

**Mechanistische Untersuchungen zur Therapie von  
Multipler Sklerose am Beispiel der Experimentellen  
Autoimmunen Encephalomyelitis**

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

vorgelegt von

**Denise Tischner**

aus

Lauf a. d. Pegnitz

Würzburg, 2007

Eingereicht am: .....

Mitglieder der Promotionskommission

Vorsitzender:

1. Gutachter: Professor Dr. Reichardt

2. Gutachter: Professor Dr. Buchner

Tag des Promotioskolloquiums: .....

Doktorurkunde ausgehändigt am: .....

## Erklärung

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen 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 Grad erworben oder zu erwerben versucht.

Würzburg, den .....

.....

Denise Tischner

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom 15.6.2005 bis 4.7.2007 am Institut für Virologie und Immunbiologie der Bayrischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg unter Anleitung von Professor Dr. Reichardt angefertigt.

---

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>4</b>
1.1	Autoimmunität	5
1.2	Multiple Sklerose	7
1.3	Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis (EAE) – das Tiermodell für Multiple Sklerose	10
1.4	Therapieansätze in der Multiplen Sklerose	11
1.5	Aktivierung und Expansion von regulatorischen T-Zellen mittels eines superagonistischen anti-CD28 Antikörpers	13
1.5.1	Regulatorische T-Zellen	13
1.5.2	CD28 und der superagonistische anti-CD28 Antikörper JJ316	16
1.6	Antigen Therapie	18
1.7	Therapie einer EAE mit Glukokortikoiden	19
1.7.1	Glukokortikoide und der Glukokortikoidrezeptor	19
1.7.2	Beeinflussung des Immunsystems durch Glukokortikoide	21
1.7.3	Glukokortikoide in der Behandlung von EAE und Multipler Sklerose	22
1.8	Zielsetzung	25
<b>2</b>	<b>MATERIALIEN</b>	<b>27</b>
2.1	Geräte	27
2.2	Verbrauchsmaterialien	27
2.3	Chemikalien und Puffer	28
2.3.1	Chemikalien und Pufferzusätze	28
2.3.2	Puffer	29
2.4	Medien und Medienzusätze	31
2.4.1	Medienkomponenten	31
2.4.2	Medien	31
<b>3</b>	<b>METHODEN</b>	<b>33</b>
3.1	Tiere	33
3.2	Induktion einer AT-EAE	33
3.3	Experimentelles Design	33
3.3.1	Aktivierung und Expansion regulatorischer T-Zellen <i>in vivo</i> mittels des CD28 superagonistischen Antikörpers JJ316	33
3.3.2	Antigen Therapie	34
3.3.3	Glukokortikoidtherapie	35
3.4	Zellbiologische Methoden	35
3.4.1	Bestimmung der Zellzahl	35
3.4.2	Herstellung von Einzelzellsuspensionen aus primären und sekundären lymphatischen Organen	35
3.4.3	Aufreinigung von Zellen mittels eines Kalten Gradienten	36
3.4.4	Herstellung enzephalitogener T-Zellen	36
3.4.5	Restimulation von enzephalitogenen T-Zellen	37

3.4.6	Kultivierung von Milzzellen zur Analyse der Zytokinproduktion .....	38
3.4.7	Plattenbeschichtung mit ShaMlg .....	38
3.4.8	Stimulation enzephalitogener Zellen mit JJ316 .....	38
3.4.9	Proliferationsassay .....	39
3.4.10	Magnetische Zellsortierung (MACS).....	40
3.4.10.1	Aufreinigung von CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>-</sup> (T <sub>con</sub> ) und CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> (T <sub>reg</sub> ) Zellen .....	40
3.4.10.2	Gewinnung von CD4 <sup>+</sup> T-Zellen.....	41
3.4.10.3	Isolation von Antigenpräsentierenden Zellen (APCs) .....	41
3.4.11	Isolation von mononukleären Leukozyten aus dem Rückenmark .....	42
3.4.12	Durchflusszytometrie .....	43
3.4.12.1	Extrazelluläre Färbungen .....	43
3.4.12.2	Intrazelluläre Färbungen .....	44
3.4.13	Zytokinassay .....	45
3.4.14	Konfokale Mikroskopie.....	46
3.4.14.1	CXCR-3 .....	46
3.4.14.2	F-Aktin .....	46
3.4.14.3	Tubulin.....	47
3.4.14.4	Konfokale Mikroskopie .....	47
3.4.15	Rasterelektronenmikroskopie .....	47
<b>3.5</b>	<b>Histologie und Immunzytochemie .....</b>	<b>48</b>
<b>3.6</b>	<b>Molekularbiologische Methoden.....</b>	<b>49</b>
3.6.1	Isolation von RNA .....	49
3.6.2	Umschreiben von mRNA in cDNA .....	50
3.6.3	Quantifizierung von mRNA-Transkripten mittels Real-Time PCR .....	50
<b>3.7</b>	<b>Statistik.....</b>	<b>53</b>
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>54</b>
<b>4.1</b>	<b>Aktivierung und Expansion von regulatorischen T-Zellen mittels des superagonistischen Antikörpers JJ316 .....</b>	<b>54</b>
4.1.1	JJ316 verhindert die Infiltration des Rückenmarks durch enzephalitogene T-Zellen .....	54
4.1.2	Expansion und späte Infiltration des Rückenmarks durch regulatorische T-Zellen nach JJ316 Behandlung .....	57
4.1.3	Die therapeutische Verabreichung von JJ316 verbessert den Krankheitsverlauf einer EAE unabhängig von einer Migration regulatorischer T-Zellen in das ZNS .....	61
4.1.4	Die Verabreichung von JJ316 vermindert die Zerstörung der Bluthirnschranke .....	63
4.1.5	Die Verabreichung von JJ316 induziert einen T <sub>H</sub> 2 Shift und inhibiert die IFN- $\gamma$ Produktion....	65
4.1.6	Nach Injektion von JJ316 ist die Expression von CXCR-3 auf enzephalitogenen T-Zellen deutlich reduziert .....	67
4.1.7	Charakterisierung JJ316 aktivierter enzephalitogener T-Zellen <i>in vitro</i> .....	69
<b>4.2</b>	<b>Therapie einer AT-EAE mit hohen Dosen von Antigen .....</b>	<b>72</b>
4.2.1	Die Antigentherapie mit gpMBP induziert Apoptose unter T-Zellen im Rückenmark .....	72
4.2.2	Die Antigentherapie reduziert die Anzahl enzephalitogener T-Zellen in der Milz und im Rückenmark .....	73
4.2.3	Die Antigentherapie induziert selektiv Apoptose in enzephalitogenen T-Zellen.....	75
<b>4.3</b>	<b>Therapie einer AT-EAE mit hohen Dosen an Glukokortikoiden .....</b>	<b>77</b>
4.3.1	Glukokortikoide verbessern den Krankheitsverlauf einer AT-EAE und reduzieren die T-Zellanzahl im Rückenmark.....	77
4.3.2	Glukokortikoide induzieren gleichermaßen Apoptose in pathogenen und konventionellen T-Zellen.....	79
4.3.3	Dexamethason inhibiert die Öffnung der Bluthirnschranke .....	82
4.3.4	Glukokortikoide inhibieren die Expression von Adhäsionsmolekülen und Chemokinen im Rückenmark nicht aber ihrer Liganden auf enzephalitogenen T-Zellen .....	83
4.3.5	Glukokortikoide induzieren morphologische Veränderungen enzephalitogener T-Zellen <i>in vivo</i> und <i>in vitro</i> .....	85

---

4.3.6	Die Depolarisation enzephalitogener T-Zellen wird durch nicht-genomische Effekte von Glukokortikoiden verursacht.....	88
<b>5</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>91</b>
5.1	Aktivierung und Expansion regulatorischer T-Zellen <i>in vivo</i> mittels des $\alpha$ -CD28 superagonistischen Antikörpers JJ316 .....	91
5.2	Therapie einer EAE mit hohen Dosen MBP .....	100
5.3	Glukokortikoidtherapie der AT-EAE .....	102
5.4	Schlussfolgerungen .....	110
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>112</b>
<b>7</b>	<b>SUMMARY .....</b>	<b>115</b>
<b>8</b>	<b>LITERATUR .....</b>	<b>117</b>
<b>9</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>137</b>
9.1	Abbkürzungsverzeichnis .....	137
9.2	Veröffentlichungen.....	141
9.3	Danksagung .....	142
9.4	Lebenslauf.....	143

## 1 Einleitung

Das Immunsystem ist in der Lage eine Vielzahl von Erregern zu erkennen und zu beseitigen, aber gleichzeitig nicht auf Selbstantigene zu reagieren. Erreicht wird dies zunächst durch die Induktion von zentraler Toleranz in primären lymphatischen Organen. In Thymozyten, die mit sehr hoher Affinität an durch Selbst-MHC-Moleküle präsentierte Selbstantigene im Thymus binden, wird Apoptose induziert (negative Depletion) (Anderton und Wraith, 2002). Ebenso werden unreife B-Zellen, deren B-Zellrezeptoren (BZR) durch Selbstantigene stark quervernetzt werden, im Knochenmark deletiert. Alternativ kann es auch zur Modifizierung des BZR durch die Expression einer anderen leichten Kette kommen. Dafür wird die Expression der RAG-Proteine gesteigert und der Locus für die leichte Kette nochmals neu umorganisiert (Rezeptor Editing) (Goodnow et al., 2005). Ein ähnlicher Prozess wurde auch in T-Zellen beobachtet. In einigen wenigen selbst-reaktiven T-Zellrezeptoren (TZR) kann die  $\alpha$ -Kette durch eine zweite ersetzt werden (Goodnow et al., 2005). Diese Prozesse gewährleisten aber nicht eine vollständige Eliminierung aller potentiell autoreaktiven Lymphozyten. So können selbstreaktive Leukozyten in jedem gesunden Individuum nachgewiesen werden. Trotz allem kommt es im Normalfall nicht zum Ausbruch einer Autoimmunerkrankung. Verhindert wird dies durch Prozesse, die man allgemein unter peripherer Toleranz zusammenfasst. Dazu zählt zum einen die Ignoranz von Antigenen, die in einer zu geringen Konzentration vorliegen, um eine Immunreaktion auszulösen. Eine wichtige Rolle spielt auch die Induktion von Anergie in Lymphozyten. Hierbei werden die Zellen nach dem Zusammentreffen mit einem Selbstantigen funktional inaktiviert. Den wahrscheinlich wichtigsten Beitrag zum Erhalt peripherer Toleranz leisten regulatorische T-Zellen wie  $T_{r1}$ ,  $T_{H3}$  aber vor allem  $CD4^+CD25^+FoxP3^+$  T-Zellen. Mutationen des FoxP3 Locus, das Mastergen regulatorischer T-Zellen, verursachen schwere Autoimmunerkrankungen (Walker and Abbas, 2002).

Trotz all dieser protektiven Mechanismen treten Autoimmunerkrankungen bei 3 – 5 % der Bevölkerung in modernen Industriestaaten auf (Jacobson et al., 1997).

## 1.1 Autoimmunität

Generell unterscheidet man zwei Hauptkategorien an Autoimmunerkrankungen: organspezifische, die sich auf ein Organ beschränken, und systemische, bei denen mehrere Gewebe betroffen sind. Nahezu für jedes Organ im Körper existiert eine organspezifische Erkrankung, wie z. B. Multiple Sklerose (MS) für das ZNS, Diabetes mellitus Typ 1 für den Pankreas oder die Hashimoto-Thyreoiditis und Morbus Basedow für die Schilddrüse. Hervorgerufen werden diese Erkrankungen durch die Reaktion des Immunsystems auf Selbstantigene, die spezifisch nur in diesem Organ exprimiert werden. Systemische Autoimmunreaktionen hingegen werden durch weit verbreitete Antigene ausgelöst, wie die Aminoacyl-tRNA-Synthetase oder Histonproteine beim Systemischen Lupus Erythematoses (SLE) (Marrack et al., 2001). Die Schädigung der Organe kann sowohl durch T-Zellen, wie in MS und Diabetes mellitus Typ 1 als auch durch Autoantikörper, wie in Myasthenia gravis und SLE, verursacht werden (Jacobson et al., 1997).

Autoimmunerkrankungen können sich vor allem dann im Körper manifestieren, wenn zentrale und periphere Toleranzmechanismen gestört sind und autoreaktive Lymphozyten nicht mehr unterdrücken können. So kommt es vor, dass Autoantigene nicht oder in einem zu geringen Umfang für eine negative Depletion im Thymus exprimiert werden. Das immundominante Epitop von Proteolipoprotein (PLP), welches Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis (EAE) in der SJL Maus auslöst, wird nicht im Thymus sondern ausschließlich im Gehirn exprimiert (Anderson et al., 2000). Ebenso kann die Avidität des TZR-Selbst-Peptid-MHC-Komplexes zu schwach sein, um eine negative Selektion auszulösen (Lee et al., 1999). Polymorphismen in *AIRE*, ein Gen das für die Präsentation von Autoantigenen in Thymusepithelzellen verantwortlich ist, führt zum Autoimmunen Polyendokrinen Syndrom (APS), wobei die Patienten unter Autoimmunerkrankungen leiden, die vor allem zahlreiche endokrine Organe betreffen (Nagamine et al., 1997). Aber auch eine fehlerhafte periphere Toleranzinduktion trägt zur Entwicklung von Autoimmunerkrankungen bei. So kann ohne CTLA-4 keine Anergie in T-Zellen ausgelöst werden. CTLA-4 Knockoutmäuse leiden unter einer lymphoproliferativen Krankheit mit einer progressiven Anhäufung von T Lymphozyten in peripheren Organen, was innerhalb von 3 - 5 Wochen zum Tode führt (Alegre et al., 2001). Ähnliche Symptome beobachtet man bei IPEX (Immudysregulation, Polyendocrinopathy, Enteropathy, X-linked), eine Autoimmunerkrankung, bei der

Mutationen des FoxP3 Genes zum Funktionsverlust von regulatorischen T-Zellen führen (Wildin und Freitas, 2005).

Zur Manifestierung einer Autoimmunerkrankung spielen sowohl genetische als auch Umweltfaktoren eine Rolle. Zu genetischen Faktoren zählen zum einen die bereits erwähnten Mutationen in Genen, die zur Aufrechterhaltung der zentralen und peripheren Toleranz wichtig sind, wie AIRE, CTLA-4 oder FoxP3. Eine große Anfälligkeit ist vor allem mit der Expression von bestimmten MHC Klasse II Allelen verbunden, da dadurch bestimmte Autoantigene vermehrt autoreaktiven T-Zellen präsentiert werden können. So häuft sich Multiple Sklerose unter Individuen, die die *HLA-DR\*1501* und *HLA-DQ\*0601* Allele aufweisen (Olerup und Hillert, 1991). Zu den Umweltfaktoren, die für eine Autoimmunerkrankung prädispositionieren, zählen vor allem Infektionen. Es kommt vor, dass pathogene Epitope körpereigenen ähneln und dadurch selbstreaktive Lymphozyten aktivieren können (molekulare Mimikry). So führt die Kreuzreaktivität zwischen Streptokokken- und Herzantigenen zu einer Schädigung der Herzmuskulatur bei rheumatischem Fieber (Marrack et al., 2001). Ein weiterer Prozess, durch den Infektionen zur Etablierung von Autoimmunerkrankungen beitragen können, ist das Epitop Spreading. Hierbei verursacht eine Infektion die Freisetzung von zuvor unzugänglichen körpereigenen Antigenen v. a. aus so genannten immunprivilegierten Bereichen wie dem Zentralen Nervensystem (ZNS). Werden diese durch antigenpräsentierende Zellen (APCs) prozessiert und präsentiert, können dadurch autoreaktive Lymphozyten aktiviert werden und eine Entzündung in den betreffenden Organen auslösen. Ähnliches wurde nach einer Infektion des ZNS mit dem Theiler Virus beobachtet. Hierbei kommt es durch Epitop Spreading zu einer Aktivierung und Differenzierung myelinspezifischer T-Zellen, die in SJL/J Mäusen eine chronisch progredierende EAE induzieren (Vanderlugt und Miller, 2002).

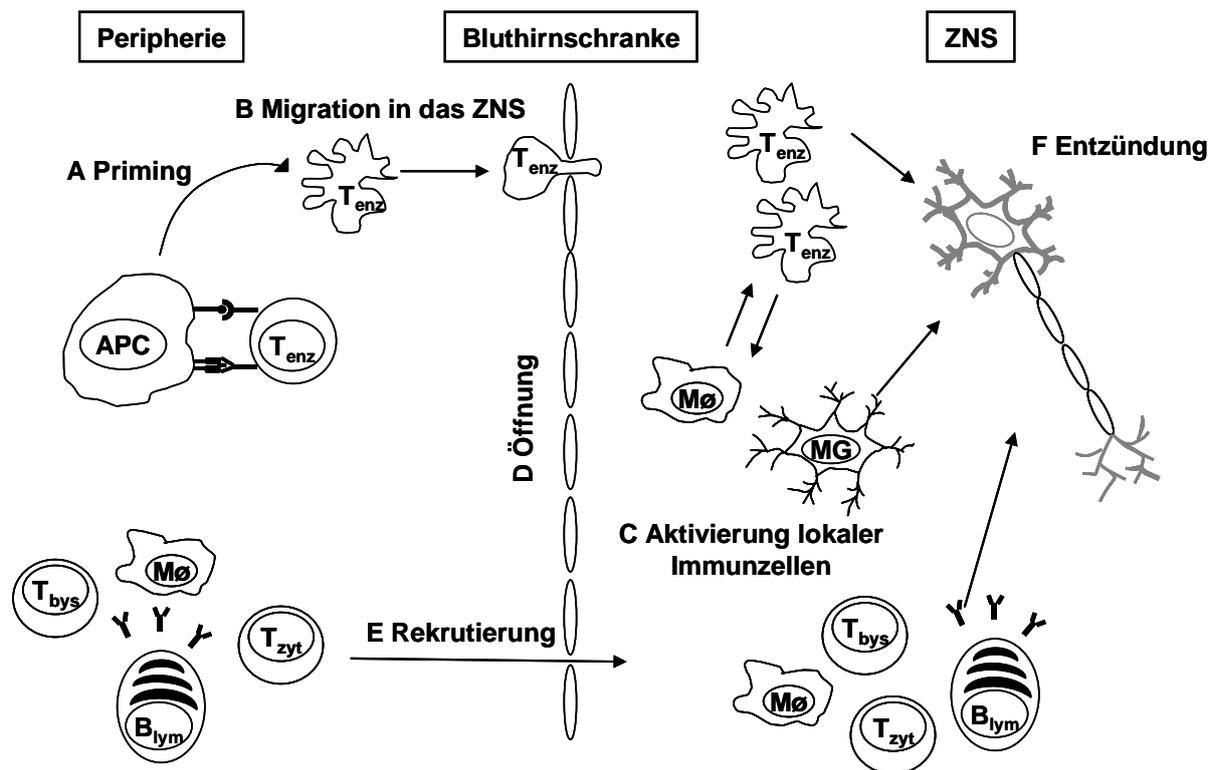
Natürlich spielen noch viele weiteren Faktoren für den Ausbruch einer Autoimmunerkrankung eine Rolle, auf die aber nicht im Näheren eingegangen wird. Im Anschluss erfolgt eine nähere Beschreibung der Multiplen Sklerose, eine entzündliche Autoimmunerkrankung des ZNS, von der ungefähr eine Million Nordeuropäer und Nordamerikaner betroffen sind (Reichardt et al., 2006).

## 1.2 Multiple Sklerose

1868 beschrieb der französische Neurologe Jean Martin Charcot am Salpêtrière in Paris die Anhäufung inflammatorischer Zellen im Gehirn und der weißen Substanz des Rückenmarks von Patienten, die unter neurologischen Störungen litten. Dies führte zur Bezeichnung sclérose en plaques disseminées oder Multiplen Sklerose (MS). Thomas Rivers vom Rockefeller Institut lieferte 1933 einen der ersten Beweise, dass es sich bei Multipler Sklerose um eine Autoimmunerkrankung handelt. Ohne das Vorhandensein einer Infektion mit Krankheitserregern konnte er durch die mehrmalige Injektion einer Suspension aus Kaninchenhirn und Rückenmark in Primaten eine Entzündung im ZNS hervorrufen (Rivers et al., 1933). Bis heute ist die Ätiologie von MS allerdings unbekannt. Die Beschwerden, unter denen MS Patienten leiden, resultieren aus der Beschädigung der Myelinschicht und den Verlust von Axonen im ZNS. Dies geht einher mit Koordinationsschwierigkeiten, Spastizität, visuellen und sensorischen Beeinträchtigungen, Gedächtnisstörungen, Probleme in der kognitiven Verarbeitung von Informationen, aber auch Depressionen (Hauser und Oksenberg, 2006). 85 - 90 % der Multiplen Sklerose-Patienten leiden unter einer schubförmig remittierenden Form der Erkrankung, welche zweimal häufiger Frauen als Männer betrifft. Sie kennzeichnet sich durch abwechselnde Phasen der Erkrankung und Erholung, in welchen die Symptome zumindest teilweise wieder abklingen. Bei den meisten Patienten, die unter einer schubförmig remittierenden Form von MS leiden, findet nach einigen Jahren ein Übergang zur sekundär progredierend verlaufenden Erkrankung statt. Hierbei bleiben die Genesungsphasen aus und die Symptome verstärken sich kontinuierlich. Dieses Krankheitsbild ähnelt der zweit häufigsten Form von MS, der primär progredierenden Multiplen Sklerose, von der 10 – 15 % der Patienten betroffen sind. Von Anfang an manifestiert sich hier die Erkrankung durch eine kontinuierliche Verschlechterung des Krankheitsbildes ohne jegliche Phasen der Erholung. Im Gegensatz zur schubförmig verlaufenden Multiplen Sklerose ist diese Form stärker unter Männern als bei Frauen verbreitet und bricht zu einem späteren Zeitpunkt aus (Sospedra und Martin, 2005).

Obwohl, wie bereits erwähnt, die Ätiologie von MS unbekannt ist, weiß man, dass sich die Anfälligkeit für Multiple Sklerose aus einem Zusammenspiel genetischer und Umweltfaktoren zusammensetzt. So häuft sich die Erkrankung unter Trägern der *HLA-DR\*1501* und *HLA-DQ\*0601* Allele (Olerup und Hillert, 1991). Auffallend ist

ebenso, dass sich MS v. a. auf die Nordhemisphäre konzentriert. Dies kann zum einen durch die Anhäufung eines für MS genetisch prädispositionierten Genpools begründet werden. Andererseits könnten auch Umweltfaktoren wie Infektionen zu dem erhöhten Erkrankungsrisiko beitragen. Migrationsstudien zeigen nämlich, dass wenn man vor dem 15. Lebensalter aus einem Gebiet mit einem hohen Anfälligkeitsrisiko in ein Gebiet mit einem niedrigen umzieht, man das geringere Erkrankungsrisiko erwirbt (Sospedra und Martin, 2005).



**Abb.1-1 Die Pathogenese von Multipler Sklerose.** Enzephalitogene T-Zellen werden in der Peripherie aktiviert (A) und wandern in das ZNS ein (B). Nach Aktivierung lokaler Immunzellen (C) kommt es zu einer Öffnung der Bluthirnschranke (D) und der Rekrutierung weiterer Leukozyten in das ZNS (E). All diese Prozesse führen zur Auslösung einer Entzündungsreaktion (F) und letztendlich zu Demyelinisierung sowie Schädigung von Axonen (G). APC: Antigenpräsentierende Zelle; T<sub>enz</sub>: enzephalitogene T-Zelle; MØ: Makrophage; T<sub>bys</sub>: Bystander T-Zelle; T<sub>zyt</sub>: zytotoxische T-Zelle; MG: Mikroglia; B<sub>lym</sub>: B Lymphozyt.

Es ist allgemein akzeptiert, dass es sich bei Multipler Sklerose um eine durch CD4<sup>+</sup> T-Zellen vermittelte Erkrankung handelt (Hafler, 2004). Die Aktivierung autoreaktiver T-Zellen findet durch mit Antigen beladene APCs statt. Wo allerdings das erste Antigenpriming, im ZNS oder peripheren lymphatischen Organen, stattfindet, ist weiterhin umstritten (McMahon et al., 2005). Bewiesen ist jedoch, dass für die

Initiation der Krankheit, aktivierte autoreaktive T Lymphozyten die Bluthirnschranke passieren und dort auf Myelinantigene reagieren (**Abb. 1-1**). Die primären Antigene, durch die das Priming der autoreaktiven T-Zellen stattfindet, sind unbekannt, wobei Tiermodelle vor allem auf MBP (Myelinbasisches Protein), PLP (Proteolipoprotein) und MOG (Myelinoligodendrozytenprotein) hindeuten. Aber auch T-Zellen mit anderen Spezifitäten z. B. für MAG (Myelin assoziiertes Protein), CNPase, MOBP (Myelin assoziiertes Oligodendrozytenbasisches Protein) oder OSP (Oligodendrozyten spezifisches Protein) konnten nachgewiesen werden (Sospedra und Martin, 2005). Durch die Freisetzung von Zytokinen und anderen proinflammatorischen Mediatoren, wird ein Entzündungsprozess in Gang gesetzt, der zur Aktivierung ansässiger Makrophagen und Mikroglia führt. Im Folgenden kommt es zu einer verstärkten Öffnung der Bluthirnschranke, wodurch ein weiterer Einstrom von T Lymphozyten, Antikörpern und Komponenten des angeborenen Immunsystems wie Makrophagen, NK Zellen, Granulozyten und Komplement, verursacht wird. Diese Prozesse führen zu Demyelinisierung, Schädigung von Axonen und Oligodendrozyten und letztlich zu den bereits für MS beschriebenen pathologischen Symptomen (Keegan und Noseworthy, 2002) (**Abb. 1-1**). Das Ausmaß und die Stärke dieser Prozesse kann aber zwischen den verschiedenen MS Formen variieren (Hemmer et al., 2006). An der Pathogenese von Multipler Sklerose sollen neben  $CD4^+$  T-Zellen zudem noch  $CD8^+$  T und B Lymphozyten beteiligt sein. Es wird vorgeschlagen, dass  $CD4^+$  T-Zellen für die Initiation von MS,  $CD8^+$  T-Zellen aber vor allem für Zellschädigungen während Schüben und chronischen Phasen von MS verantwortlich sind (Friese and Fugger, 2005). Ebenso umstritten ist, welche Rolle B Lymphozyten im Krankheitsbild von MS spielen. Das lokale Auftreten von Antikörpern im Liquor (CSF; Cerebrospinale Flüssigkeit) von Multiple Sklerose-Patienten gehört zu den wichtigsten Diagnosekriterien von MS (Hemmer et al., 2006). Deren Anstieg korreliert mit der Verschlechterung von Krankheitssymptomen während Schüben. Auch konnten myelinspezifische Antikörper in MS Plaques und Gebieten mit aktiver Demyelinisierung nachgewiesen werden (Sospedra und Martin, 2005). Dies alles spricht dafür, dass B Lymphozyten an der Pathogenese von MS beteiligt sind. Bisher bleibt allerdings ungeklärt, wie und in welchem Ausmaß sie zum Krankheitsbild beitragen.

