G., ROSEN, D., COLEMAN, R., TSCHOPP, J., YOUNG, J. D. & BINAH, O. 1994. Effects of purified perforin and granzyme A from cytotoxic T lymphocytes on guinea pig ventricular myocytes. *Cardiovascular research*, 28, 643-9.
- FERGUSON, B., MATYSZAK, M. K., ESIRI, M. M. & PERRY, V. H. 1997. Axonal damage in acute multiple sclerosis lesions. *Brain : a journal of neurology*, 120 (Pt 3), 393-9.
- FLUGEL, A., BERKOWICZ, T., RITTER, T., LABEUR, M., JENNE, D. E., LI, Z., ELLWART, J. W., WILLEM, M., LASSMANN, H. & WEKERLE, H. 2001. Migratory activity and functional changes of green fluorescent effector cells before and during experimental autoimmune encephalomyelitis. *Immunity*, 14, 547-60.
- FLUGEL, A., ODOARDI, F., NOSOV, M. & KAWAKAMI, N. 2007. Autoaggressive effector T cells in the course of experimental autoimmune encephalomyelitis visualized in the light of two-photon microscopy. *J Neuroimmunol*, 191, 86-97.
- FORD, M. L. & EVAVOLD, B. D. 2005. Specificity, magnitude, and kinetics of MOG-specific CD8+ T cell responses during experimental autoimmune encephalomyelitis. *European journal of immunology*, 35, 76-85.
- FREI, K., SIEPL, C., GROSCURTH, P., BODMER, S., SCHWERDEL, C. & FONTANA, A. 1987. Antigen presentation and tumor cytotoxicity by interferon-gamma-treated microglial cells. *European journal of immunology*, 17, 1271-8.
- FRUMENTO, G., ROTONDO, R., TONETTI, M., DAMONTE, G., BENATTI, U. & FERRARA, G. B. 2002. Tryptophan-derived catabolites are responsible for inhibition of T and natural killer cell proliferation induced by indoleamine 2,3-dioxygenase. *The Journal of experimental medicine*, 196, 459-68.
- GALEA, I., BECHMANN, I. & PERRY, V. H. 2007a. What is immune privilege (not)? *Trends in immunology*, 28, 12-8.
- GALEA, I., BERNARDES-SILVA, M., FORSE, P. A., VAN ROOIJEN, N., LIBLAU, R. S. & PERRY, V. H. 2007b. An antigen-specific pathway for CD8 T cells across the blood-brain barrier. *The Journal of experimental medicine*, 204, 2023-30.
- GIOMETTO, B., MARCHIORI, G. C., NICOLAO, P., SCARAVILLI, T., LION, A., BARDIN, P. G. & TAVOLATO, B. 1997. Sub-acute cerebellar degeneration with anti-Yo autoantibodies: immunohistochemical analysis of the immune reaction in the central nervous system. *Neuropathology and applied neurobiology*, 23, 468-74.
- GIULIANI, F., GOODYER, C. G., ANTEL, J. P. & YONG, V. W. 2003. Vulnerability of human neurons to T cell-mediated cytotoxicity. *J Immunol*, 171, 368-79.
- GOBEL, K., MELZER, N., HERRMANN, A. M., SCHUHMANN, M. K., BITTNER, S., IP, C. W., HUNIG, T., MEUTH, S. G. & WIENDL, H. 2010. Collateral neuronal apoptosis in CNS gray matter during an oligodendrocyte-directed CD8(+) T cell attack. *Glia*, 58, 469-80.
- GRETER, M., HEPPNER, F. L., LEMOS, M. P., ODERMATT, B. M., GOEBELS, N., LAUFER, T., NOELLE, R. J. & BECHER, B. 2005. Dendritic cells permit immune

- invasion of the CNS in an animal model of multiple sclerosis. *Nature medicine*, 11, 328-34.
- GUYTON, M. K., WINGRAVE, J. M., YALLAPRAGADA, A. V., WILFORD, G. G., SRIBNICK, E. A., MATZELLE, D. D., TYOR, W. R., RAY, S. K. & BANIK, N. L. 2005. Upregulation of calpain correlates with increased neurodegeneration in acute experimental auto-immune encephalomyelitis. *Journal of neuroscience research*, 81, 53-61.
- HALLERMANN, S., PAWLU, C., JONAS, P. & HECKMANN, M. 2003. A large pool of releasable vesicles in a cortical glutamatergic synapse. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 8975-80.
- HASBANI, M. J., HYRC, K. L., FADDIS, B. T., ROMANO, C. & GOLDBERG, M. P. 1998. Distinct roles for sodium, chloride, and calcium in excitotoxic dendritic injury and recovery. *Experimental neurology*, 154, 241-58.
- HAUSER, S. L., BHAN, A. K., GILLES, F., KEMP, M., KERR, C. & WEINER, H. L. 1986. Immunohistochemical analysis of the cellular infiltrate in multiple sclerosis lesions. *Annals of neurology*, 19, 578-87.
- HEUSEL, J. W., WESSELSCHMIDT, R. L., SHRESTA, S., RUSSELL, J. H. & LEY, T. J. 1994. Cytotoxic lymphocytes require granzyme B for the rapid induction of DNA fragmentation and apoptosis in allogeneic target cells. *Cell*, 76, 977-87.
- HOBOM, M., STORCH, M. K., WEISSERT, R., MAIER, K., RADHAKRISHNAN, A., KRAMER, B., BAHR, M. & DIEM, R. 2004. Mechanisms and time course of neuronal degeneration in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain pathology*, 14, 148-57.
- HOEK, R. M., RUULS, S. R., MURPHY, C. A., WRIGHT, G. J., GODDARD, R., ZURAWSKI, S. M., BLOM, B., HOMOLA, M. E., STREIT, W. J., BROWN, M. H., BARCLAY, A. N. & SEDGWICK, J. D. 2000. Down-regulation of the macrophage lineage through interaction with OX2 (CD200). *Science*, 290, 1768-71.
- HOFFMANN, O., ZIPP, F. & WEBER, J. R. 2009. Tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) in central nervous system inflammation. *J Mol Med (Berl)*, 87, 753-63.
- HOFTBERGER, R., ABOUL-ENEIN, F., BRUECK, W., LUCCHINETTI, C., RODRIGUEZ, M., SCHMIDBAUER, M., JELLINGER, K. & LASSMANN, H. 2004. Expression of major histocompatibility complex class I molecules on the different cell types in multiple sclerosis lesions. *Brain pathology*, 14, 43-50.
- HOGQUIST, K. A., JAMESON, S. C., HEATH, W. R., HOWARD, J. L., BEVAN, M. J. & CARBONE, F. R. 1994. T cell receptor antagonist peptides induce positive selection. *Cell*, 76, 17-27.
- HOLZ, R. & FINKELSTEIN, A. 1970. The water and nonelectrolyte permeability induced in thin lipid membranes by the polyene antibiotics nystatin and amphotericin B. *J Gen Physiol*, 56, 125-45.
- HOWE, C. L., ADELSON, J. D. & RODRIGUEZ, M. 2007. Absence of perforin expression confers axonal protection despite demyelination. *Neurobiol Dis*, 25, 354-9.
- HUSE, M., QUANN, E. J. & DAVIS, M. M. 2008. Shouts, whispers and the kiss of death: directional secretion in T cells. *Nat Immunol*, 9, 1105-11.
- HUSEBY, E. S., LIGGITT, D., BRABB, T., SCHNABEL, B., OHLEN, C. & GOVERMAN, J. 2001. A pathogenic role for myelin-specific CD8(+) T cells in a model for multiple sclerosis. *The Journal of experimental medicine*, 194, 669-76.