### 1.3 Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis (EAE) – das Tiermodell für Multiple Sklerose

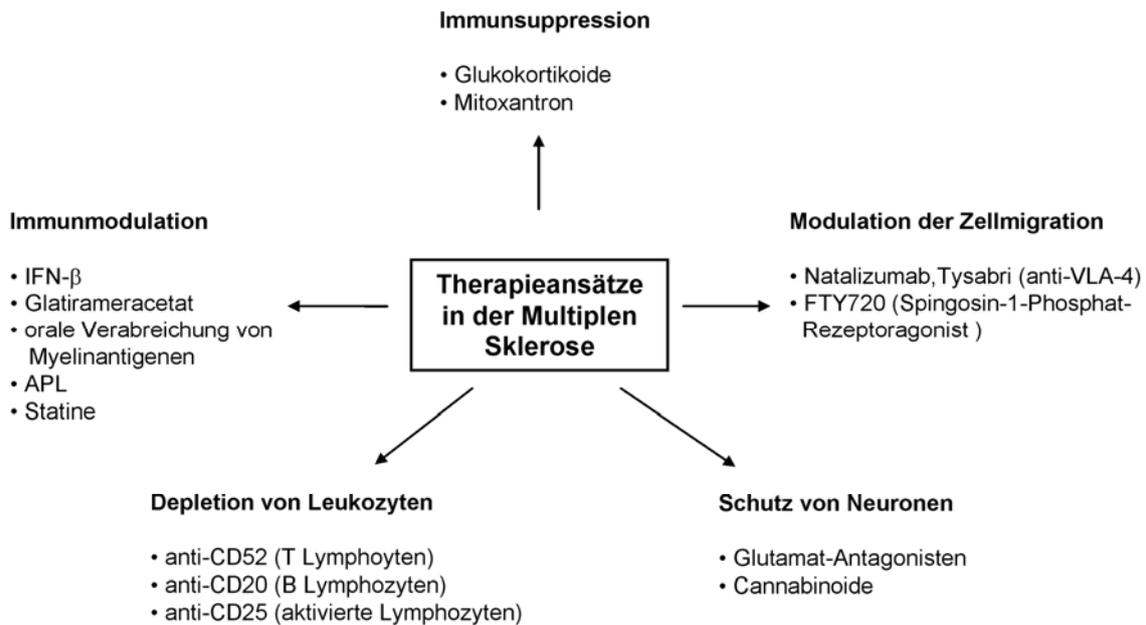
Vieles, was man heute über die Ursachen und die Pathogenese von MS weiß, hat man aus Tierexperimenten und im Speziellen aus dem Tiermodell für Multiple Sklerose – der Experimentellen Autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE) gelernt. Die Ursprünge von EAE gehen zurück in die 20er Jahre des letzten Jahrhunderts, als Koritschoner und Schweinburg eine Entzündung des Rückenmarks von Kaninchen induzierten, indem sie ihnen menschliches Rückenmark injizierten. Dies konnte durch Thomas River in den 30er Jahren bestätigt werden (Gold et al., 2006).

Der Beginn einer EAE ist ebenso wie der in der Multiplen Sklerose dadurch gekennzeichnet, dass autoreaktive T-Zellen die Bluthirnschranke passieren und dort eine Entzündungsreaktion hervorrufen. Im Gegensatz zu MS, die spontan auftritt, ist EAE eine induzierte Krankheit. Dies kann entweder durch eine aktive Immunisierung mit Antigen (zumeist MBP, PLP oder MOG) in Kombination mit einem Adjuvans z. B. CFA (Komplettes Freundsches Adjuvans) (aktive EAE) oder durch den Transfer von enzephalitogenen T-Zellen (AT-EAE) erfolgen (Ben-Nun et al., 1981; Swanborg, 2001). Neben dem Krallenaffen, Meerschweinchen und Kaninchen sind die meisten Tiermodelle für EAE heute vor allem in verschiedenen Ratten- und Mausstämmen etabliert. In der Lewis Ratte wird durch die Injektion von gpMBP in CFA oder den Transfer enzephalitogener T-Zellen eine monophasische EAE induziert. Diese reflektiert die Entzündungsreaktion, welche durch die Infiltration von Leukozyten in das ZNS verursacht wird. Allerdings findet in diesem Modell keine Demyelinisierung und axonale Schädigung statt. Letzteres beobachtet man hingegen in den schubartig verlaufenden Erkrankungen der DA Ratte und der SJL Maus. Als Modell für die primär progredierende Form von MS dient die MOG-induzierte EAE in der C57Bl/6 Maus. Der Einfluss des humoralen Immunsystems kann durch den Kotransfer von anti-MOG Antikörpern bei einer aktiven oder AT-EAE simuliert werden (Dunn et al., 2006).

Durch EAE-Modelle können viele Aspekte von MS, wie die Rolle des Immunsystems, Demyelinisierung oder axonale Schädigung, untersucht werden. Sie liefern somit wichtige Anhaltspunkte für Therapiemöglichkeiten und ermöglichen Untersuchungen zu Wirkungsmechanismen und eventuellen Nebenwirkungen von Medikamenten. Derartige Analysen wären *in vitro* niemals durchführbar.

## 1.4 Therapieansätze in der Multiplen Sklerose

Aufgrund der inflammatorischen Basis von MS zählen Strategien zur Modulation des Immunsystems zu den häufigsten Therapieansätzen in der Multiplen Sklerose. Diese reichen von einer allgemeinen Immunsuppression oder -modulation bis zu einer hoch spezifischen Immunintervention (**Abb. 1-2**).



**Abb. 1-2 Therapieansätze in der Multiplen Sklerose.** Die häufigsten Therapiestrategien von Multipler Sklerose umfassen die Suppression und Modulation des Immunsystems. Daneben werden Ansätze zur Modulation der Zellmigration, der Depletion von Leukozyten und dem Schutz von Neuronen verfolgt.

Zur allgemeinen Immunsuppression werden vor allem Glukokortikoide und Mitoxantron eingesetzt. Die intravenöse Verabreichung von 1 mg/Tag des Glukokortikoids Methylprednisolon an drei aufeinander folgenden Tagen zählt zu den häufigsten Therapiestrategien in der schubförmig verlaufenden Multiplen Sklerose (Murray, 2006). Bei Mitoxantron handelt es sich um ein auf Anthracycline basierendes chemotherapeutisches Agens und wurde zunächst für die Behandlung von akuten myelogenen Leukämien eingesetzt. Es ist nicht klar, welche Patienten am meisten von Mitoxantron profitieren. Aber es kommt häufig bei Patienten zum Einsatz, bei denen eine Therapie mit traditionellen immunmodulatorischen Agenzien fehlgeschlagen ist (Keegan und Noseworthy, 2002).

Zu den am häufigsten verwendeten immunmodulatorischen Substanzen zählen Interferon- $\beta$  und Glatirameracetat. Interferon- $\beta$  verhindert zum einen die Wanderung durch Epithelien durch die Reduktion von Metalloproteinasen. Außerdem interferiert es mit der durch IFN- $\gamma$  induzierten gesteigerten Expression von MHC Molekülen, moduliert apoptotische Signalwege und verändert das Zytokinmilieu durch einen T<sub>H2</sub> Shift (Hauser und Oksenberg, 2006). Ein weiterer wichtiger Therapieansatz wird mit Glatirameracetat verfolgt. Dabei handelt es sich um ein randomisiertes Polypeptid aus 4 AS (A, K, E, Y) von einer Länge von 40 – 100 Aminosäuren. Glatirameracetat saturiert MHC-Moleküle, verhindert eine effiziente Präsentation von Autoantigenen an Monozyten und DCs, induziert eine Bystandersuppression in ZNS-Lesionen und verursacht einen T<sub>H2</sub> Shift (Hauser, 2006). Ein antigenspezifischer Ansatz zur Toleranzinduktion liegt in der oralen Verabreichung von Myelinantigenen oder die Behandlung mit APLs (Altered Peptide Ligand). Jedoch zeigten sich bei beiden Ansätzen negative Nebenwirkungen in Phase III Studien (Hemmer et al., 2006). Statine hingegen greifen direkt in die Mechanismen von Zellsignalwegen ein und modulieren auf diesem Weg das Immunsystem (Weber et al., 2006). Lovastatin inhibiert den PI3Kinase/Akt/NF- $\kappa$ B-Weg, was zu einer Verringerung von VCAM-1 und E-Selektin führt (Waiczies et al., 2005). Atorvastatin induziert durch die Phosphorylierung von ERK1 Anergie. Ebenso kommt es zu einer Reduktion von Isoprenoiden aus dem Mevalonat-Signalweg, wodurch die Signaltransduktion über RhoA und Ras sowie ihrer Effektormoleküle ERK, p38 und c-Fos verringert werden (Dunn et al., 2006).

Eine weitere Behandlungsmöglichkeit besteht in der selektiven Depletion von Lymphozyten. Zurzeit befinden sich folgende depletierende Antikörper in klinischen Studien: anti-CD52 (T Lymphozyten), anti-CD20 (B Lymphozyten) und anti-CD25 (IL2R $\alpha$  für aktivierte Lymphozyten) (Hemmer et al., 2006).

Eine Verbesserung des Krankheitsverlaufes konnte auch durch die Modulation der Zellmigration erzielt werden. Natalizumab, ein humanisierter anti- $\alpha_4$ -Integrin-Antikörper, zeigte eine Reduktion von Schüben bis zu 66 % in MS Patienten. In der Kombination mit IFN- $\beta$  oder anderen immunsuppressiven Medikamenten trat jedoch in drei Patienten eine progressive multifokale Leukoenzephalopathy durch eine JC Virusinfektion auf, was zu einem zwischenzeitlichem Aussetzen dieser Behandlung geführt hatte (Langer-Gould und Steinman, 2006; Steinman, 2005). Ein sehr viel versprechender Kandidat ist auch FTY720, ein Sphingosin-1-Phosphat-

Rezeptoragonist, der die Wanderung von Lymphozyten in die Lymphknoten induziert bzw. ihre Auswanderung verhindert und dadurch die Infiltration von entzündeten Organen inhibiert (Chiba, 2005).

Die bisher erwähnten Therapieansätze zielen auf das Immunsystem und nicht direkt auf den Schutz von Neuronen. Glutamat ist an der Schädigung der Myelinscheide und Axonen beteiligt und MS Patienten weisen eine höhere Glutamatkonzentration im CSF auf. Antagonisten zu Glutamat oder seinen Rezeptor waren erfolgreich im EAE Modell und verminderten die Myelinzerstörung (Gilgun-Sherki et al., 2003, Karadottir et al., 2005). Ein weiterer Ansatz zum Schutz von Neuronen sind Cannabinoide, welche über den CB1 Rezeptor (Cannabinoidrezeptor) wirken und wahrscheinlich die Freisetzung von Glutamat reduzieren (Pryce et al., 2003).

Viele der erwähnten Therapieansätze tragen zur Verbesserung des Krankheitsbildes von Multiple Sklerose-Patienten bei und ermöglichen ihnen dadurch ein besseres Leben. Allerdings relativieren sich diese positiven Effekte durch Nebenwirkungen, unter denen die Patienten bei den unterschiedlichen Therapieformen leiden. Ein Grund hierfür mag in der Unkenntnis über den genauen Wirkungsmechanismus vieler eingesetzter Medikamente liegen. Studien, die sich mit diesen Mechanismen befassen, könnten zu einer effektiveren Behandlung und Vermeidung von Nebenwirkungen beitragen.

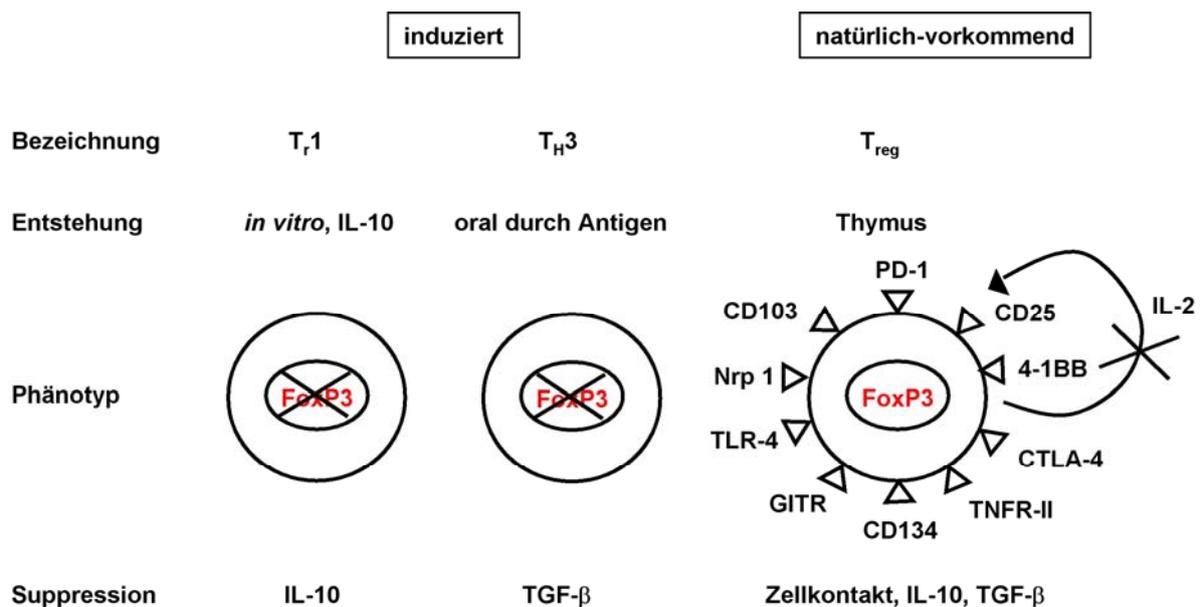
In dieser Arbeit wurden die Wirkungsmechanismen folgender Therapieansätze untersucht: die Aktivierung und Expansion regulatorischer T-Zellen *in vivo*, die Behandlung mit hohen Dosen Antigen und die therapeutische Verabreichung von Glukokortikoiden.

## **1.5 Aktivierung und Expansion von regulatorischen T-Zellen mittels eines superagonistischen anti-CD28 Antikörpers**

### **1.5.1 Regulatorische T-Zellen**

Regulatorische Fähigkeiten besitzen  $\gamma\delta$  T-Zellen, NKT Zellen sowie einige  $CD8^+$  und  $CD4^+$  T-Zellen, wobei letztere weiterhin in induzierbare  $T_{r1}$  oder  $T_{H3}$  und natürlich vorkommende  $CD4^+CD25^+FoxP3^+$  regulatorische T-Zellen unterteilt werden (**Abb. 1-3**) (Wing et al., 2005). *In vitro* werden durch eine wiederholte Stimulation in Anwesenheit von IL-10  $T_{r1}$  Zellen induziert. Sie kennzeichnen sich durch die

Produktion hoher Mengen IL-10 aus und unterdrücken sowohl  $T_H1$  als auch  $T_H2$  Zellen. Nach einer oralen Antigenverabreichung beobachtet man die Anreicherung TGF- $\beta$  sekretierender  $T_H3$  Lymphozyten. Auch diese zeigten in einigen Tiermodellen für Autoimmunerkrankungen einen therapeutischen Erfolg (Read und Powrie, 2001). Unter allen  $CD4^+$  T-Zellen findet man 5 – 10 % natürlich vorkommende  $CD4^+CD25^+FoxP3^+$  T-Zellen, die im Gegensatz zu den induzierten regulatorischen T-Zellen im Thymus entstehen (Itoh et al., 1999) . Lange Zeit war ihre Existenz umstritten und erst in den 1990ern konnte dies durch Sakaguchi und seine Mitarbeiter bewiesen werden. Der Transfer von T-Zellen in athymische Nacktmäuse, deren  $CD4^+CD25^+$  T-Zellen zuvor depletiert worden waren, löste in den Tieren ein polyautoimmunes Syndrom aus. Durch eine Rekonstitution mit  $CD4^+CD25^+$  T Lymphozyten konnte dies allerdings verhindert werden (Sakaguchi et al., 1995).



**Abb. 1-3. Induzierte und natürliche-vorkommende regulatorische T-Zellen.** Natürliche vorkommende regulatorische T-Zellen exprimieren im Gegensatz zu den induzierten  $T_r1$  und  $T_H3$  Zellen den Transkriptionsfaktor FoxP3 und werden im Thymus gebildet. Während  $T_r1$  und  $T_H3$  Zellen andere Leukozyten über die Sekretion anti-inflammatorischer Zytokine supprimieren, entfalten natürlich-vorkommende  $FoxP3^+$   $T_{reg}$  Zellen zusätzlich ihre Wirkung über Zellkontakte.

Neben CD25 exprimieren regulatorische T-Zellen auch Oberflächenmarker wie CTLA-4, GITR, CD134, CD103, TLR4, PD1, Nrp1, TNFRII und 4-1BB (Wing et al., 2005). Als Unterscheidungskriterium zu anderen Lymphozytenpopulationen können diese Moleküle allerdings nicht herangezogen werden, da sie auch auf anderen

Lymphozyten, insbesondere aktivierten T-Zellen exprimiert werden. Nur der Transkriptionsfaktor FoxP3 wird ausschließlich von regulatorischen T-Zellen exprimiert und ist für ihre Entwicklung entscheidend (**Abb. 1-3**) (Hori und Sakaguchi, 2004). So erlangen konventionelle T-Zellen nach der Transfektion mit FoxP3 den Phänotyp regulatorischer T-Zellen und können andere Lymphozyten supprimieren (Fontenot et al., 2003). Der Funktionsverlust oder das Fehlen von FoxP3 führen zu IPEX im Menschen und dem Scurfy-Phänotyp in der Maus. Dies äußert sich in einem aggressiven autoimmunen lymphoproliferativen Syndrom und der Infiltration von zahlreichen Organen durch aktivierte CD4<sup>+</sup> T-Zellen (Coffer und Burgering, 2004). Ebenso ist FoxP3 dafür verantwortlich, dass regulatorische T-Zellen im Gegensatz zu anderen T Lymphozyten nach ihrer Aktivierung kein IL-2 produzieren können. Durch die Assoziation von FoxP3 an NFAT wird die Transkription von IL-2 unterdrückt (Wu et al., 2006). Zwar ist IL-2 nicht für die Entwicklung von regulatorischen T-Zellen notwendig, jedoch für die Aufrechterhaltung ihrer Homeostase und kompetitiven Fitness *in vivo* (Fontenot et al., 2005).

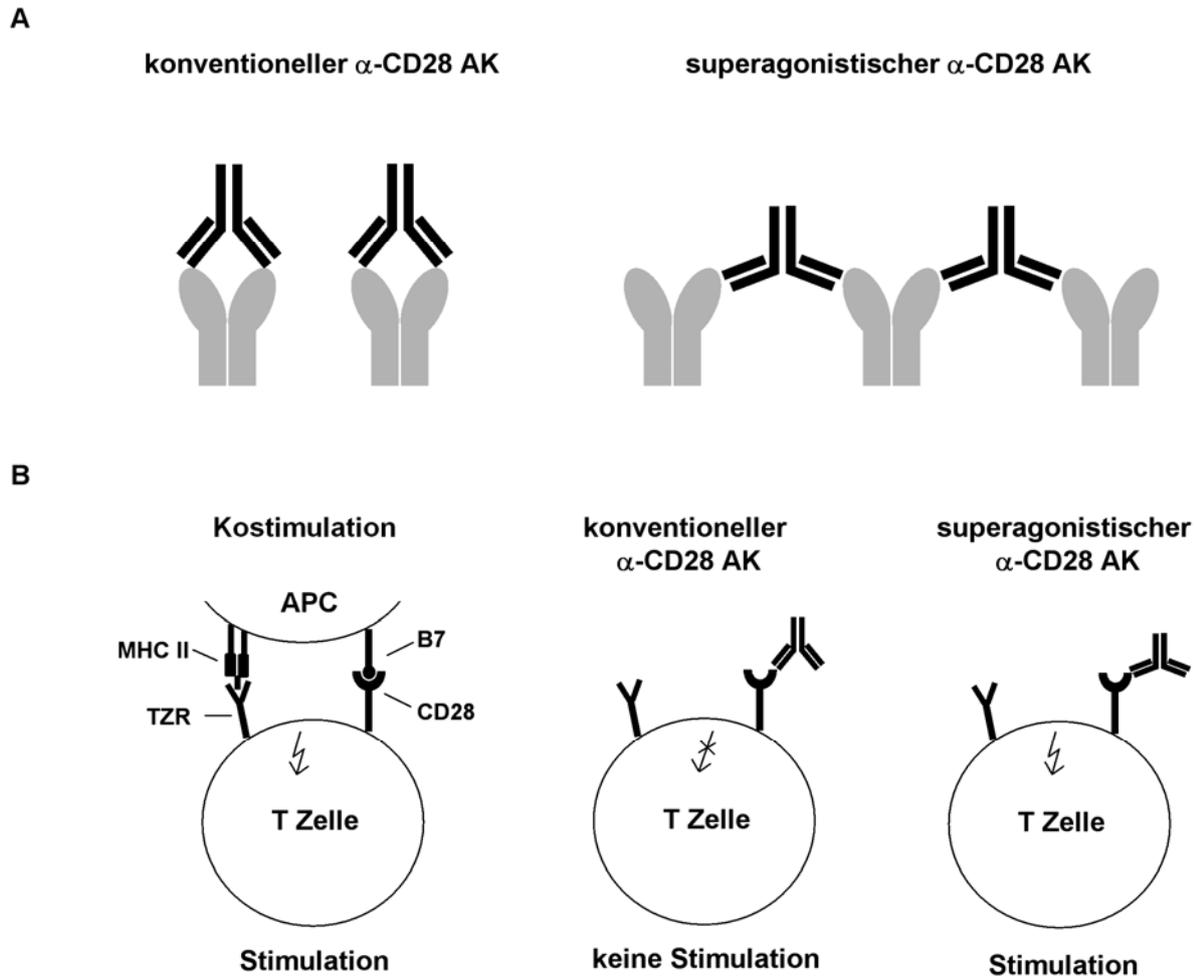
Regulatorische T-Zellen spielen eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der peripheren Toleranz. Ein Funktionsverlust oder Fehlen kann zum Ausbruch von Autoimmunerkrankungen führen (Wildin und Freitas, 2005). In der NOD Maus, ein Tiermodell für Diabetes mellitus Typ 1 und in Multiple Sklerose-Patienten wurde eine eingeschränkte Funktionsfähigkeit regulatorischer T-Zellen bereits nachgewiesen (Aoki et al., 2005; Viglietta et al., 2004). Man nimmt daher an, dass das Gleichgewicht zwischen autoreaktiven und regulatorischen T-Zellen in diesen Fällen zu Gunsten der autoreaktiven T-Zellen verschoben ist. Durch eine Wiederherstellung des Gleichgewichtes in Richtung der regulatorischen T-Zellen könnte eine Behandlung von Autoimmunerkrankungen möglich sein. Erreicht wird dies entweder durch eine *in vivo* Expansion oder den Transfer regulatorischer T-Zellen. Beide Ansätze zeigten bereits einen Therapieerfolg in Tiermodellen für Autoimmunerkrankungen. Dazu zählen u. a. Morbus Crohn (Mottet et al., 2003), Diabetes mellitus Typ I (Lundsgaard et al., 2005; Ott et al., 2005) und die Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis (EAE) (Kohm et al., 2002; McGeachy et al., 2005). Weitgehend ungeklärt ist, an welchem Ort und wie regulatorische T-Zellen wirken. Zahlreiche Mechanismen kommen für die Inhibierung autoreaktiver T-Zellen durch regulatorische T-Zellen in Frage. *In vitro* ist sie abhängig von Zell-Zell-Kontakten, wobei nicht geklärt ist, ob CTLA-4 oder zellgebundenes TGF- $\beta$  daran

beteiligt sind. Obwohl die Suppression *in vitro* unabhängig von Zytokinen verläuft (Wing et al., 2005), wurde im Tiermodell eine Beteiligung von IL-10 und TGF- $\beta$  nachgewiesen (Annacker et al., 2001; Chen et al., 2005). Ebenso unklar ist, an welcher Stelle – am Entzündungsort und/oder den sekundären lymphatischen Organen - regulatorische T-Zellen die autoimmune Reaktionen unterdrücken. In einigen Modellen üben T<sub>reg</sub> Zellen ihre immunsuppressive Wirkung im entzündeten Pankreas (Green et al., 2002; Herman et al., 2004), Gelenk (Morgan et al., 2005) oder Gehirn (Kleinewietfeld et al., 2005) aus, wohingegen in einem Colitismodell ihre Anwesenheit im entzündeten Gewebe entbehrlich war (Denning et al., 2005).

Um diese offen stehenden Fragen zu beantworten, wurden der Wirkungsort und der Mechanismus regulatorischer T-Zellen in einem Tiermodell für Multiple Sklerose untersucht. Hierfür wurden regulatorische T-Zellen mittels eines anti-CD28 superagonistischen Antikörpers *in vivo* aktiviert und expandiert.

### 1.5.2 CD28 und der superagonistische anti-CD28 Antikörper JJ316

CD28 ist das wichtigste kostimulatorische Molekül und wird als Homodimer mit einer IgV-ähnlichen Domäne, einer kurzen Transmembrandomäne und einem an Signaldomänen reichen Zytoplasmaschwanz auf fast allen menschlichen CD4<sup>+</sup> sowie auf 50 % der CD8<sup>+</sup> T-Zellen expremiert (Sharpe und Freeman, 2002). Nach der Ligation des TZR und der Bindung von CD28 an B7.1 (CD80) oder B7.2 (CD86) auf APCs (Kostimulation) werden in den Zellen Signale ausgelöst, die das Überleben und die Produktion von Zytokinen, insbesondere IL-2, fördern sowie die Proliferation und Differenzierung von T-Zellen anregen (Acuto und Michel, 2003). Zur CD28-Familie gehören weiterhin auch ICOS und CTLA-4. Während ICOS erst auf aktivierten T-Zellen expremiert wird (Sharpe and Freeman, 2002), handelt es sich bei CTLA-4 um den inhibitorischen Gegenspieler von CD28. Zwar bindet er wie CD28 an B7-Moleküle, allerdings mit einer zwanzigfach höheren Affinität (Alegre et al., 2001).



**Abb. 1-4. Die Wirkungsweise eines superagonistischen  $\alpha$ -CD28 Antikörpers im Vergleich zu der eines konventionellen.** **A** Während der konventionelle  $\alpha$ -CD28 Antikörper in der Nähe der B7-Bindungsstelle an CD28 bindet, führt die Bindung des superagonistischen  $\alpha$ -CD28 Antikörper an den C-D-Loop zu einer multivalenten Verknüpfung von CD28 Molekülen. **B** Für die Stimulation einer konventionellen T-Zelle wird ein Signal über den TZR und eines über CD28 benötigt (Kostimulation). Während ein konventioneller  $\alpha$ -CD28 Antikörper alleine T-Zellen nicht anregen kann, stimuliert ein superagonistischer  $\alpha$ -CD28 Antikörper Lymphozyten ohne die Ligation des TZR. APC: Antigenpräsentierende Zelle; AK: Antikörper.

Wie bereits erwähnt, wird für die Aktivierung von T Lymphozyten normalerweise ein Signal durch den TZR und ein kostimulatorisches Molekül, wie CD28 benötigt. Andernfalls kommt es zur Induktion von Anergie oder Apoptose (Acuto und Michel, 2003). Dies kann durch die Verwendung eines superagonistischen anti-CD28-Antikörpers umgangen werden. Dieser induziert eine T-Zellaktivierung ohne die Ligation des TZRs. Im Gegensatz zu konventionellen Antikörpern bindet der Superagonist nicht an die B7-Bindungsstelle, sondern seitlich an den C-D-Loop

(Hünig und Dennehy, 2005) (**Abb. 1-4 A und B**). Dadurch können CD28 Moleküle multivalent miteinander verknüpft werden, was wahrscheinlich zu einer Amplifikation tonischer TZR-Signale auf Ebene des SLP76/Vav/Itk Signalosoms und so zur Aktivierung der T-Zelle führt (Lühder et al., 2003). Nach Verabreichung des superagonistischen anti-CD28 Rattenantikörpers JJ316 beobachtet man eine starke Expansion von CD4<sup>+</sup> T-Zellen und B Lymphozyten, ein indirekter Effekt durch die Aktivierung von CD4<sup>+</sup> T-Zellen (Tacke et al., 1997) und die Induktion eines T<sub>H</sub>2-Shiftes (Rodriguez-Palmero et al., 1999). Am erstaunlichsten ist aber die überproportionale Aktivierung und Akkumulation regulatorischer T-Zellen *in vivo* (Lin und Hünig, 2003). Im Tiermodell wurde durch Verabreichung von JJ316 ein Therapieerfolg in der EAE (Beyersdorf et al., 2005), EAN (Schmidt et al., 2003a) und rheumatischen Arthrites (Rodriguez-Palmero et al., 2006) erzielt. Hierfür verantwortlich ist vor allem die zuletzt erwähnte Aktivierung und Anreicherung regulatorischer T-Zellen *in vivo*.

In dieser Arbeit sollte u. a. der Einfluss des Superagonisten auf autoreaktive und regulatorische T-Zellen näher analysiert werden. Durch die Verwendung eGFP<sup>+</sup> enzephalitogener T-Zellen und der Expression von FoxP3 in regulatorischen T-Zellen konnten die Effekte auf beide Zellpopulationen voneinander unterschieden werden.

## 1.6 Antigentherapie

Normalerweise führt die Verabreichung von gpMBP zusammen mit einem Adjuvans zur Manifestierung von EAE. Im Gegensatz dazu unterdrücken hohe Dosen spezifischen Antigens ohne Adjuvans die Immunantwort sowohl *in vitro* als auch *in vivo* (Critchfield et al., 1995; Racke et al., 1996). In der Experimentellen Autoimmunen Neuritis (EAN) (Weishaupt et al., 1997) und der EAE (Weishaupt et al., 2000b) wurde durch die Verabreichung hoher Dosen Antigen eine Verbesserung des Krankheitsverlaufes erzielt. Der Grund hierfür liegt in der Induktion von Apoptose, da sowohl am Entzündungsort (PNS oder ZNS) als auch in der Milz eine erhöhte Anzahl apoptotischer Zellen nachgewiesen wurde (Weishaupt et al., 1997; Weishaupt et al., 2000b). Vermittelt wird dies vermutlich durch die Freisetzung von pro-inflammatorischen Zytokinen. Nach Injektion hoher Dosen Antigen wurde sowohl eine erhöhte Produktion als auch Freisetzung an TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  gemessen

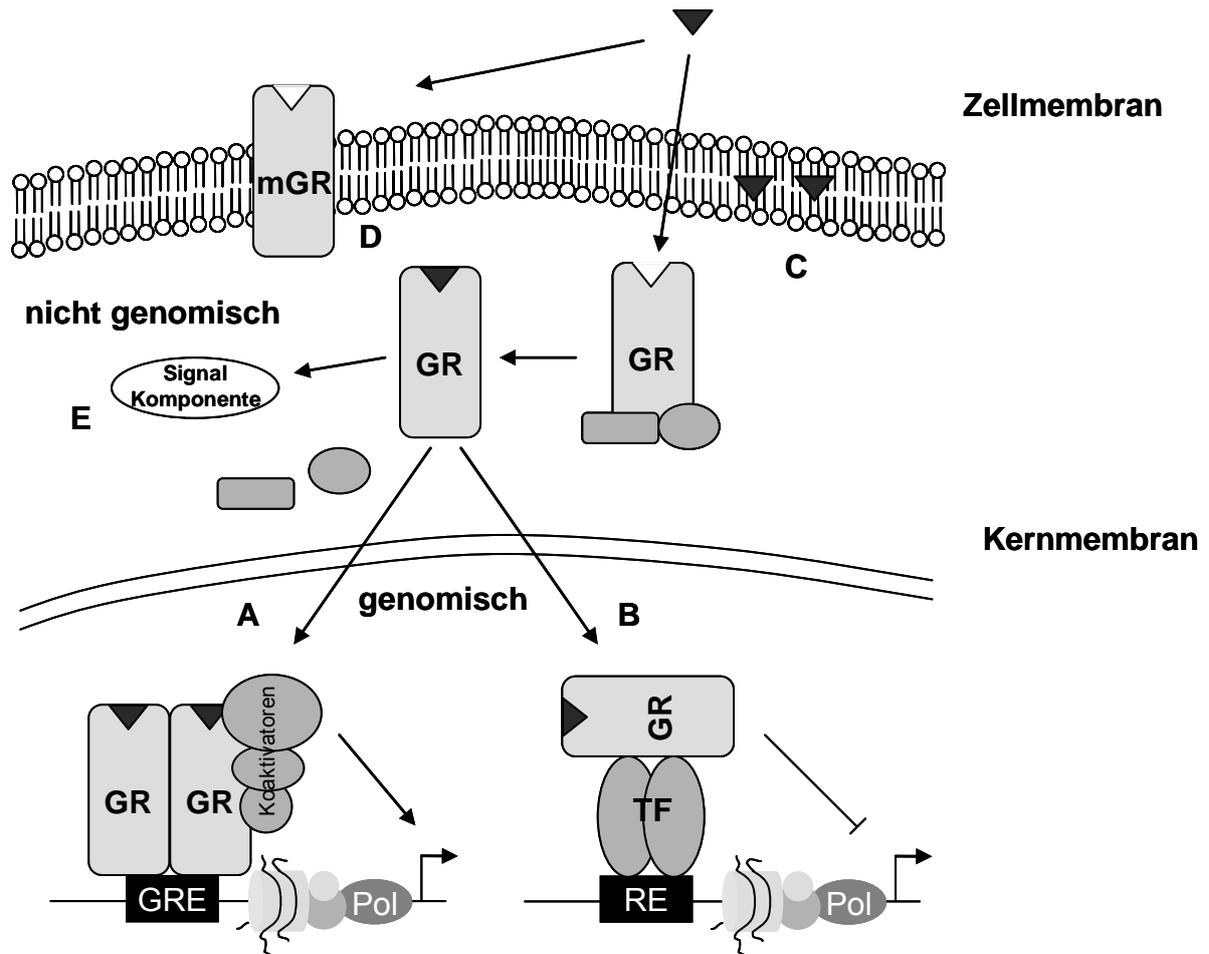
(Weishaupt et al., 2000b). Nach Neutralisierung von TNF- $\alpha$  mit Antikörpern hingegen war die Apoptoserate von Lymphozyten reduziert (Weishaupt et al., 2000a).

Aufgrund mangelnder Unterscheidungsmerkmale war jedoch unklar geblieben, in welchen Zellen – enzephalitogenen und/oder konventionellen T-Zellen – Apoptose durch die Antigentherapie induziert wird. In dieser Arbeit wurden zum Auslösen einer EAE daher eGFP<sup>+</sup> enzephalitogene T-Zellen eingesetzt. Dadurch ist eine genaue Abgrenzung zu eGFP<sup>-</sup> konventionellen T-Zellen und eine Klärung der Frage, welche Zellen das Ziel der antigeninduzierten Apoptose sind, möglich.

## **1.7 Therapie einer EAE mit Glukokortikoiden**

### **1.7.1 Glukokortikoide und der Glukokortikoidrezeptor**

Glukokortikoide werden in der Nebennierenrinde produziert und stehen unter der Kontrolle der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse. Stress sowie pro-inflammatorische Zytokine induzieren über CRH (Corticotropin Releasing Hormon) und ACTH (Adrenokortikotropes Hormon) die Ausschüttung von Glukokortikoiden (Webster et al., 2002). Dies wiederum resultiert in einer Inhibierung von CRH und ACTH und führt dadurch zu einer Reduktion der Glukokortikoidfreisetzung (negative Rückkopplungsschleife) (Reichardt und Schütz, 1996). Zudem folgt die Glukokortikoidsekretion einem spontanen Tag-Nacht-Rhythmus mit einem Maximum beim Menschen in den frühen Morgenstunden.



**Abb. 1-5. Genomische und nicht-genomische Effekte von Glukokortikoiden.** Glukokortikoide diffundieren passiv durch die Zellmembran in das Zytoplasma und binden dort an den Glukokortikoidrezeptor. Nach Translokation in den Zellkern kann er entweder durch die Bindung an GRE Elemente zur Aktivierung (A) oder durch die Assoziation mit Transkriptionsfaktoren (B) zur Transrepression von Genen führen. Neben diesen genomischen werden auch nicht genomische Wirkungen von Glukokortikoiden diskutiert. Diese umfassen die physikochemische Interaktion mit Zellmembranen (C), die Interaktion mit Signalprozessen (D) und Wirkungen über einen membrangebundenen Glukokortikoidrezeptor (E). GR: Glukokortikoidrezeptor; mGR: membrangebundener Glukokortikoidrezeptor; TF: Transkriptionsfaktor; GRE: Glukokortikoid Response Element; RE: Response Element; Pol: RNA-Polymerase II.

Glukokortikoide entfalten ihre Wirkung durch die Bindung an den Glukokortikoidrezeptor (GR). Dieser gehört zur Kernrezeptorsuperfamilie und besteht aus mehreren unterschiedlichen Domänen, welche für die Ligandenbindung, Transaktivierung, DNA-Bindung, Dimerisierung und Kerntranslokation verantwortlich sind (Tuckermann et al., 2005). Ohne Hormon liegt der GR im Zytoplasma als ein Komplex mit Hitzeschockproteinen und Immunophilinen vor. Nach

der Bindung von Glukokortikoiden dissoziiert der Komplex und der GR wandert in den Zellkern. Dort kann er auf zwei unterschiedliche Weisen wirken (**Abb. 1-5**). Für die Transaktivierung von Genen muss der GR zunächst dimerisieren und zusammen mit Koaktivatoren an die DNA binden. Dabei handelt es sich um unvollständige palindromische Sequenzen, so genannte Glukokortikoid Response Elemente (GRE) (Strähle et al., 1987), in den Promoter und Enhancer-Regionen von einigen Genen, wie z. B. der Tyrosinaminotransferase (Jantzen et al., 1987) oder Methallothionin I und II (Kelly et al., 1997). Die Transrepression von Genen hingegen verläuft unabhängig von der Bindung des GR an die DNA, indem er mit Transkriptionsfaktoren wie z.B. NF- $\kappa$ B, NF-AT, CREB oder Stat5, assoziiert, die an die entsprechenden DNA-Elemente gebunden haben (Tuckermann et al., 2005). Neben diesen genomischen Effekten entfalten Glukokortikoide ihre Wirkung auch über rasch verlaufende nicht-genomische Mechanismen (Buttgereit und Scheffold, 2002). Hierbei werden folgende Prozesse zurzeit diskutiert: die Bindung an einen membrangebundenen Glukokortikoidrezeptor, die Interaktion mit Signalprozessen über den zytosolischen Glukokortikoidrezeptor und physikochemische Wechselwirkungen mit zellulären Membranen (**Abb. 1-5**). Allerdings ist bisher nur sehr wenig über nicht-genomische Wirkungsmechanismen von Glukokortikoiden bekannt und weitere Untersuchungen sind dringend erforderlich.

### 1.7.2 Beeinflussung des Immunsystems durch Glukokortikoide

Zu den bekanntesten Funktionen von Glukokortikoiden zählen neben der Induktion von Apoptose ihre entzündungshemmenden Wirkungen.

Eines der ersten Beispiele für den programmierten Zelltod war die Induktion von Apoptose in Lymphozyten durch Glukokortikoide (Wyllie, 1980). Besonders anfällig sind hierfür doppelt-positive Thymozyten. Allerdings wird bei höheren Glukokortikoidkonzentrationen auch in peripheren Lymphozyten Apoptose ausgelöst (Wang et al., 2006). Obwohl der genaue Mechanismus, durch den Glukokortikoide Apoptose induzieren, noch nicht aufgeklärt ist, ist die Anwesenheit eines intakten GR sowie die *de novo* Expression von Genen erforderlich (Reichardt, 2004). Ebenso veranlassen Glukokortikoide die Aktivierung von Caspasen, resultieren in der Freisetzung von Cathepsin B aus Lysosomen, fördern die proteosomale Degradierung von Apoptose-inhibierenden Proteinen wie c-ICAP1 und XIAP oder

erhöhen den Level an Wasserstoffperoxid und die Produktion an Ceramiden (Herold et al., 2006).

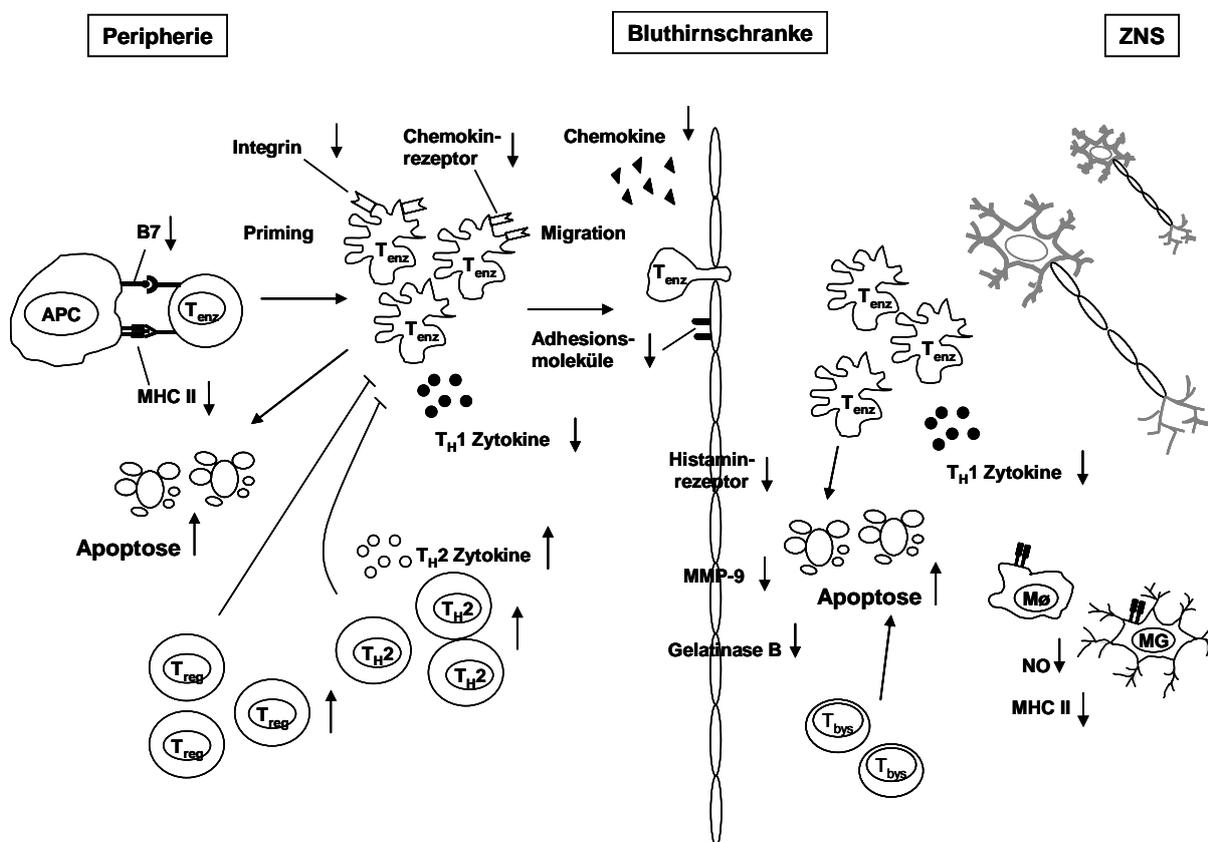
Daneben führen Glukokortikoide zu einer allgemeinen Immunsuppression. Dies involviert sowohl die angeborene als auch die erworbene Immunität. So reduzieren Glukokortikoide die Antigenaufnahme und die Expression von MHC II und B7 Molekülen auf APCs (Holt und Thomas, 1997; Piemonti et al., 1999), wodurch das Priming von T-Zellen eingeschränkt wird. Einen weiteren Angriffspunkt stellt die Migrationsfähigkeit von Leukozyten dar. So wurde nach der Verabreichung von Glukokortikoiden eine verringerte Expression von Adhäsionsmolekülen sowie ihrer Liganden auf Endothelzellen und Leukozyten beobachtet (Tuckermann et al., 2005). Daneben inhibieren Glukokortikoide in Granulozyten, Makrophagen und T Lymphozyten die Synthese und Freisetzung von pro-inflammatorischen Zytokinen, wie IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, IL-12, TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  (Almawi et al., 1996). Die Suppression von IL-12 und die Induktion von IL-4 und IL-10 führen zu einer Verschiebung der Immunreaktion in Richtung einer T<sub>H</sub>2 Antwort (Elenkov, 2004). Allerdings werden bei sehr hohen Glukokortikoidkonzentrationen auch T<sub>H</sub>2 Zellen inhibiert (Tuckermann et al., 2005). Neben der Genexpression beeinflussen Glukokortikoide auch die Aktivität von Enzymen wie Cyclooxygenase-2 (Masferrer et al., 1992) oder iNOS .

All diese Effekte sind für die anti-inflammatorische Wirkung von Glukokortikoiden verantwortlich und ermöglichen ihren Einsatz zur Behandlung von Entzündungen und Autoimmunerkrankungen wie Multiple Sklerose.

### **1.7.3 Glukokortikoide in der Behandlung von EAE und Multipler Sklerose**

Der Einsatz hoch dosierter Glukokortikoide gehört zu den etablierten Standardtherapien akuter Schübe bei der MS. Dabei wird den Patienten an 3 -5 aufeinander folgenden Tagen 20 – 50 mg/kg Methylprednisolon intravenös verabreicht. Schon nach kurzer Zeit verbessert sich das Krankheitsbild, was durch die Verminderung an Lähmungserscheinungen und die Reduktion der Kontrastmittelaufnahme frischentzündlicher Herde bei MRT-Untersuchungen zum Ausdruck kommt. Allerdings führte eine abrupte Beendigung der Glukokortikoidtherapie in einigen Fällen zu einer Verschlechterung des Krankheitsbildes. Um dies zu vermeiden, werden den Patienten noch über einen

gewissen Zeitraum oral Glukokortikoide mit abnehmender Konzentration verabreicht (Grauer et al., 2001).



**Abb. 1-6. Wirkungen von Glukokortikoiden bei der Behandlung von Multipler Sklerose und EAE.** Der Therapieerfolg von Glukokortikoiden in MS und der EAE beruht auf der Induktion von Apoptose in enzephalitogenen und Bystander T-Zellen. Daneben führen sie zu einer allgemeinen Immunsuppression durch die Inhibierung von proinflammatorischen Zytokinen sowie durch Induktion eines T<sub>H2</sub> Shiftes und regulatorische T-Zellen. Durch eine verminderte Expression von Adhäsionsmolekülen, Chemokinen und ihre Rezeptoren sowie weitere Wirkungen auf die Bluthirnschranke wird die Infiltration des Rückenmarks durch enzephalitogene und andere Leukozyten inhibiert. T<sub>enz</sub>: enzephalitogene T-Zellen; T<sub>bys</sub>: Bystander T-Zellen; T<sub>reg</sub>: regulatorische T-Zelle; MG: Mikroglia; MØ: Makrophage.

Der Therapieerfolg mit Glukokortikoiden in der Multiplen Sklerose beruht auf denselben Wirkungsmechanismen, die u. a. im vorherigen Abschnitt beschrieben wurden (**Abb. 1-6**). Einer der wichtigsten Mechanismen, die zur Verbesserung des Krankheitsbildes beitragen, ist die Induktion von Apoptose. So ist die Apoptoserate unter Blutleukozyten in MS Patienten nach einer Hochdosis Glukokortikoidtherapie (Leussink et al., 2001) erhöht und im EAE-Modell steigt die Anzahl an apoptotischen Zellen *in situ* in einer dosis-abhängigen Weise an (Schmidt et al., 2000).

Ein weiterer wichtiger Angriffspunkt von Glukokortikoiden ist die Bluthirnschranke, indem sie zur Aufrechterhaltung ihrer Integrität beitragen. Dies soll u. a. durch eine reduzierte Expression von Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen der Bluthirnschranke (VCAM-1, E-Selektin) (Elovaara et al., 2000) oder auf autoreaktiven Leukozyten (LFA-1, VLA-4) (Elovaara et al., 1998) erreicht werden. Dazu beitragen könnten auch reduzierte Mengen an Gelatinase B, Urokinase-Typ Plasminogen Aktivator (Rosenberg et al., 1996), MMP-9 (Harkness et al., 2000) oder  $H_1$  und  $H_2$  Histaminrezeptoren (Karlstedt et al., 1999), wie es in MS Patienten oder auf Rattenendothelzellen nach einer Hochdosisglukokortikoidtherapie beobachtet wurde. Ebenso könnte durch eine verminderte Expression von Chemokinen wie IL-8 (Mirowska-Guzel et al., 2006) oder CXCL10 (Moreira et al., 2006) die Migration zum Entzündungsort eingeschränkt sein. Auch diese Prozesse könnten zur Aufrechterhaltung der Bluthirnschrankenintegrität beitragen.

Wichtig für das Abklingen von MS Schüben sind vor allem die anti-inflammatorischen Wirkungen von Glukokortikoiden. Erreicht wird dies durch die Suppression von proinflammatorischen Zytokinen, insbesondere  $T_H1$  Zytokinen, und der Induktion eines  $T_H2$  Shiftes. So reduziert Methylprednisolon die mRNA Level an  $TNF-\alpha$  und  $IFN\gamma$  in PBMCs aus MS Patienten (Gayo et al., 1998), wohingegen die Mengen an  $T_H2$  Zytokinen wie IL-4 oder  $TGF-\beta$  (Correale et al., 1998; Gayo et al., 1998) erhöht sind. Ebenso konnte gezeigt werden, dass der prozentuale Anteil an regulatorischen T-Zellen nach einer Hochdosisglukokortikoidtherapie sowohl in MS Patienten (Navarro et al., 2006) als auch im EAE Modell (Chen et al., 2006) erhöht ist und zur Immunsuppression von autoreaktiven Zellen beitragen könnten.

Somit tragen Glukokortikoide in einer vielfältigen Art und Weise zur Verbesserung des Krankheitsbildes von MS bei. Ein Problem, welches sich hierbei aber ergibt, ist, dass viele dieser Erkenntnisse auf Studien in Zellkultur oder mit Blutzellen von MS Patienten beruhen und dadurch nicht die Ereignisse am Entzündungsort widerspiegeln. Selbst im Tiermodell, wo genauere Untersuchungen im ZNS möglich sind, kann nicht zwischen autoreaktiven und Bystander Lymphozyten unterschieden werden. Wie Glukokortikoide auf diese Zellpopulationen wirken, ob sich die Effekte auf sie eventuell unterscheiden, kann unter diesen Umständen nicht festgestellt werden. Für neuere Therapiemöglichkeiten und zu einer Verminderung bzw. Vermeidung von Nebeneffekten wäre dies aber dringend erforderlich. Insbesondere über die Mechanismen nicht-genomischer Effekte, die bei Hochdosis-

Glukokortikoidtherapien auftreten, ist bisher sehr wenig bekannt. Dieses Problem sollte durch den Einsatz eGFP<sup>+</sup> enzephalitogener T Lymphozyten gelöst werden. Durch die Induktion einer AT-EAE mit diesen Zellen kann der Effekt von Glukokortikoiden auf autoreaktive und konventionelle Lymphozyten sowohl genauer analysiert als auch differenziert werden.

## 1.8 Zielsetzung

In dieser Arbeit sollen die Wirkungsmechanismen folgender Therapieansätze für die Multiple Sklerose untersucht werden: die Aktivierung und Expansion regulatorischer T Zellen *in vivo* mittels des superagonistischen anti-CD28 Antikörpers JJ316, die Verabreichung hoher Dosen Antigen und die Behandlung einer EAE mit hohen Dosen an Glukokortikoiden. Bei all diesen Ansätzen wird eine AT-EAE mittels eGFP<sup>+</sup> enzephalitogener T Lymphozyten induziert, wodurch eine genaue Unterscheidung von anderen Leukozyten möglich ist. Ebenso kann der Einfluss der verschiedenen Therapieansätze auf die unterschiedlichen Zellpopulationen ermittelt werden.

Erst kürzlich wurde gezeigt, dass durch die Verabreichung des superagonistischen anti-CD28 Antikörpers JJ316 regulatorische T-Zellen aktiviert sowie expandiert werden und dadurch eine Verbesserung des Krankheitsverlaufes einer EAE erzielt wird. Der exakte Suppressionsort und -mechanismus ist allerdings noch nicht aufgeklärt. In dieser Arbeit sollte daher untersucht werden, an welchem Ort – in sekundären lymphatischen Organen und/oder der Entzündungsstelle – und auf welche Art regulatorische T-Zellen autoreaktive enzephalitogene Lymphozyten inhibieren.