- IP, C. W., KRONER, A., BENDSZUS, M., LEDER, C., KOBASAR, I., FISCHER, S., WIENDL, H., NAVE, K. A. & MARTINI, R. 2006. Immune cells contribute to myelin degeneration and axonopathic changes in mice overexpressing proteolipid protein in oligodendrocytes. *J Neurosci*, 26, 8206-16.
- ISAAZ, S., BAETZ, K., OLSEN, K., PODACK, E. & GRIFFITHS, G. M. 1995. Serial killing by cytotoxic T lymphocytes: T cell receptor triggers degranulation, re-filling of the lytic granules and secretion of lytic proteins via a non-granule pathway. *European journal of immunology*, 25, 1071-9.
- ITAGAKI, S., MCGEER, P. L. & AKIYAMA, H. 1988. Presence of T-cytotoxic suppressor and leucocyte common antigen positive cells in Alzheimer's disease brain tissue. *Neurosci Lett*, 91, 259-64.
- JOHNSON, A. J., UPSHAW, J., PAVELKO, K. D., RODRIGUEZ, M. & PEASE, L. R. 2001. Preservation of motor function by inhibition of CD8+ virus peptide-specific T cells in Theiler's virus infection. *FASEB J*, 15, 2760-2.
- KAGEYAMA, S., TSOMIDES, T. J., SYKULEV, Y. & EISEN, H. N. 1995. Variations in the number of peptide-MHC class I complexes required to activate cytotoxic T cell responses. *J Immunol*, 154, 567-76.
- KAGI, D., LEDERMANN, B., BURKI, K., SEILER, P., ODERMATT, B., OLSEN, K. J., PODACK, E. R., ZINKERNAGEL, R. M. & HENGARTNER, H. 1994a. Cytotoxicity mediated by T cells and natural killer cells is greatly impaired in perforin-deficient mice. *Nature*, 369, 31-7.
- KAGI, D., VIGNAUX, F., LEDERMANN, B., BURKI, K., DEPRAETERE, V., NAGATA, S., HENGARTNER, H. & GOLSTEIN, P. 1994b. Fas and perforin pathways as major mechanisms of T cell-mediated cytotoxicity. *Science*, 265, 528-30.
- KAWAKAMI, N., NAGERL, U. V., ODOARDI, F., BONHOEFFER, T., WEKERLE, H. & FLUGEL, A. 2005. Live imaging of effector cell trafficking and autoantigen recognition within the unfolding autoimmune encephalomyelitis lesion. *The Journal of experimental medicine*, 201, 1805-14.
- KAWAMATA, T., AKIYAMA, H., YAMADA, T. & MCGEER, P. L. 1992. Immunologic reactions in amyotrophic lateral sclerosis brain and spinal cord tissue. *Am J Pathol*, 140, 691-707.
- KAYAGAKI, N., YAMAGUCHI, N., NAGAO, F., MATSUO, S., MAEDA, H., OKUMURA, K. & YAGITA, H. 1997. Polymorphism of murine Fas ligand that affects the biological activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94, 3914-9.
- KESSLER, B., HUDRISIER, D., SCHROETER, M., TSCHOPP, J., CEROTTINI, J. C. & LUESCHER, I. F. 1998. Peptide modification or blocking of CD8, resulting in weak TCR signaling, can activate CTL for Fas- but not perforin-dependent cytotoxicity or cytokine production. *J Immunol*, 161, 6939-46.
- KONING, N., BO, L., HOEK, R. M. & HUITINGA, I. 2007. Downregulation of macrophage inhibitory molecules in multiple sclerosis lesions. *Ann Neurol*, 62, 504-14.
- KUHLMANN, T., LINGFELD, G., BITSCH, A., SCHUCHARDT, J. & BRUCK, W. 2002. Acute axonal damage in multiple sclerosis is most extensive in early disease stages and decreases over time. *Brain : a journal of neurology*, 125, 2202-12.
- KUHN, J. R. & POENIE, M. 2002. Dynamic polarization of the microtubule cytoskeleton during CTL-mediated killing. *Immunity*, 16, 111-21.