Hohe Dosen an Antigen führen zu einer Verbesserung des Krankheitsverlaufes durch die Induktion von Apoptose in Lymphozyten. Es sollte nun geklärt werden, welche Zellen, autoreaktive und/oder konventionelle T Lymphozyten, das Ziel der Apoptose sind.

Glukokortikoide entfalten ihre Wirkung durch die Induktion von Apoptose und eine allgemeine Immunsuppression. Aufgrund mangelnder Unterscheidungskriterien ist bisher allerdings nur sehr wenig über den direkten Einfluss von Glukokortikoiden auf enzephalitogene Zellen *in vivo* bekannt. Im letzten Therapieansatz sollte daher der Wirkungsmechanismus einer Hochdosis-Glukokortikoidtherapie in Bezug auf die Entzündung, die Bluthirnschranke, die Induktion von Apoptose sowie den Phänotyp

enzephalitogener T-Zellen untersucht werden. Des Weiteren sollte geklärt werden, inwieweit nicht-genomische Effekte zur Verbesserung des Krankheitsverlaufes auf Grund der sehr schnellen Genesung der Tiere beitragen.

## 2 Materialien

Im folgenden Abschnitt sind Geräte, Verbrauchsmaterialien, Puffer und Medien aufgeführt, die im Allgemeinen oder bei mehreren verschiedenen Anwendungen zum Einsatz gekommen sind. Spezifische Chemikalien und Geräte, die einmalig oder selten verwendet wurden, werden im jeweiligen Methodenparagrafen aufgeführt.

### 2.1 Geräte

Brutschrank	Heraeus, Hanau, Deutschland
Durchlichtmikroskop IM 34	Zeiss, Jena, Deutschland
Pipetten	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipettierhilfe	Brand, Wertheim, Deutschland
pH Meter	pH 523 WTW
Sterilbank	Heraeus, Hanau, Deutschland
Vortexer Genie-2	Scientific Industries
Wasserbad	Lauda, Wunstorf, Deutschland
Zentrifuge 5804R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

### 2.2 Verbrauchsmaterialien

Einwegspritzen 2 ml, 5 ml, 10 ml	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Diabetesspritzen 0,3 x 12 mm	B. Braun, Melsungen, Deutschland
FACS Röhrchen	Greiner, Solingen, Deutschland
Kanülen 0,9 x 40 mm	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Mikrotiterplatten Suspensionskultur (6, 12, 48, 96 Vertiefungen, Rund- und Flachboden)	Greiner, Solingen, Deutschland
Pipettenspitzen (blau, gelb)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Pipettenspitzen (durchsichtig)	Nunc, Wiesbaden, Deutschland
Zellsieb 40 µm	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland

---

Zentrifugenröhrchen 1,5 ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zentrifugenröhrchen 15 ml und 50 ml	Greiner, Solingen, Deutschland

## 2.3 Chemikalien und Puffer

### 2.3.1 Chemikalien und Pufferzusätze

BSA	Roth, Karlsruhe, Deutschland
CaCl <sub>2</sub> * 2 H <sub>2</sub> O	Ferak, Berlin, Deutschland
CaCl <sub>2</sub> * 4 H <sub>2</sub> O	Ferak, Berlin, Deutschland
DEPC	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
DNase I	Roche, Basel, Schweiz
Ethanol	Ferak, Berlin, Deutschland
Glukose	Ferak, Berlin, Deutschland
Isopropanol	AppliChem, Darmstadt Deutschland
KCl	AppliChem, Darmstadt Deutschland
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Ferak, Berlin, Deutschland
2- Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
MgCl <sub>2</sub> * 6 H <sub>2</sub> O	Ferak, Berlin, Deutschland
MgSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O	Ferak, Berlin, Deutschland
NaCl	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
NaHCO <sub>3</sub>	Merck, Darmstadt, Deutschland
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Merck, Darmstadt, Deutschland
NH <sub>4</sub> Cl	Roth, Karlsruhe Deutschland
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> * 2 H <sub>2</sub> O	Ferak, Berlin, Deutschland
Percoll	Fluka, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Tris	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Trizol	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

### 2.3.2 Puffer

#### Annexinbindungspuffer 10x :

5 mM Hepes pH 7.2

25 mM CaCl<sub>2</sub>

1,4 M NaCl

#### BSS I

50 mM Glukose

4,4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

13,4 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> \* 2 H<sub>2</sub>O

0,1 % Phenolrot

#### BSS II

12,65 mM CaCl<sub>2</sub> \* 2 H<sub>2</sub>O

53,6 mM KCl

1,37 M NaCl

9,8 mM MgCl<sub>2</sub> \* 6 H<sub>2</sub>O

8,1 mM MgSO<sub>4</sub> \* 7 H<sub>2</sub>O

#### BSS

11 % BSS I

11 % BSS II

#### BSS/BSA:

BSS

0,2 % BSA

#### Coating Puffer:

45,3 mM NaHCO<sub>3</sub>

18,2 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>

Lösung A 8,4 g NaHCO<sub>3</sub> in 100 ml H<sub>2</sub>O

Lösung B: 10,6 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 100 ml H<sub>2</sub>O

45,3 ml Lösung. A und 18,2 ml Lösung B ad 500 ml H<sub>2</sub>O

pH 9,6 mit Lösung A bzw. Lösung B  
auf 1 l H<sub>2</sub>O auffüllen

**10 x DNaseI-Puffer:**

500 mM Tris-HCl, pH 7.5  
50 mM CaCl<sub>2</sub>  
10 mM DTT

**FACS-Puffer:**

PBS  
0,1 % BSA

**PBS:**

13 mM NaCl  
2,6 mM KCl  
6,5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> \* 2 H<sub>2</sub>O  
3,6 mM CaCl<sub>2</sub> \* 4 H<sub>2</sub>O  
0,5 mM MgCl<sub>2</sub> \* 6 H<sub>2</sub>O

**Rückenmark-Resuspensionspuffer (für die Erythrolyse):**

PBS  
0,1 % BSA  
1% Glucose  
100 µg/ml DNase I

**TAC-Puffer:**

20 mM Tris pH 7,5  
155 mM: NH<sub>4</sub>Cl  
pH 7,2 mit HCl

**Verdünnungspuffer für den Percollgradienten:**

PBS  
0,1 % BSA  
1 % Glucose

## 2.4 Medien und Medienzusätze

### 2.4.1 Medienkomponenten

ConAÜ	Eigenherstellung, Neurologie, Würzburg, Deutschland
D-MEM	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
FCS	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Glutamin	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Hepes	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Penicillin/Streptomycin	Biochrom, Berlin, Deutschland
Rattenserum	Charles River, Sulzfeld, Deutschland
RPMI-1640	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

### 2.4.2 Medien

#### **EH-Medium:**

D-MEM

25 mM Hepes

pH 7,4

#### **RPMI-10:**

RPMI 1640

10 % hitzeinaktiviertes FCS (30 Minuten

56°C)

1 % Pen/Strep

#### **ratReMed:**

RPMI 1640

1 % Glutamin

1 % Pen/Strep

1 % Rattenserum

100 mM 2-Mercaptoethanol

**TCGF:**

RPMI-1640

5 % FCS

12,5 % ConAÜ

1 % Pen/Strep

1 % Glutamin

## **3 Methoden**

### **3.1 Tiere**

6-8 Wochen alte weibliche Lewis Ratten wurden bei Charles River (Sulzfeld, Deutschland) erworben und in allen Tierexperimenten eingesetzt. Zur Herstellung eGFP<sup>+</sup> enzephalitogener T-Zellen und eGFP<sup>+</sup> Indikatorzellen (regulatorische bzw. konventionelle CD4<sup>+</sup> T-Zellen) wurden eGFP-transgene Lewis Ratten (van den Brandt et al., 2004) in der Tierhaltung des Institutes für Virologie und Immunbiologie in Würzburg gezüchtet. Alle Experimente wurden durch die Regierung von Unterfranken genehmigt und durch autorisierte Personen überwacht.

### **3.2 Induktion einer AT-EAE**

Eine AT-EAE wurde durch die intravenöse Injektion von  $8 \times 10^6$  MBP-spezifischen T-Zellen in die laterale Schwanzvene 6-8 Wochen alter weiblicher Lewis Ratten induziert. Die Tiere wurden täglich gewogen und auf klinische Symptome von EAE hin untersucht. Die Stärke der EAE wurde an Hand einer sechsstufigen Skala ermittelt: 0 = gesund; 1 = Gewichtsverlust, schleifende Schwanzspitze; 2 = Schwanz kann nicht mehr aufgerichtet werden, milde Parese; 3 = gemäßigte Paraparese, Ataxie; 4 = Tetraparese; 5 = moribund; 6 = tot (Schmidt et al., 2003a).

### **3.3 Experimentelles Design**

#### **3.3.1 Aktivierung und Expansion regulatorischer T-Zellen *in vivo* mittels des CD28 superagonistischen Antikörpers JJ316**

Zur Untersuchung des Mechanismus regulatorischer T-Zellen *in vivo* wurden diese mittels des  $\alpha$ -CD28 superagonistischen Antikörpers JJ316 aktiviert und expandiert (Beyersdorf et al., 2005). Eine AT-EAE wurde durch die intravenöse Injektion von  $8 \times 10^6$  eGFP<sup>+</sup> MBP-spezifischen T-Zellen in die laterale Schwanzvene 6 - 8 Wochen alter weiblicher Lewis Ratten induziert. Am folgenden Tag (prophylaktischer Ansatz) oder an Tag 3 (therapeutischer Ansatz) wurde den Ratten 1 mg JJ316 bzw. 1 ml PBS

(Kontrollgruppe) intravenös appliziert. An Tag 2, 4, 6, 8, 10, und 14 (prophylaktische Gruppe) oder an Tag 3, 5, 7 und 10 (therapeutische Gruppe) wurden die Tiere durch CO<sub>2</sub>-Inhalation getötet, Milz, zervikale sowie mesenteriale Lymphknoten und das Rückenmark entnommen und mittels Durchflusszytometrie, Histologie und konfokaler Mikroskopie analysiert. Um die klinischen Symptome und die Gewichtsveränderung über den gesamten Krankheitsverlauf zu verfolgen, wurden aus jeder Gruppe Tiere bis zur vollen Genesung am Leben gelassen.

Um das Migrationsverhalten kotransferierter eGFP<sup>+</sup> Indikatorzellen in einer AT-EAE nach einer JJ316 Injektion zu untersuchen, wurden eGFP<sup>+</sup> regulatorische und konventionelle T-Zellen aus mit JJ316 stimulierten eGFP-transgenen Lewis Ratten isoliert. Jeweils  $1 \times 10^7$  eGFP<sup>+</sup> regulatorische oder konventionelle CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurden zusammen mit  $8 \times 10^6$  eGFP<sup>-</sup> enzephalitogenen T-Zellen an Tag 0 intravenös in eGFP<sup>-</sup> weibliche Lewis Ratten injiziert. In einem Kontrollexperiment wurden eGFP<sup>+</sup> T<sub>reg</sub> oder eGFP<sup>+</sup> T<sub>con</sub> Zellen ohne Krankheitsinduktion transferiert. Einen Tag später erfolgte die intravenöse Verabreichung von 1 mg JJ316. An Tag 4, 6, und 8 nach dem Zelltransfer wurden die Tiere getötet, Milz, zervikale sowie mesenteriale Lymphknoten und Rückenmark entnommen und mittels FACS analysiert.

### 3.3.2 Antigentherapie

Im zweiten Versuchsansatz sollte ermittelt werden, in welchen Zellen – enzephalitogenen und/oder konventionellen T-Zellen – Apoptose nach der zweimaligen Verabreichung von gpMBP zu beobachten ist. Eine AT-EAE wurde durch die Injektion von  $8 \times 10^6$  Zellen eGFP<sup>+</sup> T-Zellen induziert. An Tag 3 wurde den Tieren 500 µg gpMBP oder PBS (Kontrollgruppe) intravenös injiziert. Dies wurde nach 15 h wiederholt und die Tiere 6 h nach der letzten Applikation getötet. Das Zellinfiltrat des Rückenmarks und der Milz wurde auf Apoptose mittels Durchflusszytometrie und Histologie untersucht.

### **3.3.3 Glukokortikoidtherapie**

Durch die Verwendung eGFP<sup>+</sup> enzephalitogener Zellen sollte untersucht werden, wie Glukokortikoide auf enzephalitogene und konventionelle T-Zellen in der Therapie einer AT-EAE wirken. Die AT-EAE wurde durch die Injektion von  $8 \times 10^6$  eGFP<sup>+</sup> T-Zellen induziert. An Tag 3, d. h. mit dem Auftreten erster Krankheitssymptome wurde den Ratten 20 mg/kg Dexamethason bzw. PBS intravenös appliziert. 2, 5, 10 und 24 h nach der Injektion wurden die Tiere getötet und die Milz sowie das Rückenmark mittels FACS, Histologie und konfokaler Mikroskopie analysiert.

## **3.4 Zellbiologische Methoden**

Alle zellbiologischen Methoden, bei denen die Kultivierung von Zellen erforderlich war, wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

### **3.4.1 Bestimmung der Zellzahl**

Die Zellzahl in einer vorgegeben Zellsuspension wurde mit einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Falls erforderlich wurde der Zählansatz mit PBS verdünnt. 10  $\mu$ l wurden anschließend unter das Deckgläschen der Neubauer-Zählkammer pipettiert und 4 x 16 Felder ausgezählt. Die Zellzahl pro ml ergibt sich aus folgender Formel: (gezählte Zellzahl/4) x Verdünnung x  $10^4$  (Kammerfaktor).

### **3.4.2 Herstellung von Einzelzellsuspensionen aus primären und sekundären lymphatischen Organen**

Um aus primären (Thymus) und sekundären lymphatischen Organen (Lymphknoten und Milz) eine Einzelzellsuspension zu gewinnen, wurden die Organe mit einem 10 ml Spritzenstempel durch ein Zellsieb (40  $\mu$ m) gerieben. Zwischendurch wurde mit PBS oder BSS/BSA gespült. Anschließend wurden die Zellen mit der jeweiligen Lösung aufgefüllt und zentrifugiert (1600 rpm, 5 Minuten, 4°C), der Überstand verworfen, resuspendiert und die Zellzahl bestimmt. Bei der Milz wurden zusätzlich

die Erythrozyten lysiert. Hierfür wurde das Zellpellet in TAC-Lösung (je nach Zellmenge 10 bis 50 ml) gelöst und für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Milzzellen zentrifugiert (1600 rpm, 5 Minuten, 4°C), der Überstand verworfen, je nach Anwendung in entsprechendem Medium resuspendiert und die Zellzahl bestimmt.

### **3.4.3 Aufreinigung von Zellen mittels eines Kalten Gradienten**

Bei der Neusynthese (vergleiche 3.4.4) oder nach einer Restimulation (vergleiche 3.4.5) enzephalitogener Zellen wurden diese von anderen Zellen (APCs etc.) mittels Dichtegradientenzentrifugation abgetrennt. Hierfür wurde das Zellsuspensionsgemisch bestehend aus enzephalitogenen Zellen und APCs zunächst zentrifugiert (1200 rpm, 10 Minuten, 4°C) und in 5 ml 4 °C kaltem Lymphoprep resuspendiert. Als nächstes wurden 2 ml EH-Medium überschichtet und der Gradient zentrifugiert (3000 rpm, 25 Minuten, 4°C, ohne Bremse). Anschließend wurde die Interphase, in welcher sich die enzephalitogenen T-Zellen befanden, abgenommen und nochmals mit EH-Medium gewaschen (1200 rpm, 10 Minuten, 4°C). Je nach Verwendungszweck wurde das Zellpellet im entsprechendem Medium resuspendiert.

### **3.4.4 Herstellung enzephalitogener T-Zellen**

Enzephalitogene T-Zellen wurden in Anlehnung an etablierte Protokolle hergestellt (Ben-Nun et al., 1981). 200 µl eines Gemisches aus 100 µg gpMBP und 100 µg CFA (Gemisch aus Mycobakterien (DIFCO) und IFA (Sigma)) wurden pro Ratte subkutan in die Fußsohlen injiziert (100 µl pro Fußsohle). Nach elf Tagen wurden die Tiere getötet und die poplitealen Lymphknoten entnommen. Diese wurden mit einem 10 ml Spritzenstempel durch ein Zellsieb gerieben und zwischendurch mit EH-Medium gespült. Anschließend wurden die Zellen zentrifugiert (1200 rpm, 10 Minuten, 4°C), in ReMed-Medium resuspendiert und die Zellzahl bestimmt. Pro Vertiefung einer 6-Wellplatte wurden  $2,5 \times 10^7$  Zellen in 5 ml ReMed-Medium in Anwesenheit von 10 µg/ml gpMBP im Brutschrank (5 % CO<sub>2</sub>, 37°C) für 48 h kultiviert. Anschließend wurden pro Vertiefung 1,5 ml TCGF-Medium hinzugefügt und für weitere 24 h

kultiviert. In diesen drei Tagen sollten sich enzephalitogene Zellen aufgrund der Antigenstimulation anreichern. Diese wurden von den anderen Zellen (überwiegend APCs) mittels eines Kalten Gradienten abgetrennt. Anschließend wird überprüft, ob sich die Zellen mittels gpMBP/APC restimulieren lassen (folgender Abschnitt).

Die Enzephalitogenität der neu synthetisierten Zellen wurde im Tierversuch ermittelt. Dafür wurde eine unterschiedliche Anzahl enzephalitogener Zellen in Lewis Ratten injiziert. Der beobachtete Krankheitsverlauf gab darüber Aufschluss, wie viele enzephalitogene Zellen man für das Erreichen eines bestimmten Krankheitsgrades benötigt.

### **3.4.5 Restimulation von enzephalitogenen T-Zellen**

Enzephalitogene T-Zellen müssen nach einer Kultivierung von drei Tagen stets restimuliert werden. Hierfür wurde einer Lewis Ratte der Thymus entnommen. Dieser wurde mit einem Spritzenstempel durch ein Zellsieb gerieben und zwischendurch mit EH-Medium gespült. Die Zellsuspension wurde zentrifugiert (1200 rpm, 10 Minuten, 4°C) und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde für 15 Minuten bei 30 Gray bestrahlt und danach in ReMed-Medium resuspendiert. In der Zwischenzeit wurden die enzephalitogenen Zellen ebenfalls abzentrifugiert (1200 rpm, 10 Minuten, 4°C) und in ReMed-Medium resuspendiert. Nach Bestimmung der Zellzahlen wurde eine Mischung aus Thymozyten und enzephalitogenen Zellen in einem Verhältnis von 50 : 1 ( $1,5 \times 10^8$  Thymozyten und  $3 \times 10^6$  enzephalitogene Zellen in 10 ml ReMed-Medium) in der Anwesenheit von 10 µg/ml gpMBP für 48 h kultiviert. Nach Zugabe von 3 ml TCGF-Medium und einer weiteren Kultivierung von 24 h trennt man die enzephalitogenen Zellen von den Thymozyten mittels eines Kalten Gradienten ab (siehe 3.4.3).

Diese Zellen wurden zur Induktion einer AT-EAE in Lewis Ratten injiziert oder zur Expansion in TCGF-Medium weiter kultiviert werden. Drei Tage nach weiterer Kultivierung wurde erneut stimuliert.

### 3.4.6 Kultivierung von Milzzellen zur Analyse der Zytokinproduktion

Um die Zytokinproduktion durch Milzzellen von JJ316 oder PBS behandelte Tiere *in vitro* analysieren zu können, wurden die Milzen an Tag 4 nach Krankheitsinduktion entnommen. Nach der Herstellung einer Einzelzellsuspension und Lyse der Erythrozyten wurden  $2 \times 10^6$  Milzzellen pro Vertiefung einer 48-Well-Platte in 1 ml X-vivo Medium in Duplikaten (BioWhittaker, Rockland, USA) für 24 h kultiviert. Die Zellen wurden entweder mit 10 µg/ml gpMBP oder 2 µg/ml Con A (Sigma) stimuliert bzw. blieben unbehandelt (Mediumkontrolle). Am Ende der Kultivierungszeit wurde der Mediumüberstand abgenommen und bis zur Zytokinanalyse bei -20°C eingefroren.

### 3.4.7 Plattenbeschichtung mit ShaMIg

Um T-Zellen mit dem superagonistischen Antikörper  $\alpha$ -CD28 JJ316 stimulieren zu können, muss dieser an den Boden der Zellkulturplatte gebunden sein. Nur so ist eine ausreichend starke Quervernetzung von CD28 möglich. Zunächst beschichtet man die Zellkulturplatte mit ShaMIg (Roche), einen Schafantikörper gegen Maus, der den in der Maus synthetisierten Antikörper JJ316 bindet. Hierfür wurde ShaMIg in einer Konzentration von 2,6 µg/ml in Coating Puffer gelöst. Davon wurden pro Vertiefung 200 µl (96-Well-Platte) bzw. 500 µl (12-Well-Platte) pipettiert und für 1 h bei 37°C inkubiert. Ebenso ist eine Inkubation über Nacht bei 4°C möglich. Anschließend wurde die ShaMIg-Lösung abgesaugt und die Vertiefungen 3 x mit 200 µl bzw. 500 µl BSS gewaschen. Ein Austrocknen der Vertiefungen ist zu vermeiden. Deshalb sollten die Zellen direkt nach dem letzten Mal Absaugen von BSS in die Vertiefungen pipettiert werden. Alternativ können die Platten vor der letzten Entfernung von BSS bei 4°C bis zum Gebrauch aufbewahrt werden.

### 3.4.8 Stimulation enzephalitogener Zellen mit JJ316

Um den Einfluss von JJ316 auf enzephalitogene Zellen zu untersuchen, wurden  $5 \times 10^5$  Zellen/Well in 1 ml RPMI-10 Medium in einer mit ShaMIG beschichteten 12-Well-Platte für 48 h in der An- bzw. Abwesenheit (Mediumkontrolle) von 5 µg/ml JJ316

kultiviert. Anschließend wurde die Expression von Chemokinen und Zytokinen untersucht. Die Konzentration von IFN- $\gamma$  im Mediumüberstand wurde mittels CBA analysiert. Weiterhin wurden IL-4, IL-10 sowie IFN- $\gamma$  auch intrazellulär in enzephalitogenen T-Zellen gemessen. Hierfür wurden die Zellen mit Phorbol 12-myristat 13-Acetat (PMA) (5 ng/ml) und Ionomycin (500 ng/ml) für 2 h, gefolgt von Golgi Plug, gemäß den Herstellerangaben (BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland) behandelt.

### 3.4.9 Proliferationsassay

In einem Proliferationsassay wird die Proliferation von Zellen durch den Einbau von radioaktiv markierten [ $^3\text{H}$ ]-Thymidin in die neu synthetisierte DNA gemessen. Je mehr [ $^3\text{H}$ ]-Thymidin eingebaut wird, d.h. je mehr Radioaktivität gemessen wird, desto stärker sind die Zellen proliferiert.

Um den Einfluss von JJ316 auf die Proliferation von enzephalitogenen T-Zellen zu ermitteln, wurden diese in An- und Abwesenheit des superagonistischen Antikörpers JJ316 kultiviert. Hierfür wurden  $2 \times 10^5$  enzephalitogene Zellen in 100  $\mu\text{l}$  RPMI-10 in die Vertiefungen einer mit ShaMlg beschichteten 96-Well-Platte pipettiert. In jeweils 3 Vertiefungen wurden entweder 100  $\mu\text{l}$  JJ316-Lösung (Endkonzentration 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) oder 100  $\mu\text{l}$  RPMI-10 hinzugefügt und für 72 h kultiviert (37°C, 5 %  $\text{CO}_2$ ). Die letzten 16 Stunden der Kultivierungszeit fanden in der Anwesenheit von 1,25  $\mu\text{Ci}$  [ $^3\text{H}$ ]-Thymidin (Amersham Biosciences) pro Vertiefung statt. Hierfür wurde [ $^3\text{H}$ ]-Thymidin in RPMI-10 gelöst und 25  $\mu\text{l}$  der Lösung pro Kavität der 96-Well-Platte pipettiert. Am Ende der Inkubationszeit wurden die Zellen mittels eines Zellerntegerätes (Beta-Plate-Harvester, Pharmacia) auf Glasfaserfilter geerntet, wobei Radioaktivität, d.h. [ $^3\text{H}$ ]-Thymidin, welches nicht in die neu synthetisierte DNA eingebaut worden war, gewaschen wurde. Nachdem die Glasfaserfilter getrocknet worden waren (30 Minuten, 60 °C), wurden sie in Folie eingeschweißt und 10 ml Szintillationsflüssigkeit (Perkin Elmer) hinzugefügt. Die Radioaktivität wurde mittels eines Beta-Counters (Perkin Elmer) gemessen.

### 3.4.10 Magnetische Zellsortierung (MACS)

Mit der magnetischen Zellsortierung können unterschiedliche Leukozytensubpopulationen von anderen Leukozyten abgetrennt werden. Hierbei werden Antikörper eingesetzt, an die magnetische Kügelchen (= beads) gekoppelt sind. Diese Antikörper binden entweder direkt an Zellepitope oder an Antikörper, die bereits an die Zellen gebunden haben. Mittels eines Magneten können die so markierten Zellen von den anderen abgetrennt werden. Hierfür wird die Zellsuspension auf eine Säule mit einer Matrix aus ferromagnetischen Stahlpartikeln aufgetragen. Da die Säule einem magnetischen Feld ausgesetzt ist, bleiben alle magnetisch markierten Zellen in ihr hängen, während alle übrigen ungehindert hindurch fließen können. Nach Aufhebung der magnetischen Wechselwirkungen können die magnetisch markierten Zellen eluiert werden. Je nach Anwendung kann entweder eine negative Depletion oder eine positive Selektion durchgeführt werden. Bei der negativen Depletion arbeitet man mit den unmarkierten und bei der positiven Selektion mit den markierten Zellen (Säuleneluat) weiter.

Alle hier durchgeführten Zellsortierungen wurden mit einem AutoMACS (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland) durchgeführt.

#### 3.4.10.1 Aufreinigung von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> (T<sub>con</sub>) und CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (T<sub>reg</sub>) Zellen

Zur Gewinnung von eGFP<sup>+</sup> Indikatorzellen (vergleiche 3.3.1) wurden eGFP-transgene 6 Wochen alte weibliche Lewis Ratten mit 1 mg JJ316 intravenös injiziert, um regulatorische T-Zellen *in vivo* anzureichern. Nach drei Tagen wurden die Lymphknoten entfernt und davon Einzelzellsuspensionen in BSS/BSA hergestellt.