- KURTS, C., CARBONE, F. R., BARNDEN, M., BLANAS, E., ALLISON, J., HEATH, W. R. & MILLER, J. F. 1997a. CD4⁺ T cell help impairs CD8⁺ T cell deletion induced by cross-presentation of self-antigens and favors autoimmunity. *The Journal of experimental medicine*, 186, 2057-62.
- KURTS, C., KOSAKA, H., CARBONE, F. R., MILLER, J. F. & HEATH, W. R. 1997b. Class I-restricted cross-presentation of exogenous self-antigens leads to deletion of autoreactive CD8(+) T cells. *The Journal of experimental medicine*, 186, 239-45.
- LI, G. & HERLYN, M. 2005. Information sharing and collateral damage. *Trends Mol Med*, 11, 350-2.
- LI, Y., UCCELLI, A., LAXER, K. D., JEONG, M. C., VINTERS, H. V., TOURTELLOTTE, W. W., HAUSER, S. L. & OKSENBERG, J. R. 1997. Local-clonal expansion of infiltrating T lymphocytes in chronic encephalitis of Rasmussen. *J Immunol*, 158, 1428-37.
- LIBLAU, R. S., GONZALEZ-DUNIA, D., WIENDL, H. & ZIPP, F. 2013. Neurons as targets for T cells in the nervous system. *Trends in neurosciences*, 36, 315-24.
- LIU, C. & HERMANN, T. E. 1978. Characterization of ionomycin as a calcium ionophore. *J Biol Chem*, 253, 5892-4.
- LIU, Y., TEIGE, I., BIRNIR, B. & ISSAZADEH-NAVIKAS, S. 2006. Neuron-mediated generation of regulatory T cells from encephalitogenic T cells suppresses EAE. *Nature medicine*, 12, 518-25.
- LOWIN, B., HAHNE, M., MATTMANN, C. & TSCHOPP, J. 1994. Cytolytic T-cell cytotoxicity is mediated through perforin and Fas lytic pathways. *Nature*, 370, 650-2.
- MAGNUS, T., SCHREINER, B., KORN, T., JACK, C., GUO, H., ANTEL, J., IFERGAN, I., CHEN, L., BISCHOF, F., BAR-OR, A. & WIENDL, H. 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, 2537-46.
- MALIPIERO, U., HEUSS, C., SCHLAPBACH, R., TSCHOPP, J., GERBER, U. & FONTANA, A. 1999. Involvement of the N-methyl-D-aspartate receptor in neuronal cell death induced by cytotoxic T cell-derived secretory granules. *European journal of immunology*, 29, 3053-62.
- MALMESTROM, C., LYCKE, J., HAGHIGHI, S., ANDERSEN, O., CARLSSON, L., WADENVIK, H. & OLSSON, B. 2008. Relapses in multiple sclerosis are associated with increased CD8⁺ T-cell mediated cytotoxicity in CSF. *J Neuroimmunol*, 196, 159-65.
- MATTER, A. 1979. Microcinematographic and electron microscopic analysis of target cell lysis induced by cytotoxic T lymphocytes. *Immunology*, 36, 179-90.
- MCGAVERN, D. B., CHRISTEN, U. & OLDSTONE, M. B. 2002. Molecular anatomy of antigen-specific CD8(+) T cell engagement and synapse formation in vivo. *Nat Immunol*, 3, 918-25.
- MCNEIL, P. L. & STEINHARDT, R. A. 2003. Plasma membrane disruption: repair, prevention, adaptation. *Annual review of cell and developmental biology*, 19, 697-731.
- MCPHERSON, S. W., HEUSS, N. D., ROEHRICH, H. & GREGERSON, D. S. 2006. Bystander killing of neurons by cytotoxic T cells specific for a glial antigen. *Glia*, 53, 457-66.

- MEDANA, I., LI, Z., FLUGEL, A., TSCHOPP, J., WEKERLE, H. & NEUMANN, H. 2001a. Fas ligand (CD95L) protects neurons against perforin-mediated T lymphocyte cytotoxicity. *J Immunol*, 167, 674-81.
- MEDANA, I., MARTINIC, M. A., WEKERLE, H. & NEUMANN, H. 2001b. Transection of major histocompatibility complex class I-induced neurites by cytotoxic T lymphocytes. *The American journal of pathology*, 159, 809-15.
- MEDANA, I. M., GALLIMORE, A., OXENIUS, A., MARTINIC, M. M., WEKERLE, H. & NEUMANN, H. 2000. MHC class I-restricted killing of neurons by virus-specific CD8+ T lymphocytes is effected through the Fas/FasL, but not the perforin pathway. *European journal of immunology*, 30, 3623-33.
- MELZER, N., MEUTH, S. G. & WIENDL, H. 2009. CD8+ T cells and neuronal damage: direct and collateral mechanisms of cytotoxicity and impaired electrical excitability. *FASEB J*, 23, 3659-73.
- MEUTH, S. G., HERRMANN, A. M., SIMON, O. J., SIFFRIN, V., MELZER, N., BITTNER, S., MEUTH, P., LANGER, H. F., HALLERMANN, S., BOLDAKOWA, N., HERZ, J., MUNSCH, T., LANDGRAF, P., AKTAS, O., HECKMANN, M., LESSMANN, V., BUDDE, T., KIESEIER, B. C., ZIPP, F. & WIENDL, H. 2009. Cytotoxic CD8+ T cell-neuron interactions: perforin-dependent electrical silencing precedes but is not causally linked to neuronal cell death. *J Neurosci*, 29, 15397-409.
- MEUTH, S. G., SIMON, O. J., GRIMM, A., MELZER, N., HERRMANN, A. M., SPITZER, P., LANDGRAF, P. & WIENDL, H. 2008. CNS inflammation and neuronal degeneration is aggravated by impaired CD200-CD200R-mediated macrophage silencing. *J Neuroimmunol*, 194, 62-9.
- MEYER, R., WEISSERT, R., DIEM, R., STORCH, M. K., DE GRAAF, K. L., KRAMER, B. & BAHR, M. 2001. Acute neuronal apoptosis in a rat model of multiple sclerosis. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 21, 6214-20.
- MOLL, N. M., RIETSCH, A. M., RANSOHOFF, A. J., COSSOY, M. B., HUANG, D., EICHLER, F. S., TRAPP, B. D. & RANSOHOFF, R. M. 2008. Cortical demyelination in PML and MS: Similarities and differences. *Neurology*, 70, 336-43.
- MOTT, R. T., AIT-GHEZALA, G., TOWN, T., MORI, T., VENDRAME, M., ZENG, J., EHRHART, J., MULLAN, M. & TAN, J. 2004. Neuronal expression of CD22: novel mechanism for inhibiting microglial proinflammatory cytokine production. *Glia*, 46, 369-79.
- MOTYKA, B., KORBUTT, G., PINKOSKI, M. J., HEIBEIN, J. A., CAPUTO, A., HOBMAN, M., BARRY, M., SHOSTAK, I., SAWCHUK, T., HOLMES, C. F., GAULDIE, J. & BLEACKLEY, R. C. 2000. Mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor is a death receptor for granzyme B during cytotoxic T cell-induced apoptosis. *Cell*, 103, 491-500.
- MRASS, P., TAKANO, H., NG, L. G., DAXINI, S., LASARO, M. O., IPARRAGUIRRE, A., CAVANAGH, L. L., VON ANDRIAN, U. H., ERTL, H. C., HAYDON, P. G. & WENINGER, W. 2006. Random migration precedes stable target cell interactions of tumor-infiltrating T cells. *The Journal of experimental medicine*, 203, 2749-61.
- MURRAY, P. D., MCGAVERN, D. B., LIN, X., NJENGA, M. K., LEIBOWITZ, J., PEASE, L. R. & RODRIGUEZ, M. 1998. Perforin-dependent neurologic injury in a viral model of multiple sclerosis. *J Neurosci*, 18, 7306-14.

- NA, S. Y., CAO, Y., TOBEN, C., NITSCHKE, L., STADELMANN, C., GOLD, R., SCHIMPL, A. & HUNIG, T. 2008. Naive CD8 T-cells initiate spontaneous autoimmunity to a sequestered model antigen of the central nervous system. *Brain*, 131, 2353-65.
- NEIJSEN, J., HERBERTS, C., DRIJFHOUT, J. W., REITS, E., JANSSEN, L. & NEEFJES, J. 2005. Cross-presentation by intercellular peptide transfer through gap junctions. *Nature*, 434, 83-8.
- NEUMANN, H., CAVALIE, A., JENNE, D. E. & WEKERLE, H. 1995. Induction of MHC class I genes in neurons. *Science*, 269, 549-52.
- NEUMANN, H., MEDANA, I. M., BAUER, J. & LASSMANN, H. 2002. Cytotoxic T lymphocytes in autoimmune and degenerative CNS diseases. *Trends in neurosciences*, 25, 313-9.
- NEUMANN, H., MISGELD, T., MATSUMURO, K. & WEKERLE, H. 1998. Neurotrophins inhibit major histocompatibility class II inducibility of microglia: involvement of the p75 neurotrophin receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95, 5779-84.
- NEUMANN, H., SCHMIDT, H., CAVALIE, A., JENNE, D. & WEKERLE, H. 1997. Major histocompatibility complex (MHC) class I gene expression in single neurons of the central nervous system: differential regulation by interferon (IFN)-gamma and tumor necrosis factor (TNF)-alpha. *The Journal of experimental medicine*, 185, 305-16.
- NG, L. G., MRASS, P., KINJYO, I., REINER, S. L. & WENINGER, W. 2008. Two-photon imaging of effector T-cell behavior: lessons from a tumor model. *Immunol Rev*, 221, 147-62.
- OCKLEFORD, C. D., HSI, B. L., WAKELY, J., BADLEY, R. A., WHYTE, A. & FAULK, W. P. 1981. Propidium iodide as a nuclear marker in immunofluorescence. I. Use with tissue and cytoskeleton studies. *J Immunol Methods*, 43, 261-7.
- OTTO, F., GORTZ, P., FLEISCHER, W. & SIEBLER, M. 2003. Cryopreserved rat cortical cells develop functional neuronal networks on microelectrode arrays. *J Neurosci Methods*, 128, 173-81.
- PANZARA, M. A., GUSSONI, E., BEGOVICH, A. B., MURRAY, R. S., ZANG, Y. Q., APPEL, S. H., STEINMAN, L. & ZHANG, J. 1999. T cell receptor BV gene rearrangements in the spinal cords and cerebrospinal fluid of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Dis*, 6, 392-405.
- PEREZ-LIZ, G., DEL VALLE, L., GENTILELLA, A., CROUL, S. & KHALILI, K. 2008. Detection of JC virus DNA fragments but not proteins in normal brain tissue. *Annals of neurology*, 64, 379-87.
- PERSECHINI, P. M., YOUNG, J. D. & ALMERS, W. 1990. Membrane channel formation by the lymphocyte pore-forming protein: comparison between susceptible and resistant target cells. *The Journal of cell biology*, 110, 2109-16.
- PETERSON, J. W., BO, L., MORK, S., CHANG, A. & TRAPP, B. D. 2001. Transected neurites, apoptotic neurons, and reduced inflammation in cortical multiple sclerosis lesions. *Annals of neurology*, 50, 389-400.
- PETITO, C. K., ADKINS, B., MCCARTHY, M., ROBERTS, B. & KHAMIS, I. 2003. CD4+ and CD8+ cells accumulate in the brains of acquired immunodeficiency syndrome patients with human immunodeficiency virus encephalitis. *Journal of neurovirology*, 9, 36-44.