Im ersten Anreicherungsschritt wurden B-Lymphozyten und CD8<sup>+</sup> T-Zellen negativ depletiert. Hierfür wurden  $3 \times 10^8$  Lymphknotenzellen in 1 ml BSS/BSA mit jeweils 150 µl anti-CD45RA und 150 µl anti-CD8 $\alpha$  beads (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland) inkubiert (20 Minuten, 4°C). Anschließend wurden die Zellen mit BSS/BSA gewaschen (1600 rpm, 5 Minuten, 4°C), in 1 ml BSS/BSA resuspendiert und nochmals über ein Zellsieb gegeben, um möglicherweise Verklumpungen zu beseitigen. B-Lymphozyten und CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurden von CD4<sup>+</sup>

T Lymphozyten durch ein AutoMACS Gerät (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland) mit dem Programm DepleteS abgetrennt.

Im nächsten Schritt wurden die so gewonnenen  $CD4^+$  T-Zellen in  $CD4^+CD25^-$  ( $T_{con}$ ) und  $CD4^+CD25^+$  ( $T_{reg}$ ) Zellen getrennt. Nach der negativen Depletion von B Lymphozyten und  $CD8^+$  T-Zellen mit dem AutoMACS wurden die  $CD4^+$  T-Zellen nochmals mit BSS/BSA gewaschen (1600 rpm, 5 Minuten,  $4^\circ C$ ), wieder in BSS/BSA resuspendiert und die Zellzahl bestimmt.  $1 \times 10^8$   $CD4^+$  T-Zellen in einem Volumen von 1 ml BSS/BSA wurden zunächst mit 10  $\mu l$  eines biotinierten anti-CD25 Antikörper (Klon OX39, BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland) inkubiert (20 Minuten,  $4^\circ C$ ). Danach wurden die Zellen mit BSS/BSA aufgefüllt und zentrifugiert (1600 rpm, 5 Minuten,  $4^\circ C$ ) und in 450  $\mu l$  BSS/BSA resuspendiert. Nach der Zugabe von 50  $\mu l$  Streptavidin-Beads wurden die Zellen für 20 Minuten bei  $4^\circ C$  inkubiert. Nach einem letzten Waschschrift (1600 rpm, 5 Minuten,  $4^\circ C$ ) wurden die Zellen in 1 ml BSS/BSA resuspendiert und über ein Zellsieb gegeben. Die Auftrennung von  $CD4^+CD25^-$  ( $T_{con}$ ) und  $CD4^+CD25^+$  ( $T_{reg}$ ) Zellen fand am AutoMACS mit dem Programm Possel\_D2 statt. Anschließend wurden die zwei Zellfraktionen mit PBS aufgefüllt, zentrifugiert (1600 rpm, 5 Minuten,  $4^\circ C$ ) und die Zellzahl bestimmt.

Die Reinheit von  $CD4^+CD25^-$  ( $T_{con}$ ) und  $CD4^+CD25^+$  ( $T_{reg}$ ) T Lymphozyten wurde mittels Durchflusszytometrie überprüft und lag durchschnittlich bei 95 %.

#### **3.4.10.2 Gewinnung von $CD4^+$ T-Zellen**

Für einige Kultivierungsansätze oder Analysen mit dem konfokalen Mikroskop war eine Aufreinigung von  $CD4^+$  T-Zellen aus Milz- oder Lymphknotenzellen erforderlich. Nach der Herstellung von Einzelzellsuspensionen wurde diese durch die negative Depletion von B Lymphozyten und  $CD8^+$  T-Zellen gewonnen. Hierbei wurde, wie bereits im vorangegangenen Paragraphen beschrieben, vorgegangen.

#### **3.4.10.3 Isolation von Antigenpräsentierenden Zellen (APCs)**

Antigenpräsentierende Zellen wurden aus der Milz einer Lewis Ratte mittels negativer Depletion von T-Zellen gewonnen

Zunächst wurde aus der Milz einer Lewis Ratte eine Einzelzellsuspension hergestellt, danach die Erythrozyten lysiert und die Zellzahl bestimmt. Als nächstes wurden  $3 \times 10^8$  Milzzellen in 900  $\mu$ l BSS/BSA gelöst und zur Markierung der T-Zellen 100  $\mu$ l pan T cell beads (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland) hinzugefügt. Die Zellen wurden 20 Minuten bei 4 °C inkubiert, anschließend mit BSS/ BSA gewaschen (1600 rpm, 5 Minuten, 4°C) und die antigenpräsentierenden Zellen von den T-Zellen mit dem Programm DepleteS am AutoMACS abgetrennt.

### **3.4.11 Isolation von mononukleären Leukozyten aus dem Rückenmark**

Mononukleäre Leukozyten wurden aus dem Rückenmark durch Dichtegradientenzentrifugation isoliert.

Als erstes wurde das Rückenmark mit einem Spritzenstempel in einem Eisendrahtsieb zerkleinert und in 20 ml Rückenmarkresuspensionspuffer (PBS, 0,1 % BSA, 1% Glukose, 100 $\mu$ g/ml DNaseI) gelöst. Danach wurde die Rückenmarksuspension zentrifugiert (1600 rpm, 10 Minuten, 4°C), der Überstand verworfen und das Pellet in 6 ml 30 % Percoll (Fluka) gelöst. In der Zwischenzeit wurde ein Percollgradient hergestellt. Alle Percollverdünungen wurden mit Percollverdüpfungspuffer (PBS, 0,1 % BSA, 1% Glucose) hergestellt. Zunächst wurden 4 ml 45 % Percoll in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen pipettiert und 2 ml 70 % Percoll mit einer 2 ml Spritze unterlegt. Zuletzt wurde die Rückenmarksuspension (circa 8 ml) vorsichtig mit einer 2 ml Spritze auf den Percollgradienten aufgetragen und zentrifugiert (2300 rpm, 20 Minuten, 4°C, ohne Bremse). Dabei setzt sich das Myelin oben auf dem Gradienten und die Leukozyten sammeln sich in den beiden Interphasen. Das Myelin wurde abgesaugt und die Leukozyten in den Interphasen mit einer 2 ml Spritze abgenommen. Diese wurden anschließend in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt, mit FACS-Puffer aufgefüllt und zentrifugiert (1600 rpm, 10 Minuten 4°C). Danach wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 10 ml FACS-Puffer resuspendiert. Um Klümpchen zu beseitigen, wurde die Zellsuspension über ein Zellsieb gegeben und zentrifugiert (1600 rpm, 10 Minuten 4°C). Anschließend wurde der Überstand verworfen, das Zellpellet in 1 ml PBS resuspendiert und die Zellzahl bestimmt.

### 3.4.12 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie oder auch fluoreszenzaktivierte Zellanalyse (FACS) beruht auf der Detektion von optischen Signalen, die von Zellen emittiert werden, wenn sie einen Laserstrahl passieren. Hierdurch erhält man Informationen über die Expression von intra- und extrazellulären Proteinen. Aber auch Analysen über den Zellzyklus, die Apoptose, den intrazellulären pH-Wert oder den Ionenfluss an Plasmamembranen sind möglich.

Im FACS-Gerät werden sich in Lösung befindende Zellen einzeln durch eine Kapillare gesaugt und durch einen Laserstrahl angestrahlt. Das von der Zelle ausgestrahlte Streulicht gibt dabei Aufschluss über die Morphologie der Zelle. Informationen über die Größe der Zelle liefert das Vorwärtsstreulicht (FSC), welches durch die Beugung des Lichtes verursacht wird. Als Maß für die Granularität der Zelle dient das durch die Brechung des Lichtes entstehende Seitwärtsstreulicht (SSC). Die Expression bestimmter Moleküle wird durch die Messung von Fluoreszenz ermittelt. Dies kann entweder direkt durch die Expression eines Fluoreszenzproteins z.B. eGFP oder indirekt nach der Bindung von mit Fluorochromen assoziierten Antikörpern an das zu untersuchende Molekül geschehen. Zu diesen Fluorochromen zählen z. B. Fluoreszeinisothiozyanat (FITC) oder Phycoerythrin (PE).

Alle FACS-Messungen wurden mit einem FACSCalibur (BD Biosciences, Heidelberg, Germany) durchgeführt und die Daten mit dem Programm CellQuest™ analysiert

#### 3.4.12.1 Extrazelluläre Färbungen

Alle aufgeführten Antikörper und Reagentien wurden bei BD Biosciences erworben: OX35APC (CD4), OX39bio (CD25), OX40bio (CD134), R73PE ( $\beta$ -TCR), AnnexinVCy5, SA-APC.

$2 \times 10^5 - 1 \times 10^6$  Zellen gelöst in 100  $\mu$ l FACS-Puffer wurden in ein FACS-Röhrchen pipettiert. Anschließend wurden die entsprechenden Antikörperkombinationen hinzugefügt, gevortext und für 20 Minuten bei 4°C im Dunklen inkubiert. Die erforderliche Antikörpermenge wurde vorher für jeden einzelnen Antikörper titriert. Alle Antikörperverdünnungen wurden in FACS-Puffer angesetzt und in einem Volumen von 20  $\mu$ l per Antikörper zu den Zellen hinzugefügt. Nach Ablauf der

Inkubationszeit wurden die Proben mit 4 ml FACS-Puffer aufgefüllt und zentrifugiert (1600 rpm, 5 Minuten, 4°C). Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 200 µl FACS-Puffer resuspendiert. Eine Ausnahme zu diesem Protokoll stellt die Färbung mit AnnexinV zur Ermittlung der Apoptoserate dar. Im Gegensatz zu den anderen extrazellulären Färbungen wurden 2 µl AnnexinV in 100 µl Annexinbindungspuffer gelöst und diese Mischung zu den Zellen gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 15 Minuten bei Raumtemperatur im Dunklen wurde die Messung am FACS-Gerät direkt ohne einen weiteren Waschschrift durchgeführt. Bei einer sehr hohen Zellkonzentration (über  $4 \times 10^5$  Zellen) wurde vorher noch 100 – 200 µl Annexinbindungspuffer hinzugefügt.

Biotingekoppelte Antikörper können nicht am FACS-Gerät detektiert werden, da sie kein Fluorochrom enthalten. Ermöglicht wird dies aber nach einer weiteren Inkubation mit Fluorochromassozierten Streptavidin, welches an Biotin bindet. Nach der Markierung von Zellen mit biotingekoppelten Antikörpern, wurden daher in einem weiteren Schritt 20 µl der jeweiligen Streptavidinlösung hinzugefügt und nochmals inkubiert (20 Minuten, 4°C, im Dunklen). Nach einem letzten Waschschrift konnten dann die Proben direkt am FACS-Gerät analysiert werden.

#### **3.4.12.2 Intrazelluläre Färbungen**

Nach der Färbung von extrazellulären Molekülen wurde bei einigen Ansätzen eine intrazelluläre Färbung durchgeführt. Für den intrazellulären Nachweis von IFN- $\gamma$  (DB-1), IL-4 (OX81), IL-10 (A5-4) und FoxP3 (FJK-16s) wurde das Kit von eBioscience verwendet und dem darin enthaltenden Färbeprotokoll gefolgt. Alle Zytokinantikörper wurden bei BD Biosciences und der FoxP3-Antikörper bei eBioscience erworben.

Nach der abgeschlossenen extrazellulären Färbung (vergleiche 3.4.12.1) wurden die Zellen zunächst fixiert. Hierfür wurde 1 ml der Perm/Fix-Lösung (eBioscience, San Diego, USA) hinzugefügt und 30 Minuten im Dunklen bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen (1600 rpm, 5 Minuten, 4°C) und mit Permeabilisierungspuffer (eBioscience, San Diego, USA) behandelt. Hierfür wurden 2 ml Permeabilisierungspuffer in die FACS-Röhrchen pipettiert, gevortext, zentrifugiert (1600 rpm, 5 Minuten, 4°C) und der Überstand verworfen. Der letzte Schritt wurde nochmals wiederholt und anschließend unspezifische Bindungen durch die Zugabe von 20 µl Rattenserum (Endkonzentration 2 %) blockiert (15 Minuten, 4°C). Als

nächstes wurden 20 µl Zytokin- oder FoxP3-Antikörper hinzugefügt und für weitere 30 Minuten im Dunklen bei 4°C inkubiert. Zuletzt wurden die Zellen nochmals mit Permeabilisierungspuffer und FACS-Puffer gewaschen (1600 rpm, 5 Minuten, 4°C) und anschließend am FACS analysiert.

Die intrazelluläre Färbung von aktiver Caspase-3 wurde entsprechend den Vorschriften des Kits von BD Biosciences durchgeführt. Nach der extrazellulären Färbung wurden  $1 \times 10^6$  Zellen mit 500 µl Cytotfix/Cytoperm™ (BD Biosciences) fixiert (20 Minuten, im Dunklen, auf Eis) und zentrifugiert (1600 rpm, 5 Minuten, 4°C). Nach Absaugen des Überstandes wurden die Zellen zweimal mit 500 µl Perm/Wash™ Puffer (BD Biosciences) gewaschen und permeabilisiert (1600 rpm, 5 Minuten, 4°C). Danach wurden die Zellen in 100 µl Perm/Wash™ Puffer resuspendiert, 20 µl Caspase-3 Antikörper hinzugefügt (C92-605) (BD Biosciences) und für 30 Minuten bei Raumtemperatur im Dunklen inkubiert. Nach einem letzten Waschschrift mit Perm/Wash™ Puffer wurden die Zellen in 200 µl FACS-Puffer resuspendiert und am FACS-Gerät gemessen.

### 3.4.13 Zytokinassay

Alle Messungen von Zytokinen in Zellüberständen wurden mit dem Cytokine Bead Array (CBA) von BD Biosciences durchgeführt. Das Prinzip des CBA beruht auf der Bindung von Antikörpern an Zytokine in Zellüberständen oder Seren. Allerdings sind an diese Antikörper nicht Fluorochrome wie FITC oder PE, sondern beads mit einer definierten Fluoreszenzintensität gekoppelt. Die einzelnen Beadpopulationen lassen sich in den FL3- und FL4-Kanälen des BD FACSCalibur voneinander trennen und somit unterscheiden. Jeder einzelnen Beadsubpopulation ist eine individuelle alphanumerische Bezeichnung in einer Art Gitternetz zugeordnet, die ihre Position relativ zu den anderen beads angibt und auch von ihnen unterscheidet.

Der CBA wurde nach der Gebrauchsanleitung aus dem CBA-Kit (BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland) durchgeführt.

Zunächst wurde eine Verdünnungsreihe mit dem im Kit enthaltenden Standardproben angesetzt, um später an Hand einer Standardkurve die Konzentration in den zu messenden Proben quantifizieren zu können.

50 µl einer Mischung aus Beads gegen IL-4, IL-10 und IFN- $\gamma$ , im Kit als Capture beads bezeichnet, wurden in FACS-Röhrchen vorgelegt. Anschließend wurden

entweder 50 µl des Standards oder einer zu untersuchenden Probe zu den beads hinzugefügt. Falls erforderlich wurden die Proben vorher verdünnt. Anschließend wurden die Proben durch Auf- und Abpipettieren vorsichtig gemischt und 1 h bei Raumtemperatur im Dunklen inkubiert. Als nächstes wurden 50 µl des PE-Detektionsreagens hinzugegeben, durch Auf- und Abpipettieren gemischt und für weitere 2 h bei Raumtemperatur im Dunklen inkubiert. Danach wurde 1 ml Waschpuffer zu jeder Probe pipettiert und 5 Minuten bei 1400 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, das Pellet in 150 µl Waschpuffer resuspendiert und die Proben am FACS-Gerät gemessen. Die Quantifizierung der Zytokinkonzentrationen erfolgte mit der FCAP Array Software (Soft Flow).

### **3.4.14 Konfokale Mikroskopie**

Alle Untersuchungen am konfokalen Mikroskop wurden von Frau Dr. Nora Müller durchgeführt. Im Folgenden folgt eine kurze Beschreibung der Vorgehensweise.

#### **3.4.14.1 CXCR-3**

CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurden auf Poly-L-Lysin beschichtete Kammerslides adhärirt, mit 3,7 % PFA fixiert und mit 0,1 % Triton permeabilisiert. Nach einer Blockierung mit 5 % BSA, wurden die Zellen mit einem anti-GFP (Abcam, Cambridge, UK) und einen anti-CXCR-3 (Klon 17, Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland) Antikörper über Nacht bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden die Proben mit Sekundärantikörpern für 45 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert (ein Alexa594-konjugierter anti-goat Antikörper zur Detektion von CXCR-3 und ein Alexa488-konjugierter anti-rabbit Antikörper zur Detektion von eGFP, beide erworben bei Molecular Probes, Karlsruhe, Deutschland).

#### **3.4.14.2 F-Aktin**

Für die Analyse von F-Aktin wurden die Zellen nach Blockierung mit 5 % BSA mit Alexa488-konjugiertem Phalloidin (Molecular Probes) für 20 Minuten bei

Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen, die Slides mit Fluoromount-G Mounting Medium (Southern Biotech) eingedeckt um am konfokalen Mikroskop analysiert.

#### **3.4.14.3 Tubulin**

Zur Visualisierung von Tubulinstrukturen wurden die Zellen mit PHEMO-Fix (3,7% Paraformaldehyd, 0,05% Glutaraldehyd, 0,5% Triton-X100 in PHEMO Puffer) für 10 Minuten bei 37°C fixiert, mit PHEMO Puffer (68 mM Pipes, 25 mM HEPES, pH 6,9, 15 mM EGTA, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 10% DMSO) zweimal bei 37°C gewaschen. Nach einem zusätzlichen Waschschrift mit 50 mM NH<sub>4</sub>Cl und PBS wurden die Zellen mit einem anti-β-Tubulin Antikörper angefärbt (TUB2.1) (Sigma).

#### **3.4.14.4 Konfokale Mikroskopie**

Die Analyse der Proben erfolgte mit einem Zeiss LSM510 konfokalen Mikroskop mit einem 63x Öbobjektiv (NA 1.4). Zur Anregung wurden Laserstrahlen von 488 und 543 nm verwendet und 150 – 200 eGFP<sup>+</sup> T-Zellen pro Probe analysiert. Die Akquirierung und Quantifizierung der Fluoreszenzintensität wurde mit der Zeiss LSM510 Software 3.2 durchgeführt.

#### **3.4.15 Rasterelektronenmikroskopie**

Enzephalitogene T Zellen wurde auf Poly-L-Lysin beschichtete Deckgläschen (12 mm) in einer 24-Well-Platte aufgetragen, für zunächst 10 Minuten bei Raumtemperatur mit 6,25 % Glutaraldehyd in 50 mM Phosphatpuffer (pH 7,2) und anschließend über Nacht bei 4°C fixiert. Nachdem die Zellen mit einem Phosphatpuffer gewaschen worden waren, wurden sie schrittweise mit Aceton bis zum kritischen Punkt getrocknet und mit Platin/Paladium besprüht. Anschließend wurden sie mit einem Zeiss DSM 962 Rasterelektronenmikroskop analysiert.

### 3.5 Histologie und Immunzytochemie

Alle histologischen Untersuchungen wurden von Sabrina Kirch und PD Dr. Andreas Weishaupt durchgeführt. Im Anschluss erfolgt eine kurze Beschreibung der Vorgehensweise.

Gewebestücke vom zervikalen Ende des Rückenmarks wurden in Paraffin eingebettet. 5 µm dicke Querschnitte wurden auf Poly-L-Lysin-beschichtete Objektträger aufgebracht, deparaffinisiert und entwässert. Für die Albumin-Färbung war eine Vorbehandlung mit Hydroxylamin (0,9%, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) notwendig. Zur Detektion von pan-T-Zellen wurden die Schnitte mit dem monoklonalen Antikörper B115-1 (Holland Biotechnology, Leiden, Niederlande) und zur Analyse von Makrophagen mit ED-1 (Serotec, Düsseldorf, Deutschland) inkubiert. Um die Integrität der Bluthirnschranke zu untersuchen, wurde ein Anti-Albumin-Antikörper verwendet. Diese primären Antikörper wurden mit dem ABC-System (Dako, Hamburg, Deutschland) visualisiert, wobei New Fuchsin als Alkalinphosphatasesubstrat und 3,3'-Diaminobenzidin als Peroxidasesubstrat dienten. Die Integrität der Bluthirnschranke wurde durch Messung der Graustufen mit einem Computerprogramm (Scion Image Software, Scioncorp., MD) mit einem Axiovert 100 Mikroskop (Zeiss, Göttingen, Deutschland) und einer CCDDXC 950P Kamera (Sony, Köln, Deutschland) quantifiziert.

Zur Analyse von Apoptose wurde in situ tailing (IST) bei Paraffinschnitten durchgeführt. Rückenmarkquerschnitte wurden für 1 h mit 50 µl eines Reaktionsgemisches inkubiert, in dem 1 µl Dioxigenin-markierte Nukleotide (Dig DNA Labeling Mischung; Roche, Mannheim, Deutschland) und 12 U Terminale Transferase (Promega, Heidelberg, Deutschland) enthalten waren. Die Reaktion wurde mit 0,5 M EDTA gestoppt und die Schnitte anschließend für 1 h mit einem Alkalinphosphatase-markierten Antikörper (Roche) inkubiert. Die Farbreaktion wurde mit Alkalinphosphatasehistochemie und NBT/BCIP (Roche) als Chromogen visualisiert. Im Anschluss wurde eine pan-T-Zellfärbung wie im oberen Abschnitt beschrieben durchgeführt.

## 3.6 Molekularbiologische Methoden

### 3.6.1 Isolation von RNA

1 ml Trizol (Invitrogen) wurde entweder zu  $5 \times 10^6 - 1 \times 10^7$  Zellen oder zu circa 100 mg Gewebe pipettiert. Anschließend wurden die Zellen mit einer Spritze und Gewebestücke mit einem Gewebehomogenisierer (Ultra Turrax T 18 basic, IKA, USA) homogenisiert und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Als nächstes wurden 200  $\mu$ l Chloroform hinzugefügt, 15 s gevortext und zentrifugiert (15 Minuten, 3500 rpm, 4°C). Die obere farblose Phase, in der sich die DNA und die RNA befanden, wurde in ein neues Reaktionsgefäß pipettiert und 500  $\mu$ l Isopropanol dazugegeben. Nach einer zehnmütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurde die RNA mittels Zentrifugation präzipitiert (10 Minuten, 14000 rpm, 4 °C). Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet mit 1 ml 70 % Ethanol (hergestellt mit DEPC-Wasser) gewaschen und zentrifugiert (5 Minuten, 14000 rpm, 4 °C). Nach Absaugen des Überstandes wurde das Pellet getrocknet und anschließend in 89  $\mu$ l DEPC-Wasser gelöst. Als nächstes wurden 10  $\mu$ l 10 x DNase I- Puffer und 1  $\mu$ l DNase I (Roche) hinzugefügt und 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Aufreinigung der RNA erfolgte mit dem RNeasy Mini Kit (Quiagen, Hilden, Deutschland). Pro 1 ml RLT (Kitkomponente) wurden 10  $\mu$ l  $\beta$ -Mercaptoethanol hinzugefügt. Davon wurden 350  $\mu$ l und 250  $\mu$ l absoluter Ethanol zur Probe gegeben und vorsichtig mit der Pipette gemischt. Als nächstes wurde dieser Ansatz auf eine RNeasy Säule pipettiert und zentrifugiert (20 Sekunden, 4°C, 14000 rpm). Das Eluat wurde nochmals auf die Säule aufgetragen, zentrifugiert (20 Sekunden, 4°C, 14000 rpm) und dann verworfen. Die Säule wurde in ein neues Reaktionsgefäß gesteckt und zweimal mit 500 $\mu$ l RPE Puffer (Kitkomponente) gewaschen (20 Sekunden, 4°C, 14000 rpm), welcher nach jedem Zentrifugationsschritt verworfen wurde. Zum Schluss wurde die RNA mit DEPC-Wasser eluiert. Dafür wurden 15 – 30  $\mu$ l DEPC-Wasser auf die Säulenmatrix aufgetragen, für 1 Minute inkubiert und danach zentrifugiert (20 Sekunden, 4°C, 14000 rpm). Die RNA-Konzentration und Reinheit wurde durch die Absorption bei 260 und 280 nm ermittelt. Die Konzentration wurde mit folgender Formel quantifiziert:  $\text{RNA ng}/\mu\text{l} = \text{OD}_{260\text{nm}} \times \text{Verdünnung} \times 40$  (Eine  $\text{OD}_{260\text{nm}} = 1$  entspricht 40 ng/ $\mu$ l RNA) und die Reinheit durch den Quotienten aus der  $\text{OD}_{260\text{nm}}$  und  $\text{OD}_{280}$  überprüft, welcher durchschnittlich bei 1,7 lag.

### 3.6.2 Umschreiben von mRNA in cDNA

Für das Umschreiben von mRNA in cDNA macht man sich zu Nutze, dass eukaryotische mRNA durch einen polyA-Schwanz am 3'-Ende gekennzeichnet ist. Als Primer kann man daher oligodT-Nukleotide verwenden, die an den polyA-Schwanz binden. Danach kann die mRNA durch das Enzym Reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben werden.

Für das Umschreiben von mRNA in cDNA wurden alle Bestandteile bis auf den oligodT-Primer (Promega) bei Invitrogen erworben.

Der Ansatz bestand aus folgenden Komponenten:

1 µg Gesamt-RNA	x µl
500 ng oligodT-Primer	1 µl
0,5 mM dNTPs	2 µl aus 5 mM dNTPs
10 mM DTT	2 µl aus 0.1 M DTT
5 x First strand Puffer	4 µl
200 U Reverse Transkriptase	1 µl
Wasser	x µl ad 20 µl Endvolumen

Bis auf die Reverse Transkriptase wurden alle Komponenten vereinigt und in einen Thermocycler (Eppendorf) gestellt, mit der die cDNA durch folgendes Programm synthetisiert wurde: 5 Minuten 65°C (Bindung des Primers), 90 Minuten 42°C (cDNA-Synthese durch die Reverse Transkriptase) und 75°C (Inaktivierung der Reversen Transkriptase). Die Reverse Transkriptase wurde nach den ersten beiden abgelaufenen Minuten des 42°C Zyklus hinzugefügt.