- PETITO, C. K., TORRES-MUNOZ, J. E., ZIELGER, F. & MCCARTHY, M. 2006. Brain CD8+ and cytotoxic T lymphocytes are associated with, and may be specific for, human immunodeficiency virus type 1 encephalitis in patients with acquired immunodeficiency syndrome. *Journal of neurovirology*, 12, 272-83.
- PIPKIN, M. E. & LIEBERMAN, J. 2007. Delivering the kiss of death: progress on understanding how perforin works. *Current opinion in immunology*, 19, 301-8.
- POENIE, M., TSIEN, R. Y. & SCHMITT-VERHULST, A. M. 1987. Sequential activation and lethal hit measured by $[Ca^{2+}]_i$ in individual cytolytic T cells and targets. *The EMBO journal*, 6, 2223-32.
- POOL, M., THIEMANN, J., BAR-OR, A. & FOURNIER, A. E. 2008. NeuriteTracer: a novel ImageJ plugin for automated quantification of neurite outgrowth. *J Neurosci Methods*, 168, 134-9.
- PORTER, A. G. & JANICKE, R. U. 1999. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell death and differentiation*, 6, 99-104.
- PURBHOO, M. A., IRVINE, D. J., HUPPA, J. B. & DAVIS, M. M. 2004. T cell killing does not require the formation of a stable mature immunological synapse. *Nat Immunol*, 5, 524-30.
- RANSOHOFF, R. M. & ENGELHARDT, B. 2012. The anatomical and cellular basis of immune surveillance in the central nervous system. *Nat Rev Immunol*, 12, 623-35.
- RANSOHOFF, R. M., KIVISAKK, P. & KIDD, G. 2003. Three or more routes for leukocyte migration into the central nervous system. *Nat Rev Immunol*, 3, 569-81.
- RENSING-EHL, A., MALIPIERO, U., IRMLER, M., TSCHOPP, J., CONSTAM, D. & FONTANA, A. 1996. Neurons induced to express major histocompatibility complex class I antigen are killed via the perforin and not the Fas (APO-1/CD95) pathway. *European journal of immunology*, 26, 2271-4.
- RIVERA-QUINONES, C., MCGAVERN, D., SCHMELZER, J. D., HUNTER, S. F., LOW, P. A. & RODRIGUEZ, M. 1998. Absence of neurological deficits following extensive demyelination in a class I-deficient murine model of multiple sclerosis. *Nature medicine*, 4, 187-93.
- ROTHSTEIN, T. L., MAGE, M., JONES, G. & MCHUGH, L. L. 1978. Cytotoxic T lymphocyte sequential killing of immobilized allogeneic tumor target cells measured by time-lapse microcinematography. *J Immunol*, 121, 1652-6.
- RUSSELL, J. H. & LEY, T. J. 2002. Lymphocyte-mediated cytotoxicity. *Annu Rev Immunol*, 20, 323-70.
- SALLUSTO, F., IMPELLIZZIERI, D., BASSO, C., LARONI, A., UCCELLI, A., LANZAVECCHIA, A. & ENGELHARDT, B. 2012. T-cell trafficking in the central nervous system. *Immunol Rev*, 248, 216-27.
- SANCHEZ-RUIZ, M., WILDEN, L., MULLER, W., STENZEL, W., BRUNN, A., MILETIC, H., SCHLUTER, D. & DECKERT, M. 2008. Molecular mimicry between neurons and an intracerebral pathogen induces a CD8 T cell-mediated autoimmune disease. *J Immunol*, 180, 8421-33.
- SAXENA, A., BAUER, J., SCHEIKL, T., ZAPPULLA, J., AUDEBERT, M., DESBOIS, S., WAISMAN, A., LASSMANN, H., LIBLAU, R. S. & MARS, L. T. 2008. Cutting edge: Multiple sclerosis-like lesions induced by effector CD8 T cells recognizing a sequestered antigen on oligodendrocytes. *J Immunol*, 181, 1617-21.
- SCHMIED, M., BREITSCHOPF, H., GOLD, R., ZISCHLER, H., ROTHE, G., WEKERLE, H. & LASSMANN, H. 1993. Apoptosis of T lymphocytes in experimental autoimmune encephalomyelitis. Evidence for programmed cell death as a mechanism to control inflammation in the brain. *Am J Pathol*, 143, 446-52.

- SCHWAB, N., BIEN, C. G., WASCHBISCH, A., BECKER, A., VINCE, G. H., DORNMAIR, K. & WIENDL, H. 2009. CD8⁺ T-cell clones dominate brain infiltrates in Rasmussen encephalitis and persist in the periphery. *Brain*, 132, 1236-46.
- SCHWAB, N., SCHNEIDER-HOHENDORF, T., POSEVITZ, V., BREUER, J., GOBEL, K., WINDHAGEN, S., BROCHET, B., VERMERSCH, P., LEBRUN-FRENAY, C., POSEVITZ-FEJFAR, A., CAPRA, R., IMBERTI, L., STRAETEN, V., HAAS, J., WILDEMANN, B., HAVLA, J., KUMPFEL, T., MEINL, I., NIESSEN, K., GOELZ, S., KLEINSCHNITZ, C., WARNKE, C., BUCK, D., GOLD, R., KIESEIER, B. C., MEUTH, S. G., FOLEY, J., CHAN, A., BRASSAT, D. & WIENDL, H. 2013. L-selectin is a possible biomarker for individual PML risk in natalizumab-treated MS patients. *Neurology*, 81, 865-71.
- SEDER, R. A. & AHMED, R. 2003. Similarities and differences in CD4⁺ and CD8⁺ effector and memory T cell generation. *Nat Immunol*, 4, 835-42.
- SHA, W. C., NELSON, C. A., NEWBERRY, R. D., KRANZ, D. M., RUSSELL, J. H. & LOH, D. Y. 1988a. Positive and negative selection of an antigen receptor on T cells in transgenic mice. *Nature*, 336, 73-6.
- SHA, W. C., NELSON, C. A., NEWBERRY, R. D., KRANZ, D. M., RUSSELL, J. H. & LOH, D. Y. 1988b. Selective expression of an antigen receptor on CD8-bearing T lymphocytes in transgenic mice. *Nature*, 335, 271-4.
- SHRIVER, L. P. & DITTEL, B. N. 2006. T-cell-mediated disruption of the neuronal microtubule network: correlation with early reversible axonal dysfunction in acute experimental autoimmune encephalomyelitis. *The American journal of pathology*, 169, 999-1011.
- SPAENY-DEKKING, E. H., HANNA, W. L., WOLBINK, A. M., WEVER, P. C., KUMMER, J. A., SWAAK, A. J., MIDDELDORP, J. M., HUISMAN, H. G., FROELICH, C. J. & HACK, C. E. 1998. Extracellular granzymes A and B in humans: detection of native species during CTL responses in vitro and in vivo. *J Immunol*, 160, 3610-6.
- STADELMANN, C., ALBERT, M., WEGNER, C. & BRUCK, W. 2008. Cortical pathology in multiple sclerosis. *Current opinion in neurology*, 21, 229-34.
- STEFANSKI, H. E., MAYEROVA, D., JAMESON, S. C. & HOGQUIST, K. A. 2001. A low affinity TCR ligand restores positive selection of CD8⁺ T cells in vivo. *J Immunol*, 166, 6602-7.
- STINCHCOMBE, J. C., BOSSI, G., BOOTH, S. & GRIFFITHS, G. M. 2001. The immunological synapse of CTL contains a secretory domain and membrane bridges. *Immunity*, 15, 751-61.
- STINCHCOMBE, J. C. & GRIFFITHS, G. M. 2007. Secretory mechanisms in cell-mediated cytotoxicity. *Annual review of cell and developmental biology*, 23, 495-517.
- SUN, D., WHITAKER, J. N., HUANG, Z., LIU, D., COLECLOUGH, C., WEKERLE, H. & RAINE, C. S. 2001. Myelin antigen-specific CD8⁺ T cells are encephalitogenic and produce severe disease in C57BL/6 mice. *J Immunol*, 166, 7579-87.
- SYKULEV, Y., JOO, M., VTURINA, I., TSOMIDES, T. J. & EISEN, H. N. 1996. Evidence that a single peptide-MHC complex on a target cell can elicit a cytolytic T cell response. *Immunity*, 4, 565-71.
- TAKAHASHI, K., NAKAMURA, T., ADACHI, H., YAGITA, H. & OKUMURA, K. 1991. Antigen-independent T cell activation mediated by a very late activation

- antigen-like extracellular matrix receptor. *European journal of immunology*, 21, 1559-62.
- TAKAHASHI, Y., MINE, J., KUBOTA, Y., YAMAZAKI, E. & FUJIWARA, T. 2009. A substantial number of Rasmussen syndrome patients have increased IgG, CD4+ T cells, TNFalpha, and Granzyme B in CSF. *Epilepsia*, 50, 1419-31.
- TANAKA, M., TANAKA, K., SHINOZAWA, K., IDEZUKA, J. & TSUJI, S. 1998. Cytotoxic T cells react with recombinant Yo protein from a patient with paraneoplastic cerebellar degeneration and anti-Yo antibody. *J Neurol Sci*, 161, 88-90.
- TANAKA, M., TANAKA, K., TOKIGUCHI, S., SHINOZAWA, K. & TSUJI, S. 1999. Cytotoxic T cells against a peptide of Yo protein in patients with paraneoplastic cerebellar degeneration and anti-Yo antibody. *J Neurol Sci*, 168, 28-31.
- TOWN, T., TAN, J., FLAVELL, R. A. & MULLAN, M. 2005. T-cells in Alzheimer's disease. *Neuromolecular Med*, 7, 255-64.
- TRAJKOVIC, V., VUCKOVIC, O., STOSIC-GRUJICIC, S., MILJKOVIC, D., POPADIC, D., MARKOVIC, M., BUMBASIREVIC, V., BACKOVIC, A., CVETKOVIC, I., HARHAJI, L., RAMIC, Z. & MOSTARICA STOJKOVIC, M. 2004. Astrocyte-induced regulatory T cells mitigate CNS autoimmunity. *Glia*, 47, 168-79.
- TROMBETTA, E. S. & MELLMAN, I. 2005. Cell biology of antigen processing in vitro and in vivo. *Annu Rev Immunol*, 23, 975-1028.
- TROOST, D., VAN DEN OORD, J. J. & VIANNEY DE JONG, J. M. 1990. Immunohistochemical characterization of the inflammatory infiltrate in amyotrophic lateral sclerosis. *Neuropathology and applied neurobiology*, 16, 401-10.
- VASS, K. & LASSMANN, H. 1990. Intrathecal application of interferon gamma. Progressive appearance of MHC antigens within the rat nervous system. *Am J Pathol*, 137, 789-800.
- VERSCHUUREN, J., CHUANG, L., ROSENBLUM, M. K., LIEBERMAN, F., PRYOR, A., POSNER, J. B. & DALMAU, J. 1996. Inflammatory infiltrates and complete absence of Purkinje cells in anti-Yo-associated paraneoplastic cerebellar degeneration. *Acta Neuropathol*, 91, 519-25.
- WANG, W., HU, D. & XIONG, H. 2008. Macrophage attenuation of neuronal excitability: implications for pathogenesis of neurodegenerative disorders. *Glia*, 56, 241-6.
- WATERHOUSE, N. J., SUTTON, V. R., SEDELIES, K. A., CICCONE, A., JENKINS, M., TURNER, S. J., BIRD, P. I. & TRAPANI, J. A. 2006. Cytotoxic T lymphocyte-induced killing in the absence of granzymes A and B is unique and distinct from both apoptosis and perforin-dependent lysis. *The Journal of cell biology*, 173, 133-44.
- WHITE, F. A., 3RD, ISHAQ, M., STONER, G. L. & FRISQUE, R. J. 1992. JC virus DNA is present in many human brain samples from patients without progressive multifocal leukoencephalopathy. *Journal of virology*, 66, 5726-34.
- WIEDEMANN, A., DEPOIL, D., FAROUDI, M. & VALITUTTI, S. 2006. Cytotoxic T lymphocytes kill multiple targets simultaneously via spatiotemporal uncoupling of lytic and stimulatory synapses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 10985-90.
- WRIGHT, G. J., PUKLAVEC, M. J., WILLIS, A. C., HOEK, R. M., SEDGWICK, J. D., BROWN, M. H. & BARCLAY, A. N. 2000. Lymphoid/neuronal cell surface OX2 glycoprotein recognizes a novel receptor on macrophages implicated in the control of their function. *Immunity*, 13, 233-42.

- YOUNG, J. D., NATHAN, C. F., PODACK, E. R., PALLADINO, M. A. & COHN, Z. A. 1986. Functional channel formation associated with cytotoxic T-cell granules. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83, 150-4.
- ZHU, B., LUO, L., MOORE, G. R., PATY, D. W. & CYNADER, M. S. 2003. Dendritic and synaptic pathology in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Am J Pathol*, 162, 1639-50.

7 Abkürzungsverzeichnis.

| | |
|---------------|--|
| ALS | Amyotrophe Lateralsklerose |
| AP | Aktionspotential |
| APZ | Antigen-präsentierende Zellen |
| BHS | Blut-Hirn-Schranke |
| DAPI | 4',6-Diamidino-2-phenylindole Dihydrochlorid |
| DMEM | Dulbeccos Modified Eagle Medium |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DZ | dentritische Zellen |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| ER | endoplasmatisches Retikulum |
| FasL | Fas-Ligand |
| FKS | Fetales Kälberserum |
| HA | Hemagglutinin |
| HBSS | Hank's balanced salt solution |
| IFN- γ | Interferon gamma |
| INF- α | Interferon alpha |
| IS | immunologische Synapse |
| KFA | komplettes Freund Adjuvans |
| MEA | Multielektroden-Array |
| MEM | modified earl's medium |
| MHC-I | Haupthistokompatibilitäts Komplex Klasse I |
| MS | Multiple Sklerose |
| NEAA | non-essential amino acid |
| NHS | normal horse serum |
| ODZ | Oligodendrozyt |
| OVA | Ovalbumin |
| PBS | Phosphate-Buffered Saline |
| PCD | Paraneoplastische Kleinhirndegeneration |
| PD | Parkinsonsche Krankheit |

| | |
|---------------|---|
| PD-1 | progammed cell death-1 |
| PFA | Paraformaldehyd |
| PI | Propidium Iodid |
| PML | progressive multifokale Leukenzephalopathie |
| RE | Rasmussen Enzephalitis |
| RT | Raumtemperatur |
| TMEV | Theiler's murin Encephalomyelitis Virus |
| TNF- α | Tumornekrosefaktor |
| TZR | T-Zell-Rezeptor |
| WT | Wildtyp |
| ZLK | zervikale Lymphknoten |
| ZNS | zentralen Nervensystem |
| ZSF | Zerebrospinalflüssigkeit |
| ZTL | zytotoxische T-Lymphozyten |

8 Danksagung.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herr Prof. Dr. Heinz Wiendl, für die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und der Bereitstellung eines außergewöhnlich anregenden wissenschaftlichen Umfeldes.