### 3.6.3 Quantifizierung von mRNA-Transkripten mittels Real-Time PCR

Das allgemeine Prinzip der Polymerasekettenreaktion (PCR) beruht auf der Vervielfältigung eines bestimmten DNA-Abschnittes zwischen zwei vorgegebenen Primern durch eine hitzestabile DNA-abhängige DNA-Polymerase. Zunächst wird die doppelsträngige DNA bei 94 – 96 °C in Einzelstrang-DNA denaturiert. Danach erfolgt die Anlagerung der Primer bei einer für jeden Primer spezifischen Temperatur,

die sich u. a. aus der Basenzusammensetzung ergibt. Mit folgender Formel lässt sich die benötigte Temperatur berechnen:  $T = n(\text{Purinnukleotide}) \times 2 + n(\text{Pyrimidinukleotide}) \times 4$ . Nach Anlagerung der Primer erfolgt bei 72°C ihre Verlängerung nach Vorgabe der DNA-Matrize durch die thermostabile DNA-Polymerase. Diese drei Abläufe werden mehrmals hintereinander, meistens 30 – 40 Zyklen, wiederholt, wodurch eine Vervielfältigung des gewünschten DNA-Abschnittes erreicht wird.

Mit Hilfe der Real-Time PCR kann die Menge an mRNA quantifiziert werden, wobei die Menge an mRNA-Transkripten mit der Höhe an PCR-Produkt korreliert. D. h. je höher die Anzahl an cDNA-Matrizen in einer Probe ist desto mehr amplifizierte DNA erhält man. Die Quantifizierung erfolgte durch die Verwendung von SYBR I, ein Farbstoff, der nur an doppelsträngige DNA bindet. Der daraus resultierende DNA-Fluoreszenzfarbstoff-Komplex emittiert Licht bei 522 nm. Die gemessene Fluoreszenz korreliert mit der Menge an doppelsträngiger DNA, d.h. je mehr doppelsträngige DNA (PCR-Produkt) vorhanden ist, desto mehr SYBR I kann binden und umso höher ist die gemessene Fluoreszenz.

Die Kopienzahl eines Genes wird durch die Verwendung eines Genstandards mit bekannter Kopienzahl quantifiziert. Die relative Menge des zu untersuchenden Gens wird bestimmt, indem man den Quotienten aus der Anzahl an Transkripten des zu untersuchenden Gens und der eines Haushaltsgenes bildet, dessen Kopienzahl unbeeinflusst sein sollte.

Folgende Primer wurden bei Metabion erworben und für die Real-Time PCR verwendet:

### **ICAM-1**

sense	5'-CACCTATTACCGCCAGAGGA-3'
antisense	5'-GAGGTGGGTGAGGGGTAAAT-3'

### **IP-10**

sense	5'-GCTTATTGAAAGCGGTGAGC-3'
antisense	5'-GGGTAAAGGGAGGTGGAGAG-3'

**VCAM-1**

sense 5'-TGACATCTCCCCTGGATCTC-3'  
 antisense 5'-CCATTGAGGGGACTGTCTGT-3'

**Ratte Aktin**

sense 5'-AGCCATGTACGTAGCCATCCAGGCT-3'  
 antisense 5'-CTCTCAGCTGTGGTGGTGAAGCTGT-3'

**Mensch Aktin**

sense 5'-TGACGGGGTCACCCACACTGTGCCCATCTA-3'  
 antisense 5'-TGACGGGGTCACCCACACTGTGCCCATCTA-3'

Der Ansatz für die Real-Time PCR bestand aus folgenden Komponenten:

100 – 300 ng Gesamt-RNA	x µl
0,4 pM Primer (Mischung aus sense und antisense)	1 µl aus 10 pM
2 x SYBR Green(AbGene) (Reaktionsgemisch inklusive Taq Polymerase und Nukleotide)	12,5 µl
Wasser	x µl ad 25 µl Endvolumen

Alle Proben wurden als Duplikate in einer speziellen 96-Wellplatte für Real-Time PCR (AbGene) angesetzt. Als Haushaltsgen wurde bei jeder PCR die Expression von Rattenaktin verwendet. Zur Erstellung der Standardkurve dienten definierte Kopienanzahlen an humanem Aktin. Die Amplifikation wurde mit einer Real-Time PCR Maschine (iCycler, Biorad) durchgeführt. Das Programm für die Real-Time PCR bestand wie eine normale PCR aus mehreren Wiederholungen von DNA-Denaturierung, Primeranlagerung und Elongation. Allerdings war zusätzlich vor der eigentlichen PCR eine 15-minütige Aktivierung der Enzyme bei 95°C nötig. Ebenso fand am Ende eine Überprüfung der Schmelzkurve durch eine langsame Erhöhung der Temperatur auf 100°C statt, um unspezifische Bindungen von SYBR I auszuschließen.

Folgendes Programm wurde daher für die Amplifikation gewählt.

**Tab. 3-1: Programm zur Quantifizierung von RNA-Transkripten mittels Real-Time PCR**

Zweck	Wiederholung	Dauer	Temperatur °C
<b>A Enzymaktivierung</b>	1	14 min	95
<b>B Amplifikation</b>	50		
Denaturierung		30 s	95
Primeranlagerung		30 s	58 – 64 °C
Elongation		30 s	72 °C
<b>C Denaturierung der Gesamt-DNA</b>		30 s	95 °C
<b>D Hybridisierung</b>		30 s	55 °C
<b>E Test der Schmelzkurve</b>	45	10 s	Erhöhung der Temperatur um 1 °C pro Zyklus

Die relative mRNA-Menge eines Gens wurde ermittelt, indem die Kopienzahl an Transkripten des zu untersuchenden Gens durch die Anzahl an Rattenaktintranskripten (Haushaltsgen) dividiert wurde.

### 3.7 Statistik

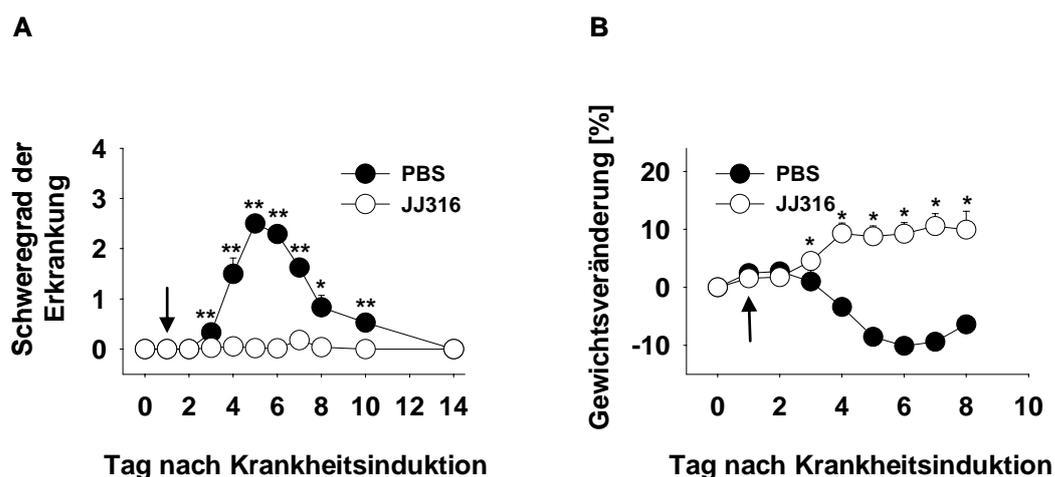
Alle statistischen Analysen wurden mit STATISTICA 6.0 (Statsoft GmbH) durchgeführt. Alle Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler angegeben. Zum Vergleich von zwei unabhängigen Stichproben wurde ein Mann-Whitney U-Test durchgeführt. Die Analyse auf Unterschiede mehrerer unabhängiger Stichproben erfolgte mit einer einfaktoriellen ANOVA mit dem Tukey HSD Test als post-hoc Test.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Aktivierung und Expansion von regulatorischen T-Zellen mittels des superagonistischen Antikörpers JJ316

Kürzlich wurde gezeigt, dass nach der Verabreichung des superagonistischen Antikörpers JJ316 der Krankheitsverlauf einer AT-EAE durch die Aktivierung und Expansion von regulatorischen T-Zellen verbessert wird (Beyersdorf et al., 2005). Bis heute ist aber sowohl der Wirkungsort als auch der Suppressionsmechanismus regulatorischer T-Zellen nur unzureichend aufgeklärt. Um dies zu untersuchen, wurde eine AT-EAE durch den Transfer eGFP<sup>+</sup> enzephalitogener T-Zellen induziert und die Tiere entweder mit 1 mg JJ316 oder PBS behandelt. An den darauf folgenden Tagen wurden die Tiere getötet, die sekundären lymphatischen Organe sowie das Rückenmark entnommen und die Häufigkeit und der Phänotyp enzephalitogener und regulatorischer T-Zellen analysiert.

#### 4.1.1 JJ316 verhindert die Infiltration des Rückenmarks durch enzephalitogene T-Zellen

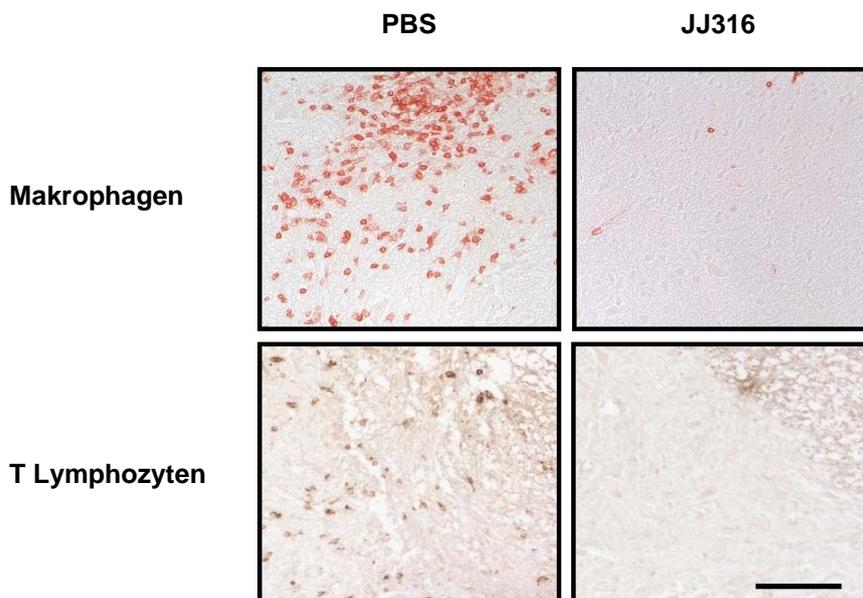


**Abb. 4-1 Krankheitsverlauf nach einer prophylaktischen Behandlung mit JJ316.** Eine AT-EAE wurde durch den Transfer eGFP<sup>+</sup> enzephalitogener T-Zellen induziert und die Tiere einen Tag später mit 1 mg JJ316 oder PBS behandelt (angedeutet durch den Pfeil). Dargestellt sind **A** der Schweregrad der Erkrankung und **B** die Gewichtsveränderung während der AT-EAE. n = 10 - 12 pro Gruppe. Die

Daten von zwei unabhängigen Experimenten wurden zusammengefasst. Statistik: Mann Whitney U Test; \*  $P \leq 0,05$ ; \*\*  $P \leq 0,01$ .

PBS behandelte Tiere wiesen den typischen Krankheitsverlauf einer monophasischen AT-EAE in weiblichen Lewis Ratten auf. Erste Krankheitssymptome traten an Tag 3 nach der Krankheitsinduktion auf, erreichten zwischen Tag 5 und 6 ihr Maximum und klangen danach wieder ab (**Abb. 4-1 A**). Parallel äußerte sich die Erkrankung in einer kontinuierlichen Abnahme des Körpergewichtes (**Abb. 4-1 B**). Ein anderes Bild zeigte sich hingegen bei mit JJ316 behandelten Tieren. Während des gesamten Beobachtungszeitraums traten keinerlei Lähmungserscheinungen oder ein Gewichtsverlust auf. Die geringe Zunahme des Körpergewichtes ist darauf zurückzuführen, dass die jungen Ratten noch nicht ausgewachsen waren.

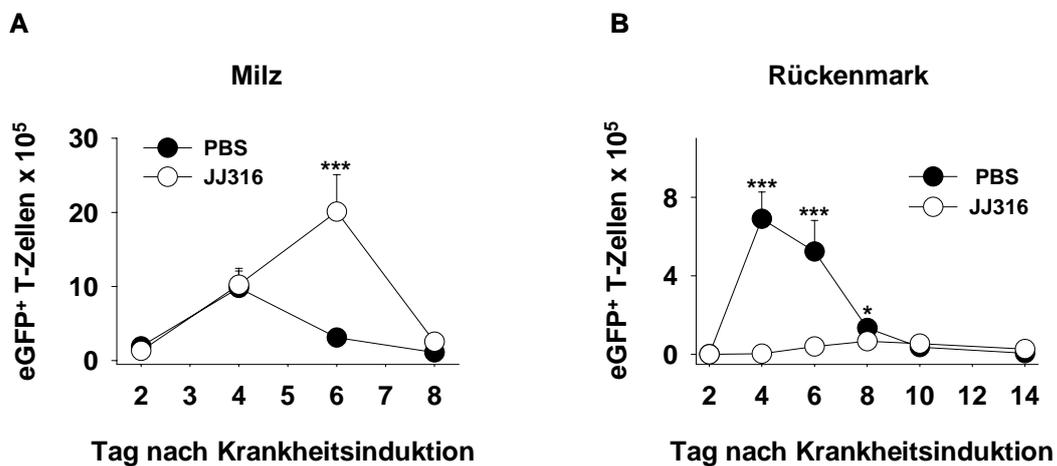
Um zu ermitteln, weshalb die JJ316 Behandlung das Auftreten klinischer EAE Symptome verhindert, wurde als nächstes die Infiltration des Rückenmarks durch T Lymphozyten und Makrophagen untersucht.



**Abb. 4-2 Leukozyteninfiltration des Rückenmarks.** An Tag 4 der Erkrankung wurde der zervikale Abschnitt des Rückenmarkes immunhistochemisch auf die Anwesenheit von T Lymphozyten und Makrophagen in der weißen und grauen Substanz untersucht. Dargestellt ist das Ergebnis jeweils eines aus 11 Tieren. Balken = 100  $\mu\text{m}$ .

An Tag 4 nach der Krankheitsinduktion wies das Rückenmark PBS behandelter Tiere eine starke Infiltration durch T Lymphozyten und Makrophagen auf (**Abb. 4-2**). Nach einer Verabreichung von JJ316 hingegen sind nur einige wenige dieser Leukozyten

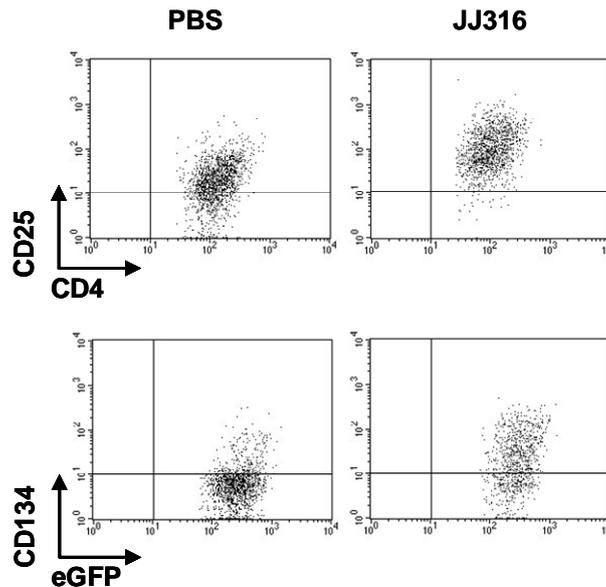
zu erkennen. Die Abwesenheit von T-Zellen und Makrophagen im Rückenmark JJ316 injizierter Tiere könnte eine Erklärung für das Ausbleiben von EAE Symptomen sein. Daher wurde als nächstes die Anzahl enzephalitogener T-Zellen im Rückenmark und der Milz mittels Durchflusszytometrie analysiert.



**Abb. 4-3 Infiltration der Milz und des Rückenmarks durch enzephalitogene T-Zellen.** Die absolute Zahl an eGFP<sup>+</sup> enzephalitogenen T-Zellen **A** in der Milz und **B** im Rückenmark wurde an Hand der Prozentsätze unter allen lebenden Leukozyten (Bestimmung mittels Durchflusszytometrie) und der Gesamtzellzahl im jeweiligen Organ ermittelt. Dies fand an mehreren aufeinander folgenden Zeitpunkten nach der Verabreichung von PBS oder JJ316 statt. n = 6 – 11 pro Gruppe. Die Daten von drei unabhängigen Experimenten wurden zusammengefasst. Statistik: Mann Whitney U Test; \*  $P \leq 0,05$ ; \*\*\*  $P \leq 0,001$ .

In Übereinstimmung mit vorangegangenen Studien (Flügel et al., 2001) begann die Infiltration des Rückenmarks durch enzephalitogene T-Zellen in PBS behandelten Tieren an Tag 3 der Erkrankung und erreichte ihren Höhenpunkt zwischen Tag 4 und 5. Danach nahm die Zellzahl kontinuierlich ab und war an Tag 8 kaum mehr detektierbar (**Abb. 4-3 A und B**). In JJ316 injizierten Tieren hingegen stellt sich die Situation völlig anders dar. Nur wenige enzephalitogene T-Zellen infiltrierten hier das Rückenmark, wohingegen der größte Anteil in der Milz akkumuliert (**Abb. 4-3 A und B**). Nur zum Krankheitsende hin (Tag 6) nahm die Anzahl enzephalitogener T-Zellen im Rückenmark geringfügig zu.

Um zu analysieren, ob die JJ316 Behandlung den Aktivierungsstatus der enzephalitogenen T-Zellen reduziert und dadurch deren Fähigkeit in das Rückenmark zu migrieren inhibiert, wurde die Expression der beiden Aktivierungsmarker CD25 und CD134 auf enzephalitogenen T-Zellen untersucht.



**Abb. 4-4 Expression von Aktivierungsmarkern auf enzephalitogenen T-Zellen.** Milzzellen wurden an Tag 4 der Erkrankung isoliert und für CD4/CD25 bzw. CD134 gefärbt. Die abgebildeten Zellen umfassen ausschließlich eGFP<sup>+</sup> T-Zellen. Es ist ein repräsentatives Beispiel dargestellt. n = 6

Obwohl die Fähigkeit enzephalitogener T-Zellen zur Infiltration des Rückenmarkes nach einer JJ316 Behandlung stark reduziert ist, resultiert dies nicht aus ihrer fehlenden Aktivierung. Im Gegenteil, die Expression der Aktivierungsmarker CD25 und CD134 ist sogar erhöht (**Abb. 4-4**).

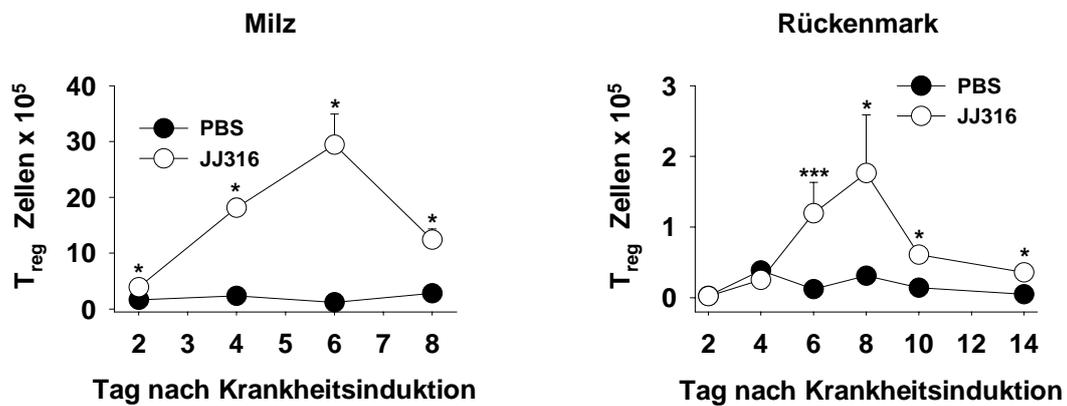
Zusammenfassend lässt sich daher feststellen, dass die prophylaktische Verabreichung von JJ316 ein Ausbrechen von EAE Symptomen dadurch verhindert, dass die Infiltration des Rückenmarks durch enzephalitogene T-Zellen trotz deren Aktivierung inhibiert ist.

#### 4.1.2 Expansion und späte Infiltration des Rückenmarks durch regulatorische T-Zellen nach JJ316 Behandlung

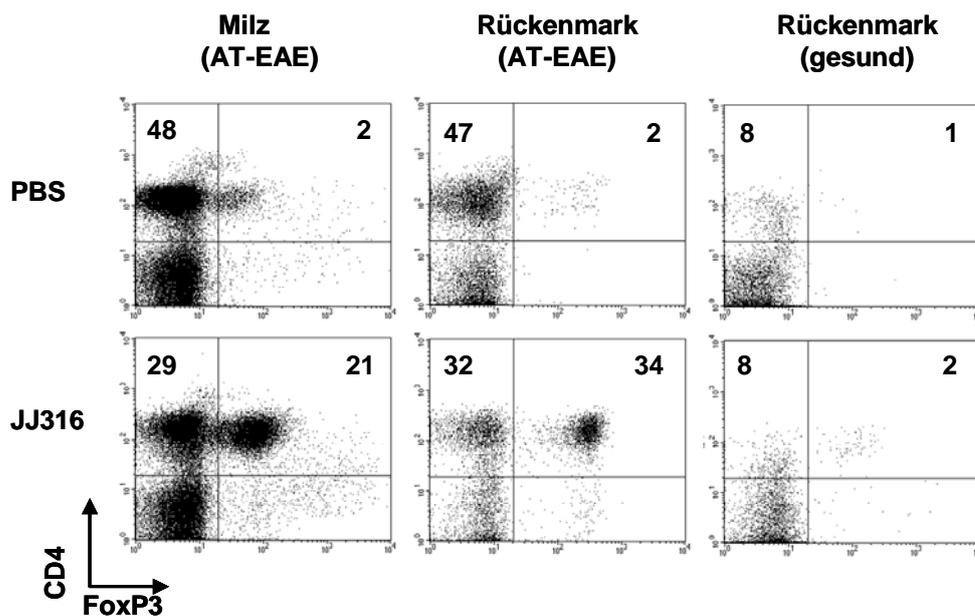
Als nächstes stellte sich die Frage, wie JJ316 die Infiltration des ZNS durch enzephalitogene T-Zellen verhindert. Bereits in früheren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass regulatorische T-Zellen nach Injektion von JJ316 aktiviert sowie expandiert werden (Lin et al., 2003) und dadurch der Krankheitsverlauf einer EAE verbessert wird (Beyersdorf et al., 2005). Jedoch in welchem Organ die Inhibierung enzephalitogener T-Zellen statt fand, war bis zu diesem Zeitpunkt noch nicht geklärt. Um diese Frage zu beantworten, wurde die Häufigkeit regulatorischer T-Zellen in

sekundären lymphatischen Organen und dem Rückenmark mittels Durchflusszytometrie an Hand der Expression von CD4 und FoxP3 während einer AT-EAE nach der prophylaktischen Verabreichung von PBS und JJ316 ermittelt.

**A**



**B**



**Abb. 4-5 Expansion und Migration regulatorischer T-Zellen nach prophylaktischer Verabreichung von PBS oder JJ316.** Eine AT-EAE wurde durch den adoptiven Transfer eGFP<sup>+</sup> enzephalitogener T-Zellen induziert, während in der anderen Gruppe den Tieren keine Zellen injiziert wurden (gesunde Kontrollgruppe). Einen Tag später erfolgte die Injektion von PBS oder JJ316. **A** An den darauf folgenden Tagen wurde die Anzahl regulatorischer T-Zellen in der Milz (n = 3 pro Gruppe) und im Rückenmark (n = 11 pro Gruppe) mittels der Expression von CD4 und FoxP3 bestimmt. Die absolute Zellzahl wurde an Hand der Prozentsätze unter allen lebenden Leukozyten (Bestimmung durch Durchflusszytometrie) und der Gesamtzellzahl im jeweiligen Organ berechnet. Die Daten von zwei unabhängigen Experimenten wurden zusammengefasst. Statistik: Mann Whitney U Test; \* P ≤

0,05; \*\*\*  $P \leq 0,001$ . **B** Prozentualer Anteil regulatorischer T-Zellen am Expansionsmaximum in der Milz (Tag 6) und im Rückenmark (Tag 8) nach Verabreichung von PBS oder JJ316.

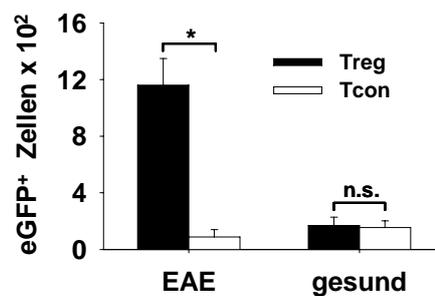
Wie erwartet, führte die Verabreichung von 1 mg JJ316 zu einer starken Expansion regulatorischer T-Zellen in der Milz und erreichte ein Maximum an Tag 6 nach der Krankheitsinduktion (**Abb. 4-5 A**). Danach fiel die Zellzahl zwar wieder ab, war aber immer noch signifikant erhöht. In PBS behandelten Tieren hingegen blieb die Menge regulatorischer T-Zellen in der Milz über den gesamten Beobachtungszeitraum konstant. Bis Tag 4 nach der Krankheitsinduktion war kein signifikanter Anstieg regulatorischer T-Zellen im Rückenmark beider Gruppen zu beobachten. Während aber PBS behandelte Tiere bereits ihren Krankheitshöhepunkt erreicht hatten, zeigten die mit JJ316 injizierten Tiere keinerlei Krankheitssymptome. Daraus lässt sich schließen, dass zu diesem Zeitpunkt die Anwesenheit regulatorischer T-Zellen am Entzündungsort nicht erforderlich war und die Suppression enzephalitogener T-Zellen in sekundären lymphatischen Organen erfolgte. Allerdings stieg ab Tag 6 die Anzahl regulatorischer T-Zellen im Rückenmark JJ316 behandelter Tiere kontinuierlich an und erreichte ihren Höhenpunkt an Tag 8. Danach reduzierte sich zwar die Anzahl, war aber bis Tag 14 immer noch signifikant erhöht. Diese verspätete Migration und Anwesenheit am Entzündungsort könnte ein späteres Ausbrechen von EAE Symptomen verhindern. In der Kontrollgruppe wurde zu keinem Zeitpunkt ein Anstieg regulatorischer T-Zellen beobachtet.

Neben der absoluten Zellzahl ist auch der prozentuale Anteil regulatorischer T-Zellen an Tag 6 und 8 sowohl in der Milz als auch im Rückenmark JJ316 behandelter Tiere signifikant erhöht (**Abb. 4-5 B**). Im Gegensatz dazu wurden im Rückenmark gesunder Tiere keine regulatorischen T-Zellen beobachtet, egal ob die Tiere mit PBS oder JJ316 behandelt worden waren. Dies bedeutet, regulatorische T-Zellen migrieren erst dann in das Rückenmark, nachdem dort eine Entzündungsreaktion durch enzephalitogene T-Zellen hervorgerufen worden war (vergleiche **Abb. 4-2**). Des Weiteren wurde die Akkumulation regulatorischer T-Zellen im Rückenmark kranker Tiere nur nach einer Behandlung mit JJ316 beobachtet. JJ316 ist also nicht nur für die präferentielle Expansion, sondern auch Aktivierung regulatorischer T-Zellen verantwortlich.