Bei Prof. Dr. Dr. Sven Meuth möchte ich mich herzlichst für die Bereitstellung eines überaus interessanten Themas und viele sehr nützliche und fruchtbaren Diskussionen bedanken.

Darüber hinaus möchte ich ihm für seine kompetente Betreuung und für ein jederzeit offenes Ohr danken.

Herr Dr. Vladimir Soukhoroukov danke ich für die Betreuung dieser Doktorarbeit im Fachbereich Biologie.

Ganz Herzlich will ich auch meinen Kollegen danken, die immer für ein angenehmes Arbeitsklima im Laboralltag gesorgt haben und mir auch immer mit Rat und Tat zur Seite standen. Namentlich will ich dabei Astrid Schmitt, Michael Schuhmann, Nicole Bobak, Susann Pankratz und Stefan Bittner erwähnen.

Für das unermüdliche Korrektur lesen dieser Arbeit, bedanke ich mich auch ganz aufrichtig bei Kerstin Göbel.

Last but not least, möchte ich auch noch meiner Familie danken, die mich während der gesamten Promotionsphase allzeit unterstützt hat und mir immer das Gefühl gegeben hat, dass ich das Richtige mache.

9 Lebenslauf.

9.1 Eigene Publikationen

- PANKRATZ, S., BITTNER, S., **HERRMANN, A. M.**, SCHUHMANN, M. K., RUCK, T., MEUTH, S. G. & WIENDL, H. 2014. Human CD4+ HLA-G+ regulatory T cells are potent suppressors of graft-versus-host disease in vivo. *FASEB J*, 28, 3435-45.
- GELDERBLOM, M., MELZER, N., SCHATTLING, B., GOB, E., HICKING, G., ARUNACHALAM, P., BITTNER, S., UFER, F., **HERRMANN, A. M.**, BERNREUTHER, C., GLATZEL, M., GERLOFF, C., KLEINSCHNITZ, C., MEUTH, S. G., FRIESE, M. A. & MAGNUS, T. 2014. Transient Receptor Potential Melastatin Subfamily Member 2 Cation Channel Regulates Detrimental Immune Cell Invasion in Ischemic Stroke. *Stroke*.
- GOBEL, K., SCHUHMANN, M. K., PANKRATZ, S., STEGNER, D., **HERRMANN, A. M.**, BRAUN, A., BREUER, J., BITTNER, S., RUCK, T., WIENDL, H., KLEINSCHNITZ, C., NIESWANDT, B. & MEUTH, S. G. 2014. Phospholipase D1 mediates lymphocyte adhesion and migration in experimental autoimmune encephalomyelitis. *European journal of immunology*, 44, 2295-305.
- BITTNER, S., RUCK, T., SCHUHMANN, M. K., **HERRMANN, A. M.**, MOHA OU MAATI, H., BOBAK, N., GOBEL, K., LANGHAUSER, F., STEGNER, D., EHLING, P., BORSOTTO, M., PAPE, H. C., NIESWANDT, B., KLEINSCHNITZ, C., HEURTEAUX, C., GALLA, H. J., BUDDE, T., WIENDL, H. & MEUTH, S. G. 2013. Endothelial TWIK-related potassium channel-1 (TREK1) regulates immune-cell trafficking into the CNS. *Nature medicine*, 19, 1161-5.
- ANDRONIC, J., BOBAK, N., BITTNER, S., EHLING, P., KLEINSCHNITZ, C., **HERRMANN, A. M.**, ZIMMERMANN, H., SAUER, M., WIENDL, H., BUDDE, T., MEUTH, S. G. & SUKHORUKOV, V. L. 2013. Identification of two-pore domain potassium channels as potent modulators of osmotic volume regulation in human T lymphocytes. *Biochimica et biophysica acta*, 1828, 699-707.
- GOBEL, K., WEDELL, J. H., **HERRMANN, A. M.**, WACHSMUTH, L., PANKRATZ, S., BITTNER, S., BUDDE, T., KLEINSCHNITZ, C., FABER, C., WIENDL, H. & MEUTH, S. G. 2013. 4-Aminopyridine ameliorates mobility but not disease course in an animal model of multiple sclerosis. *Exp Neurol*, 248, 62-71.
- KRAFT, P., GOB, E., SCHUHMANN, M. K., GOBEL, K., DEPPERMAN, C., THIELMANN, I., **HERRMANN, A. M.**, LORENZ, K., BREDE, M., STOLL, G., MEUTH, S. G., NIESWANDT, B., PFEILSCHIFTER, W. & KLEINSCHNITZ, C. 2013. FTY720 ameliorates acute ischemic stroke in mice by reducing thrombo-inflammation but not by direct neuroprotection. *Stroke*, 44, 3202-10.
- MELZER, N., HICKING, G., BITTNER, S., BOBAK, N., GOBEL, K., **HERRMANN, A. M.**, WIENDL, H. & MEUTH, S. G. 2013. Excitotoxic neuronal cell death during an oligodendrocyte-directed CD8+ T cell attack in the CNS gray matter. *J Neuroinflammation*, 10, 121.