Aus all diesen Ergebnissen lässt sich schließen, dass die spezifische Migration regulatorischer T-Zellen in das Rückenmark also erst stattfindet, wenn bereits ein gewisses Maß an Entzündung vorherrscht. Das Auftreten von Krankheitssymptomen

zu früheren Zeitpunkten wird durch das Wirken regulatorischer T-Zellen in sekundären lymphatischen Organen verhindert. Nach der Migration in das ZNS könnten sie ein späteres Ausbrechen einer EAE durch eingewanderte enzephalitogene T-Zellen verhindern.

Um zu bestätigen, dass die Verabreichung von JJ316 tatsächlich die präferentielle Migration regulatorischer im Vergleich zu konventionellen T-Zellen zum Entzündungsort induziert, wurden  $eGFP^+$   $T_{reg}$  und  $eGFP^+$   $T_{con}$  Zellen aus eGFP-transgenen Ratten isoliert und als Indikatorzellen im AT-EAE Modell eingesetzt. Eine AT-EAE wurde durch den Transfer von  $eGFP^-$  enzephalitogenen T-Zellen induziert. Gleichzeitig wurden entweder  $eGFP^+$   $T_{reg}$  oder  $eGFP^+$   $T_{con}$  Zellen injiziert. Am nächsten Tag wurde allen Tieren JJ316 verabreicht und sowohl die Expansion als auch die Migration  $eGFP^+$   $T_{reg}$  bzw.  $eGFP^+$   $T_{con}$  Zellen untersucht.



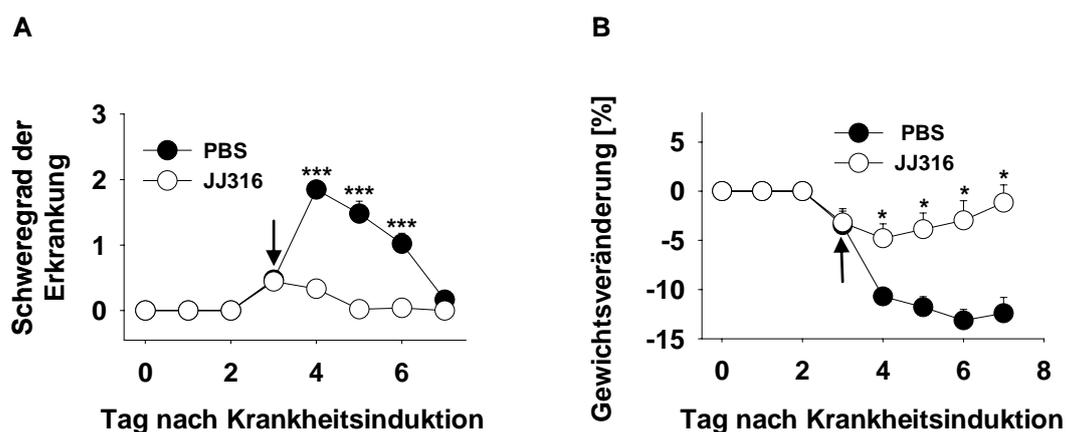
**Abb. 4-6. Migration  $eGFP^+$  regulatorischer und konventioneller T-Zellen als Indikatorzellen ins Rückenmark nach der Verabreichung von JJ316.**  $eGFP^+$   $T_{reg}$  oder  $T_{con}$  Zellen wurden entweder zusammen (EAE) oder ohne (gesunde Tiere)  $eGFP^-$  enzephalitogene T-Zellen injiziert. Einen Tag später erhielt jedes Tier 1 mg JJ316 und an 6 Tag wurde die Anzahl  $eGFP^+$   $T_{reg}$  oder  $T_{con}$  Zellen im Rückenmark bestimmt.  $n = 3$  pro Gruppe. Dargestellt ist eines aus zwei repräsentativen Experimenten. Statistik: Mann Whitney U Test; \*  $P \leq 0,05$ ; n. s.: nicht signifikant.

An Tag 6 der Erkrankung (Tag 5 nach der JJ316 Verabreichung) sind mehr  $eGFP^+$  regulatorische T-Zellen als  $eGFP^+$  konventionelle T-Zellen in das Rückenmark eingewandert (**Abb. 4-6**). Zum gleichen Zeitpunkt wurde in gesunden Tieren nur ein sehr geringer Anteil  $eGFP^+$  T-Zellen im Rückenmark gefunden. Im Gegensatz zu den erkrankten Tieren zeigte sich kein Unterschied zwischen der Anzahl regulatorischer und konventioneller T-Zellen. Eine gesteigerte Migration aktivierter regulatorischer T-Zellen in das Rückenmark gesunder Tiere kann dadurch ausgeschlossen werden. Dies unterstützt die zuvor gemachte Beobachtung, dass durch JJ316 aktivierte

regulatorische nicht aber konventionelle T-Zellen insbesondere im späteren Krankheitsverlauf in das ZNS migrieren.

#### 4.1.3 Die therapeutische Verabreichung von JJ316 verbessert den Krankheitsverlauf einer EAE unabhängig von einer Migration regulatorischer T-Zellen in das ZNS

In den vorherigen Abschnitten wurde gezeigt, dass die prophylaktische Verabreichung von JJ316 das Ausbrechen von EAE Symptomen durch das Wirken regulatorischer T-Zellen zunächst in sekundären lymphatischen Organen und zu einem späteren Zeitpunkt auch im Rückenmark verhindert. Offen bleibt allerdings, wie sich eine therapeutische Injektion von JJ316 auswirkt, d. h. wenn bereits eine Infiltration des Rückenmarks durch enzephalitogene T-Zellen erfolgt ist. Daher wurde eine AT-EAE wiederum durch den Transfer eGFP<sup>+</sup> enzephalitogener T-Zellen induziert. Die Verabreichung von PBS bzw. JJ316 erfolgte nun aber an Tag 3 der Erkrankung. Im Anschluss wurden der Krankheitsverlauf sowie die Zahl enzephalitogener und regulatorischer T-Zellen in sekundären lymphatischen Organen und im Rückenmark analysiert.

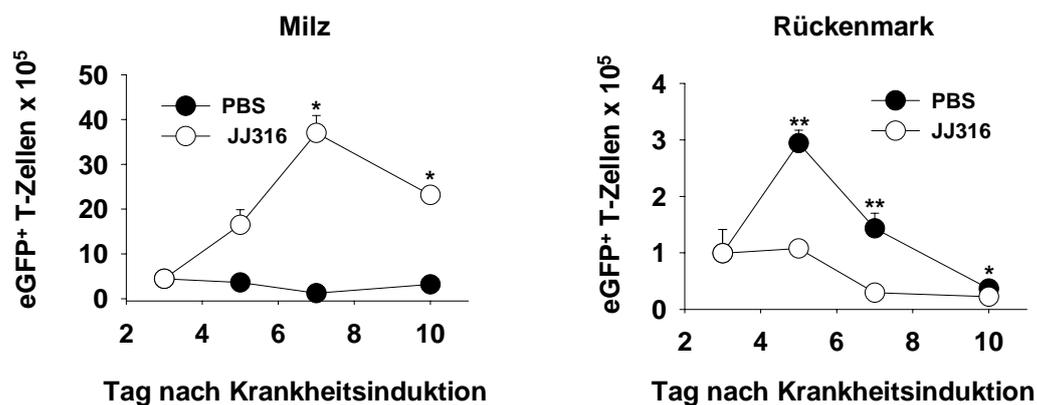


**Abb. 4-7 Krankheitsverlauf nach der therapeutischen Behandlung mit JJ316.** Eine AT-EAE wurde durch den Transfer eGFP<sup>+</sup> enzephalitogener T-Zellen induziert. An Tag 3 erfolgte die Verabreichung von PBS oder 1 mg JJ316 (angedeutet durch den Pfeil). n = 6 -18 pro Gruppe. Dargestellt sind der **A** Schweregrad der Erkrankung und **B** die Gewichtsveränderung während einer AT-EAE. Die Daten von zwei unabhängigen Experimenten wurden zusammengefasst. Statistik: Mann Whitney U Test; \*  $P \leq 0,05$ ; \*\*\*  $P \leq 0,001$ .

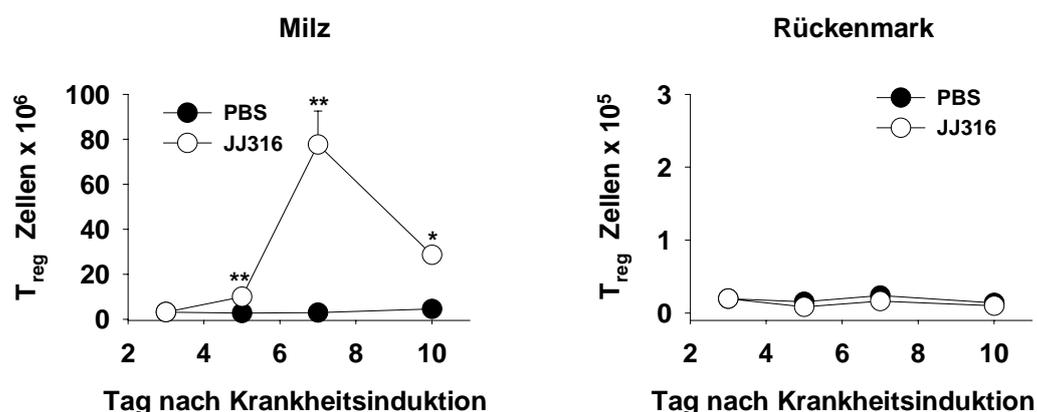
Sehr schnell nach Antikörperinjektion kam es zu keiner weiteren Verschlechterung im Krankheitsverlauf und bereits zwei Tage später (Tag 5 nach der Krankheitsinduktion) waren die Tiere wieder fast vollkommen genesen (**Abb. 4-7 A**). Dies spiegelte sich auch in der Veränderung der Körpermasse wieder. An Tag 3 war das Körpergewicht im Vergleich zu vor der Krankheitsinduktion noch reduziert. Nach der JJ316 Injektion kehren die Tiere aber schnell wieder zu ihrem Ausgangsgewicht zurück (**Abb. 4-7 B**). Die Kontrollgruppe hingegen zeigte den typischen Krankheitsverlauf einer AT-EAE begleitet von einer Reduktion der Körpermasse (vergleiche auch **Abb. 4-1**).

Als nächstes wurde untersucht, wie sich die therapeutische Behandlung einer AT-EAE mit JJ316 auf die Verteilung enzephalitogener und regulatorischer T-Zellen in der Milz und im Rückenmark auswirkt.

**A**



**B**



**Abb. 4-8 Enzephalitogene und regulatorische T-Zellen nach der therapeutischen Verabreichung von JJ316.** A Dargestellt ist die absolute Anzahl enzephalitogener T-Zellen in der Milz und im Rückenmark nach der therapeutischen Verabreichung von PBS oder JJ316 (berechnet wie unter Fig. 4-5 beschrieben). n = 6 pro Gruppe. Die Daten von zwei unabhängigen Experimenten wurden

zusammengefasst. **B** Dargestellt ist die absolute Zellzahl regulatorischer T-Zellen in der Milz und im Rückenmark nach der therapeutischen Behandlung einer AT-EAE mit PBS bzw. JJ316. (berechnet wie unter Fig. 4-5 beschrieben).  $n = 6$  pro Gruppe. Die Daten von zwei unabhängigen Experimenten wurden zusammengefasst. Statistik: Mann Whitney U Test; \*  $P \leq 0,05$ ; \*\*  $P \leq 0,01$

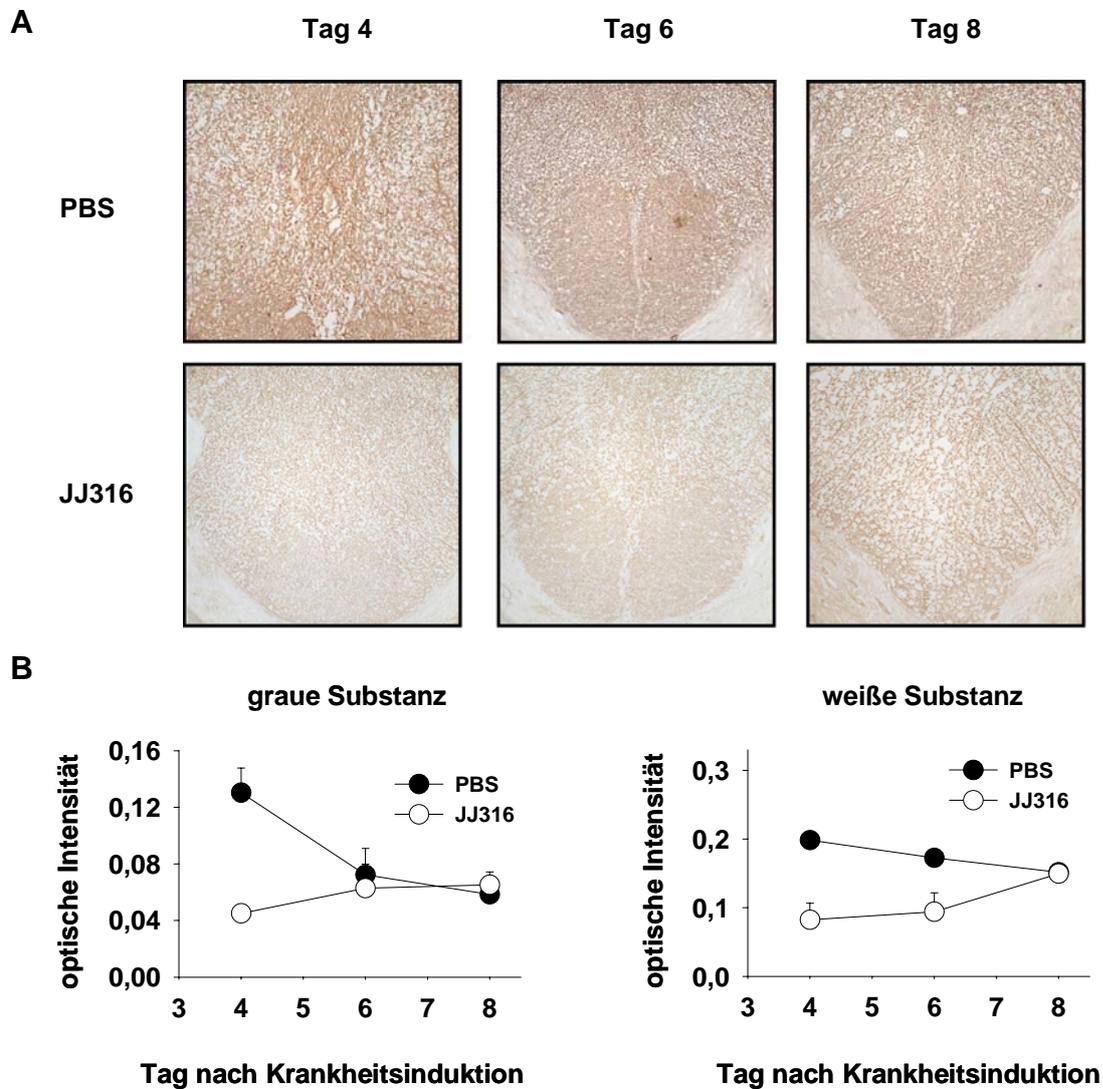
In der Milz führte die Injektion von JJ316 an Tag 3 nach der Krankheitsinduktion zu einer starken Expansion enzephalitogener T-Zellen (**Abb. 4-8 A**). Wie es durch den Krankheitsverlauf bereits angedeutet wurde, waren an Tag 3 bereits enzephalitogene T-Zellen in das Rückenmark gewandert. Mit der Verabreichung von JJ316 wurde jedoch die weitere Infiltration des Rückenmarks durch enzephalitogene T-Zellen umgehend zum Stillstand gebracht. Im Folgenden kam es nur zur Reduktion der Zellzahl. Im Gegensatz dazu konnten in PBS behandelten Tieren enzephalitogene T-Zellen ungehindert in das Rückenmark wandern und erreichten ein Infiltrationsmaximum an Tag 5 der Erkrankung. Danach nahm auch bei ihnen die Zellzahl kontinuierlich ab, war aber an Tag 7 noch immer signifikant erhöht. Schließlich konnten an Tag 10 nach der Krankheitsinduktion nur noch wenige enzephalitogene T-Zellen im Rückenmark beider Gruppen detektiert werden.

Wie im prophylaktischen Versuchsansatz (**Abb. 4-5 A**) führte auch die therapeutische Verabreichung von JJ316 zu einer starken Expansion regulatorischer T-Zellen in der Milz (**Abb. 4-8 B**). Zu keinem Zeitpunkt aber wurde in PBS oder in JJ316 behandelten Tieren eine signifikante Erhöhung regulatorischer T-Zellen im Rückenmark beobachtet. Dies unterstützt die These, dass durch JJ316 aktivierte regulatorische T-Zellen vor allem in sekundären lymphatischen Organen wirken.

#### **4.1.4 Die Verabreichung von JJ316 vermindert die Zerstörung der Bluthirnschranke**

In den vorangegangenen Experimenten konnte gezeigt werden, dass durch JJ316 aktivierte und expandierte regulatorische T-Zellen ihre Wirkung insbesondere in sekundären lymphatischen Organen entfalten. Der Mechanismus, durch den sie eine Inhibierung enzephalitogener T-Zellen erreichen, bleibt allerdings weiterhin offen. Daher befassten sich die nächsten Experimente mit der Beantwortung dieser Fragestellung. Zunächst wurde die Integrität der Bluthirnschranke nach der therapeutischen Behandlung mit JJ316 und PBS miteinander verglichen. Dies

geschieht mittels der immunhistochemischen Analyse des Albumingehalts im Rückenmark, wobei die Färbeintensität als ein Maß für die Permeabilität der Bluthirnschranke dient (Schmidt et al., 2003b).



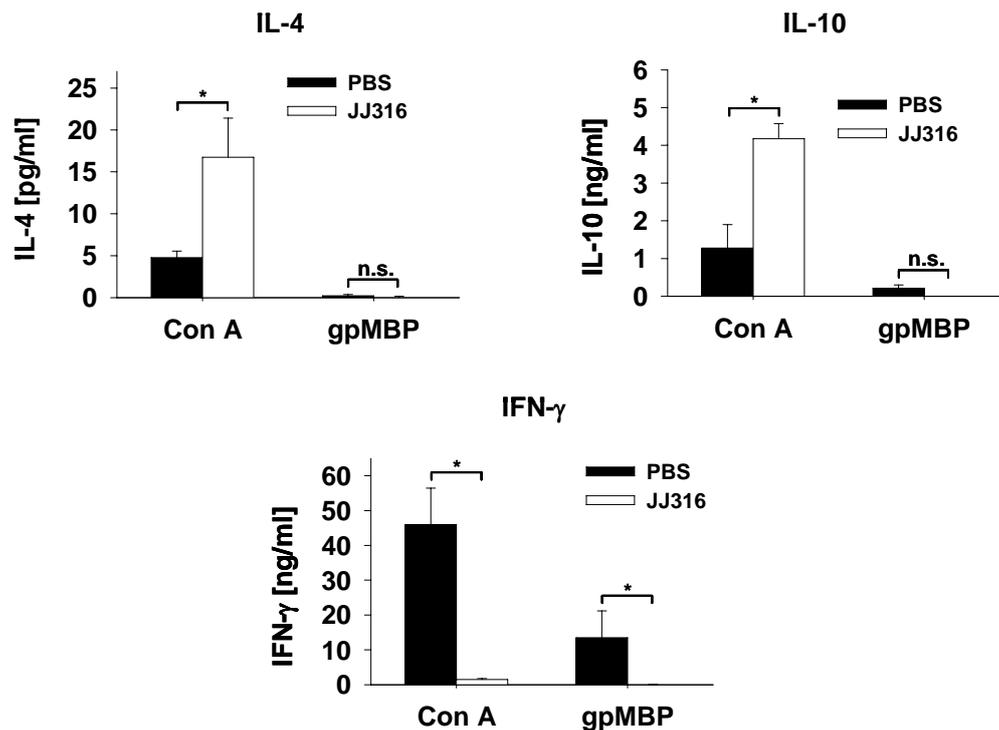
**Abb. 4-10 Integrität der Bluthirnschranke.** **A** Eine AT-EAE wurde durch den Transfer eGFP<sup>+</sup> enzephalitogener T-Zellen induziert und die Tiere einen Tag später mit PBS oder JJ316 behandelt. Anschließend wurden histologische Schnitte vom zervikalen Enden des Rückenmarks gewonnen und mit einem Anti-Albumin Antikörper gefärbt. Die Zerstörung der Bluthirnschrankenintegrität wurde mittels Immunoperoxidase visualisiert. Dargestellt sind histologische Schnitte der grauen Substanz von PBS und JJ316 behandelten Tieren an Tag 4, 6 und 8 nach Krankheitsinduktion. **B** Mittels Densitometrie wurden die Farbintensitäten der Albuminfärbung der grauen und weißen Substanz quantifiziert.

PBS behandelte Tiere weisen eine stärkere Zerstörung der Bluthirnschrankenintegrität im Vergleich zu Ratten auf, denen JJ316 verabreicht

worden war (**Abb. 4-10 A und B**). Bereits an Tag 4 nach Krankheitsinduktion erreichte die Öffnung der Bluthirnschranke ihr Maximum und wurde nur sehr langsam wieder vermindert. In histologischen Schnitten JJ316 behandelter Tiere hingegen wurde nahezu kein Albumin nachgewiesen und nur zum Ende hin wurde ein schwacher Anstieg beobachtet. Die Ursache hierfür mag in der ab Tag 6 leicht erhöhten Infiltration des Rückenmarks durch enzephalitogene T-Zellen liegen, was auch die gesteigerte Anzahl regulatorischer T-Zellen zu diesem Zeitpunkt erklären könnte. Damit korreliert die Zerstörung der Bluthirnschranke sowohl mit der Menge infiltrierender enzephalitogener als auch regulatorischer T-Zellen.

#### **4.1.5 Die Verabreichung von JJ316 induziert einen T<sub>H</sub>2 Shift und inhibiert die IFN- $\gamma$ Produktion**

Als nächstes stellte sich die Frage, auf welche Art und Weise regulatorische T-Zellen die Migrationsfähigkeit enzephalitogener T-Zellen in das Rückenmark einschränken. Daher wurden an Tag 4 nach Krankheitsinduktion Milzzellen aus Tieren isoliert, denen prophylaktisch PBS oder JJ316 verabreicht worden war. Anschließend wurden die Zellen für 24 h mit Con A oder gpMBP stimuliert und die Menge an IL-4, IL-10 und IFN- $\gamma$  im Überstand mittels CBA analysiert.

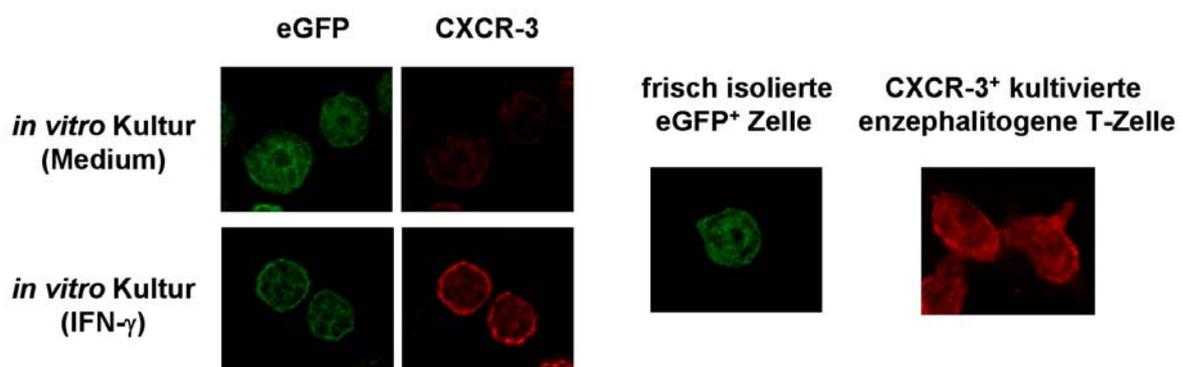


**Abb. 4-10** Das Zytokinprofil von Milzzellen in einer AT-EAE. Milzzellen wurden an Tag 4 nach der Krankheitsinduktion aus Tieren isoliert, die prophylaktisch mit PBS oder JJ316 behandelt worden waren. Anschließend wurden die Zellen für 24 h mit Con A oder gpMBP stimuliert. Die Mengen an IL-4, IL-10 und IFN- $\gamma$  wurden im Überstand mittels CBA analysiert.  $n = 3$  pro Gruppe. Statistik: Mann Whitney U Test; \*  $P \leq 0,05$ , n. s. = nicht signifikant.

IL-4 und IL-10 sind charakteristische Zytokine, die während  $T_H2$  dominierten Immunantworten ausgeschüttet werden, wobei IL-10 auch von regulatorischen T-Zellen synthetisiert wird (Lin and Hünig, 2003). IFN- $\gamma$  hingegen wird überwiegend von  $T_H1$  Zellen produziert und stellt das Haupteffektorzytokin pathogener T-Zellen dar (Renno et al., 1998). Nach der Stimulation mit Con A produzierten Milzzellen JJ316 behandelte Tiere signifikant höhere Mengen an IL-4 und IL-10 als Tiere, denen PBS verabreicht worden war (**Abb. 4-10**). In der Gegenwart von gpMBP waren diese Zytokine in den Überständen beider Gruppen jedoch kaum detektierbar. Dies deutet darauf hin, dass die  $T_H2$  Zellen, welche nach Verabreichung von JJ316 vermehrt vorkommen, nicht den enzephalitogenen T-Zellen entsprechen. Die Synthese von IFN- $\gamma$  hingegen wurde sowohl nach der Stimulation mit Con A als auch mit gpMBP unterdrückt. Demzufolge liegt ein Wirkungsmechanismus regulatorischer T-Zellen nach der Aktivierung durch JJ316 in der Inhibierung der IFN- $\gamma$  Produktion durch enzephalitogene T-Zellen.