- MEUTH, S. G., GOBEL, K., KANYSHKOVA, T., EHLING, P., RITTER, M. A., SCHWINDT, W., BIELASZEWSKA, M., LEBIEDZ, P., COULON, P., **HERRMANN, A. M.**, STORCK, W., KOHMANN, D., MUTHING, J., PAVENSTADT, H., KUHLMANN, T., KARCH, H., PETERS, G., BUDDE, T., WIENDL, H. & PAPE, H. C. 2013. Thalamic involvement in patients with neurologic impairment due to Shiga toxin 2. *Ann Neurol*, 73, 419-29.
- BITTNER, S., BAUER, M. A., EHLING, P., BOBAK, N., BREUER, J., **HERRMANN, A. M.**, GOLFELS, M., WIENDL, H., BUDDE, T. & MEUTH, S. G. 2012. The TASK1 channel inhibitor A293 shows efficacy in a mouse model of multiple sclerosis. *Exp Neurol*, 238, 149-55.
- BITTNER, S., BOBAK, N., FEUCHTENBERGER, M., **HERRMANN, A. M.**, GOBEL, K., KINNE, R. W., HANSEN, A. J., BUDDE, T., KLEINSCHNITZ, C., FREY, O., TONY, H. P., WIENDL, H. & MEUTH, S. G. 2011. Expression of K2P5.1 potassium channels on CD4+ T lymphocytes correlates with disease activity in rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Res Ther*, 13, R21.
- BITTNER, S., BOBAK, N., **HERRMANN, A. M.**, GOBEL, K., MEUTH, P., HOHN, K. G., STENNER, M. P., BUDDE, T., WIENDL, H. & MEUTH, S. G. 2010. Upregulation of K2P5.1 potassium channels in multiple sclerosis. *Ann Neurol*, 68, 58-69.
- GOBEL, K., MELZER, N., **HERRMANN, A. M.**, SCHUHMANN, M. K., BITTNER, S., IP, C. W., HUNIG, T., MEUTH, S. G. & WIENDL, H. 2010. Collateral neuronal apoptosis in CNS gray matter during an oligodendrocyte-directed CD8(+) T cell attack. *Glia*, 58, 469-80.
- HERRMANN, A. M.**, GOBEL, K., SIMON, O. J., MELZER, N., SCHUHMANN, M. K., STENNER, M. P., WEISHAUPT, A., KLEINSCHNITZ, C., BITTNER, S., MEUTH, P., STUVE, O., BUDDE, T., KIESEIER, B. C., WIENDL, H. & MEUTH, S. G. 2010. Glatiramer acetate attenuates pro-inflammatory T cell responses but does not directly protect neurons from inflammatory cell death. *Am J Pathol*, 177, 3051-60.
- KLEINSCHNITZ, C., GRUND, H., WINGLER, K., ARMITAGE, M. E., JONES, E., MITTAL, M., BARIT, D., SCHWARZ, T., GEIS, C., KRAFT, P., BARTHEL, K., SCHUHMANN, M. K., **HERRMANN, A. M.**, MEUTH, S. G., STOLL, G., MEURER, S., SCHREWE, A., BECKER, L., GAILUS-DURNER, V., FUCHS, H., KLOPSTOCK, T., DE ANGELIS, M. H., JANDELEIT-DAHM, K., SHAH, A. M., WEISSMANN, N. & SCHMIDT, H. H. 2010. Post-stroke inhibition of induced NADPH oxidase type 4 prevents oxidative stress and neurodegeneration. *PLoS Biol*, 8.
- BITTNER, S., MEUTH, S. G., GOBEL, K., MELZER, N., **HERRMANN, A. M.**, SIMON, O. J., WEISHAUPT, A., BUDDE, T., BAYLISS, D. A., BENDSZUS, M. & WIENDL, H. 2009. TASK1 modulates inflammation and neurodegeneration in autoimmune inflammation of the central nervous system. *Brain*, 132, 2501-16.
- MEUTH, S. G., **HERRMANN, A. M.**, SIMON, O. J., SIFFRIN, V., MELZER, N., BITTNER, S., MEUTH, P., LANGER, H. F., HALLERMANN, S., BOLDAKOWA, N., HERZ, J., MUNSCH, T., LANDGRAF, P., AKTAS, O., HECKMANN, M., LESSMANN, V., BUDDE, T., KIESEIER, B. C., ZIPP, F. & WIENDL, H. 2009. Cytotoxic CD8+ T cell-neuron interactions: perforin-dependent electrical silencing precedes but is not causally linked to neuronal cell death. *J Neurosci*, 29, 15397-409.

- WASCHBISCH, A., MEUTH, S. G., **HERRMANN, A. M.**, WROBEL, B., SCHWAB, N., LOCHMULLER, H. & WIENDL, H. 2009. Intercellular exchanges of membrane fragments (trocytosis) between human muscle cells and immune cells: a potential mechanism for the modulation of muscular immune responses. *J Neuroimmunol*, 209, 131-8.
- MEUTH, S. G., **HERRMANN, A. M.**, IP, C. W., KANYSHKOVA, T., BITTNER, S., WEISHAUPT, A., BUDDE, T. & WIENDL, H. 2008a. The two-pore domain potassium channel TASK3 functionally impacts glioma cell death. *J Neurooncol*, 87, 263-70.
- MEUTH, S. G., SIMON, O. J., GRIMM, A., MELZER, N., **HERRMANN, A. M.**, SPITZER, P., LANDGRAF, P. & WIENDL, H. 2008b. CNS inflammation and neuronal degeneration is aggravated by impaired CD200-CD200R-mediated macrophage silencing. *J Neuroimmunol*, 194, 62-9.

9.2 Konferenz Beiträge

Susann Pankratz, **Alexander M. Herrmann**, Stefan Bittner, Sven G. Meuth and Heinz Wiendl: "Properties and molecular characteristic of immune regulation of human thymus-derived CD4⁺HLA-G⁺ regulatory T cells *in vitro* and *in vivo*." ISNI 2014, November 09 - 13, 2014, Mainz, Germany.

K. Göbel, J. Wedell, **A.M. Herrmann**, S. Pankratz, L. Wachsmuth, S. Bittner, T. Budde, C. Faber, H. Wiendl, S.G. Meuth: 4-aminopyridine improves mobility but not clinical course in an experimental model of multiple sclerosis disease. DGN 2013, September 18. - 21, 2013. Dresden, Germany.

Meuth, S. G. **Herrmann, A. M.** Simon, O. J. Munsch, T. Bittner, S. Friedl, P. Heckmann, Wiendl, H. 2009. CD8⁺ Lymphocyte-mediated Injury of CNS Neurons: Relevance of Granzyme B and Perforin for Acute Electrophysiological Consequences. FENS Forum 2008, Julie 12. – 16. Genf, Swizerland.

Herrmann, A. M. Göbel, K. Simon, O. J. Melzer, N. Bittner, S. Meuth, P. Kieseier, B.C. Wiendl, H. & Meuth, S.G. „ Copolymer-1 exerts neuroprotective effects via peripheral immunomodulation rather than direct interaction with neurons. 3rd international workshop molecular and cellular mechanism of neuron degeneration. 2010, Oktober 3. – 6. Eibsee, Germany.