#### 4.1.6 Nach Injektion von JJ316 ist die Expression von CXCR-3 auf enzephalitogenen T-Zellen deutlich reduziert

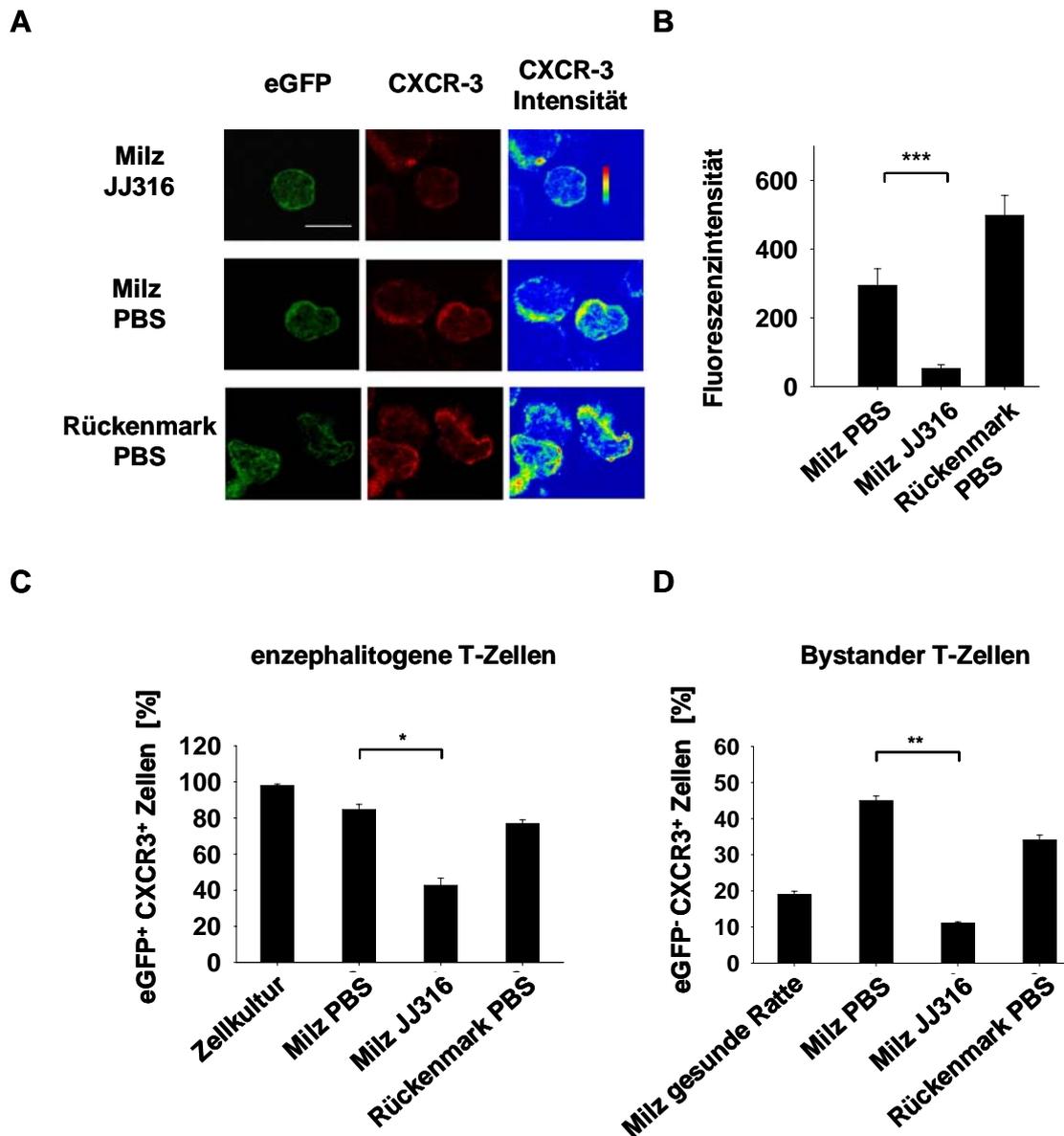
Als nächstes stellt sich die Frage, wie sich die eingeschränkte IFN- $\gamma$  Produktion auf den Phänotyp enzephalitogener T-Zellen auswirkt. So induziert IFN- $\gamma$  die Expression des Chemokinrezeptors CXCR-3 und ermöglicht pathogenen T-Zellen die Wanderung zum Entzündungsort (Engelhardt und Ransohoff, 2005). Ebenso ist die Anzahl an T-Zellen, die diesen Chemokinrezeptor exprimieren, im CSF von MS Patienten sowie im ZNS von Mäusen und Ratten, in denen eine EAE induziert worden war, erhöht (Sorensen et al., 1999; Xie et al., 2003). Daher wurde als nächstes untersucht, ob im vorliegenden Fall die verminderte Produktion an IFN- $\gamma$  in einer Verringerung der CXCR-3 Expression resultiert. Darin könnte ein Grund für die stark reduzierte Infiltration des Rückenmarks durch enzephalitogene T-Zellen liegen.



**Abb. 4-11 CXCR-3 Expression auf T-Zellen.** eGFP<sup>+</sup> Milzzellen wurden 24 h in der An- oder Abwesenheit von 100 U/ml IFN- $\gamma$  kultiviert. Anschließend wurde die Expression von CXCR-3 mittels konfokaler Mikroskopie analysiert. Parallel wurden die Fluoreszenz frisch isolierter eGFP<sup>+</sup> Zellen und die CXCR-3 Expression kultivierter enzephalitogener T-Zellen durch konfokale Mikroskopie visualisiert.

Zunächst sollte gezeigt werden, dass IFN- $\gamma$  die Expression von CXCR-3 induziert. Hierfür wurden eGFP<sup>+</sup> Milzzellen in der An- oder Abwesenheit von 100 U/ml IFN- $\gamma$  für 24 h kultiviert. Tatsächlich exprimieren die Milzzellen nach Inkubation mit IFN- $\gamma$  CXCR-3 auf der Oberfläche, während in der Mediumkontrolle kein CXCR-3 auf den Zellen detektiert wurde (**Abb. 4-11**). Ebenso exprimieren enzephalitogene T-Zellen, die zur Krankheitsinduktion verwendet wurden, CXCR-3. Die eGFP Fluoreszenz

wurde nur als eine Ringstruktur wahrgenommen. Dies ist darauf zurückzuführen, dass das Zytosol in Lymphozyten nur einen dünnen Ring um den Zellkern bildet. Als nächstes wurde die CXCR-3 Expression auf enzephalitogenen T-Zellen und Bystander T-Zellen in einer AT-EAE nach der Verabreichung von PBS oder JJ316 untersucht. Hierfür wurden Milzzellen und das Rückenmarksinfiltrat an Tag 4 nach der Krankheitsinduktion isoliert.



**Abb. 4-12 CXCR-3 Expression auf enzephalitogenen und Bystander T-Zellen.** **A** Eine AT-EAE wurde durch den Transfer eGFP<sup>+</sup> enzephalitogener T-Zellen induziert und die Tiere prophylaktisch mit PBS oder JJ316 behandelt. An Tag 4 wurden die Milzzellen sowie das Rückenmarksinfiltrat isoliert und die Expression von eGFP und CXCR-3 analysiert. Zur quantitativen Visualisierung der CXCR-3 Intensität ist die CXCR-3 Expression auch im Falschfarbenmodus dargestellt. Der Farbbalken ist ein Maß für die Expressionsstärke. Weißer Balken = 5  $\mu$ m. **B** Quantifizierung der CXCR-3

Fluoreszenzintensität auf enzephalitogenen T-Zellen. **C** Dargestellt ist der Prozentsatz eGFP<sup>+</sup> CXCR-3<sup>+</sup> enzephalitogener T-Zellen unter allen eGFP<sup>+</sup> T-Zellen vor dem Transfer, in resolierten T-Zellen aus der Milz und dem Rückenmark PBS behandelter Tiere und der Milz JJ316 injizierter Ratten. n = 3 pro Gruppe. **D** Dargestellt ist der Prozentsatz eGFP<sup>-</sup> CXCR-3<sup>+</sup> Bystander T-Zellen unter allen eGFP<sup>-</sup> T-Zellen in der Milz einer gesunden Raten, der Milz und dem Rückenmark PBS behandelter Tiere sowie der Milz JJ316 injizierter Ratten. n = 3 pro Gruppe. Statistik: einfaktorielle ANOVA, post-hoc: Tukey HSD Test. \*  $P \leq 0,05$ ; \*\*  $P \leq 0,01$ ; \*\*\*  $P \leq 0,001$

Vor dem Transfer exprimierten nahezu alle eGFP<sup>+</sup> enzephalitogenen T-Zellen CXCR-3 auf der Oberfläche und behielten dies auch in PBS behandelten Tieren sowohl in der Milz als auch im Rückenmark bei (**Abb. 4-12 A und C**). Nach der Verabreichung von JJ316 aber war der Prozentsatz sowie die Fluoreszenzintensität von CXCR-3 auf enzephalitogenen T-Zellen in der Milz stark verringert (**Abb. 4-12 A und C**). Allerdings war es zu diesem Zeitpunkt nicht möglich, die CXCR-3 Expression auf enzephalitogenen T-Zellen im Rückenmark JJ316 behandelter Tiere zu analysieren, da bis dahin zu wenige Zellen in das Rückenmark eingewandert waren (vergleiche **Abb. 4-2 und 4-3**).

Im gleichen Maße änderte sich die CXCR-3 Expression auf eGFP<sup>-</sup> Bystander T-Zellen nach der Injektion von JJ316. Während in der Milz einer gesunden Ratte nur einige wenige T-Zellen CXCR-3 auf der Oberfläche exprimierten, erhöhte sich der Prozentsatz CXCR-3<sup>+</sup> T Lymphozyten nach der Induktion einer AT-EAE (**Abb. 4-12 D**). Wie bei den enzephalitogenen T-Zellen war CXCR-3 auch auf den eGFP<sup>-</sup> Bystander T-Zellen im Rückenmark vorzufinden (**Abb. 4-12 D**). Nach der Injektion von JJ316 hingegen wurde ein Anstieg CXCR-3 exprimierender T-Zellen unter den eGFP<sup>-</sup> Bystander T-Zellen in der Milz verhindert.

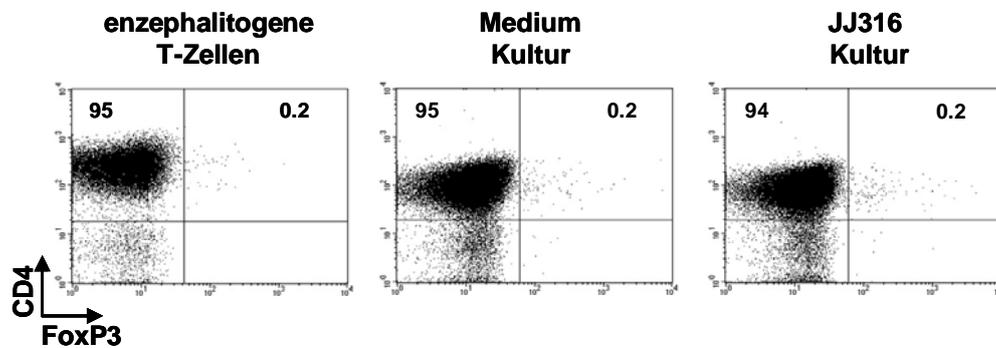
Demzufolge führt die verminderte Produktion von IFN- $\gamma$  tatsächlich zu einer reduzierten Expression von CXCR-3 auf enzephalitogenen und konventionellen T-Zellen. Dies wiederum könnte die verminderte Infiltration des Rückenmarks durch beide Lymphozytenarten nach einer Behandlung mit JJ316 erklären.

#### 4.1.7 Charakterisierung JJ316 aktivierter enzephalitogener T-Zellen *in vitro*

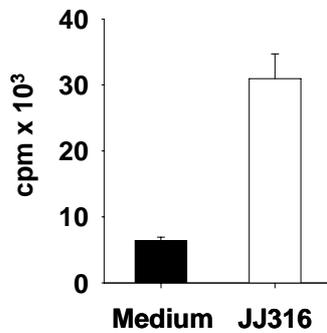
Um sicherzustellen, dass der schützende Effekt von JJ316 vor den Symptomen einer AT-EAE durch die Induktion regulatorischer T-Zellen und nicht durch eine direkte Wirkung auf enzephalitogene T-Zellen zustande gekommen ist, wurde der direkte

Einfluss von JJ316 auf enzephalitogene T-Zellen *in vitro* untersucht. Hierfür wurden enzephalitogene T-Zellen in der An- oder Abwesenheit von JJ316 kultiviert und mittels Durchflusszytometrie und konfokaler Mikroskopie analysiert.

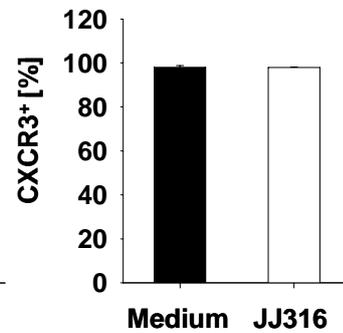
**A**



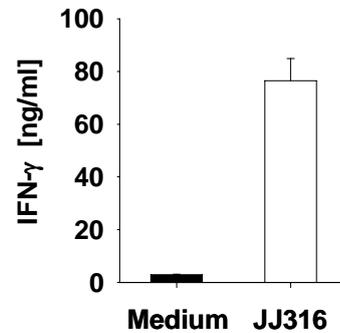
**B**



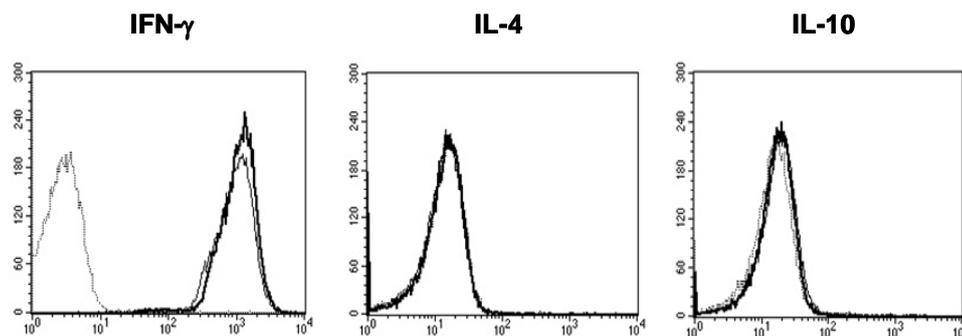
**C**



**E**



**D**



**Abb. 4.13 Wirkung von JJ316 auf enzephalitogene T-Zellen *in vitro*.** **A** Enzephalitogene T-Zellen wurden direkt vor dem Transfer oder nach der Kultivierung für 48 h in der An- oder Abwesenheit von 5  $\mu\text{g/ml}$  JJ316 mittels Durchflusszytometrie analysiert. Dargestellt sind die Prozentsätze CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>-</sup> und CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>T-Zellen. **B** Proliferation enzephalitogener T-Zellen nach der Kultivierung in Medium oder der Stimulation mit JJ316. **C** CXCR-3 Expression enzephalitogener T-Zellen mit und ohne Stimulierung durch JJ316. **D** Nach einer 48 stündigen Kultivierung in der An- oder Abwesenheit von JJ316 wurden enzephalitogene T-Zellen 2 h mit PMA und Ionomycin stimuliert. Dargestellt sind die Histogramme der intrazellulären Färbungen für IFN- $\gamma$ , IL-4 und IL-10. Die gestrichelte Linie repräsentiert die Isotypkontrolle, die dünne die Mediumkontrolle und die dicke die Stimulation mit

JJ316. **E** Die Menge an IFN- $\gamma$  im Überstand nach der Kultivierung von enzephalitogenen T-Zellen in der An- oder Abwesenheit von JJ316 wurde mittels CBA bestimmt. Jedes Experiment wurde mindestens zweimal mit ähnlichen Ergebnissen reproduziert.

Weniger als 0,2 % FoxP3<sup>+</sup> T-Zellen befanden sich unter den enzephalitogenen T-Zellen. Auch nach einer Kultivierung in der Anwesenheit von JJ316 kam es weder zur Induktion noch zu einer Anhäufung regulatorischer T-Zellen, obwohl durch den Antikörper eine deutliche Proliferation unter den pathogenen Lymphozyten induziert worden war (**Abb. 4-13 A und B**). Demzufolge handelt es sich bei den enzephalitogenen T-Zellen um eine nahezu reine Lymphozytenpopulation, deren Zusammensetzung durch JJ316 nicht verändert wird.

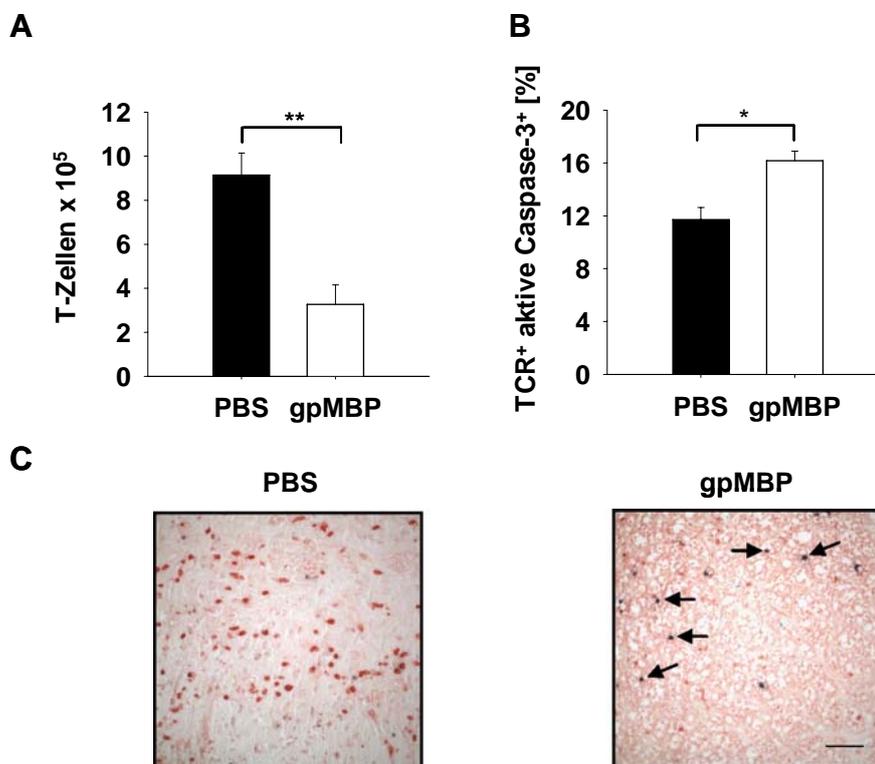
Um zu untersuchen, ob JJ316 eine inhibitorische Wirkung auf enzephalitogene T-Zellen hat, wurde ihr Zytokinprofil sowie die Expression von CXCR-3 nach einer Stimulation mit JJ316 analysiert. JJ316 hatte weder einen Einfluss auf die Expression von CXCR-3 (**Abb. 4-13 C**) noch induziert er einen T<sub>H</sub>2 Shift in enzephalitogenen T-Zellen. Egal ob JJ316 in der Kultur an- bzw. abwesend war, wurden keine detektierbaren Mengen an IL-4 und IL-10 gemessen (**Abb. 4-13 D**). Ebenso wird die Produktion von IFN- $\gamma$  nicht unterdrückt. Im Gegenteil, nach einer Kultivierung in der Anwesenheit von JJ316 kam es sogar zu einer Induktion von IFN- $\gamma$  (**Abb. 4-13 D und E**).

Die nach der Verabreichung von JJ316 beobachteten inhibitorischen Effekte auf den Krankheitsverlauf einer AT-EAE wurden also nicht durch eine direkte Wirkung von JJ316 auf enzephalitogene T-Zellen verursacht. Vielmehr ist die Aktivierung und Expansion von regulatorischen T-Zellen für die Unterdrückung von EAE Symptomen verantwortlich.

## 4.2 Therapie einer AT-EAE mit hohen Dosen von Antigen

Die mehrmalige Verabreichung hoher Dosen eines spezifischen Antigens führte bei manchen Autoimmunerkrankungen zur Verbesserung des Krankheitsverlauf, so auch in der EAE (Weishaupt et al., 2000b). Der Grund hierfür liegt in der Induktion von Apoptose, wobei bis heute nicht geklärt ist, welche Zellen – autoreaktive und/oder konventionelle T-Zellen – das Ziel der Apoptose sind. Um diese Frage zu beantworten, wurde eine AT-EAE durch den Transfer eGFP<sup>+</sup> enzephalitogener T-Zellen induziert und die Tiere an Tag 3 und 4 mit je 500 µg gpMBP oder PBS behandelt. 6 h nach der letzten Injektion wurden die Tiere getötet und die Apoptose eGFP<sup>+</sup> enzephalitogener sowie konventioneller T-Zellen im Rückenmark und der Milz analysiert.

### 4.2.1 Die Antigentherapie mit gpMBP induziert Apoptose unter T-Zellen im Rückenmark



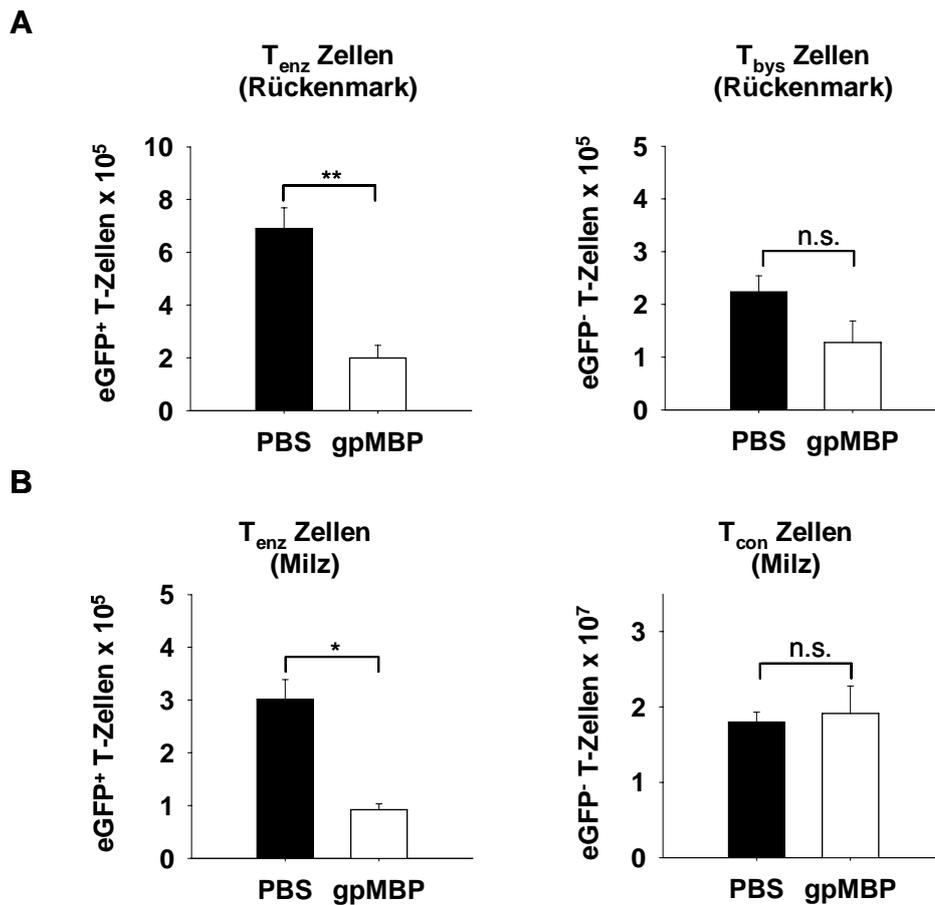
**Abb. 4-14 T-Zellapoptose nach der Therapie einer AT-EAE mit hohen Dosen Antigen.** A Eine AT-EAE wurde durch den Transfer eGFP<sup>+</sup> enzephalitogener T-Zellen induziert und an Tag 3 und 4 mit 500 µg gpMBP oder PBS behandelt. 6 h nach der letzten Injektion wurde die Anzahl an T-Zellen im

Rückenmark analysiert.  $n = 4$  pro Gruppe. **B** Dargestellt ist der Prozentsatz aktive Caspase-3<sup>+</sup> T-Zellen im Rückenmark. Hierfür wurde die Analyse auf T Lymphozyten beschränkt.  $n = 4$  pro Gruppe. Statistik: Mann Whitney U Test \*  $P < 0.05$ . **C** Histologische Analyse von Rückenmarkschnitten mittels Doppelmarkierung. Apoptotische Zellen, die durch fragmentierte DNA im Zellkern gekennzeichnet sind, nehmen durch die IST Markierung eine schwarze Farbe an. Anschließend wurden die T Lymphozyten durch Immunhistochemie nachgewiesen (rotes Signal). Dargestellt sind zervikale Rückenmarkschnitte nach der Behandlung mit PBS oder gpMBP. Die Pfeile deuten auf apoptotische T-Zellen. Balken = 50  $\mu\text{m}$ .  $n = 4$  pro Gruppe. Jedes Experiment wurde dreimal mit ähnlichen Ergebnissen reproduziert.

Nach der Verabreichung von gpMBP an Tag 3 und 4 war die Anzahl an T-Zellen im Rückenmark in Vergleich zu PBS behandelten Tieren signifikant reduziert (**Abb. 4-14 A**). Dies äußerte sich in der erhöhten Caspase-3 Aktivität in T-Zellen gpMBP behandelter Tiere (**Abb. 4-14 B**). Bestätigt wird dieses Ergebnis ebenfalls durch die immunhistologischen Analysen, in denen eine gesteigerte Apoptoserate nach der Verabreichung von gpMBP beobachtet wurde. Während in der Kontrollgruppe nur  $5,6 \pm 2,3$  % der T-Zellen apoptotisch waren, weisen in gpMBP behandelten Tieren  $11,6 \pm 6,5$  % der T-Zellen apoptotische Merkmale auf (**Abb. 4-14 C**).

#### **4.2.2 Die Antigentherapie reduziert die Anzahl enzephalitogener T-Zellen in der Milz und im Rückenmark**

Die vorher gemachten Beobachtungen stehen in Einklang mit den Ergebnissen anderer Studien (Weishaupt et al., 1997; Weishaupt et al., 2000a). Allerdings war bis jetzt nicht geklärt, ob sich die Antigentherapie auf pathogene und konventionelle T-Zellen gleichermaßen auswirkt. Da die AT-EAE durch den Transfer eGFP<sup>+</sup> enzephalitogener T-Zellen induziert wurde, konnten beide Lymphozytenpopulationen voneinander unterschieden und somit auch der Einfluss der Antigentherapie getrennt von einander analysiert werden. Zunächst wurde die Anzahl eGFP<sup>+</sup> pathogener und eGFP<sup>-</sup> konventioneller T-Zellen in der Milz und im Rückenmark ermittelt.

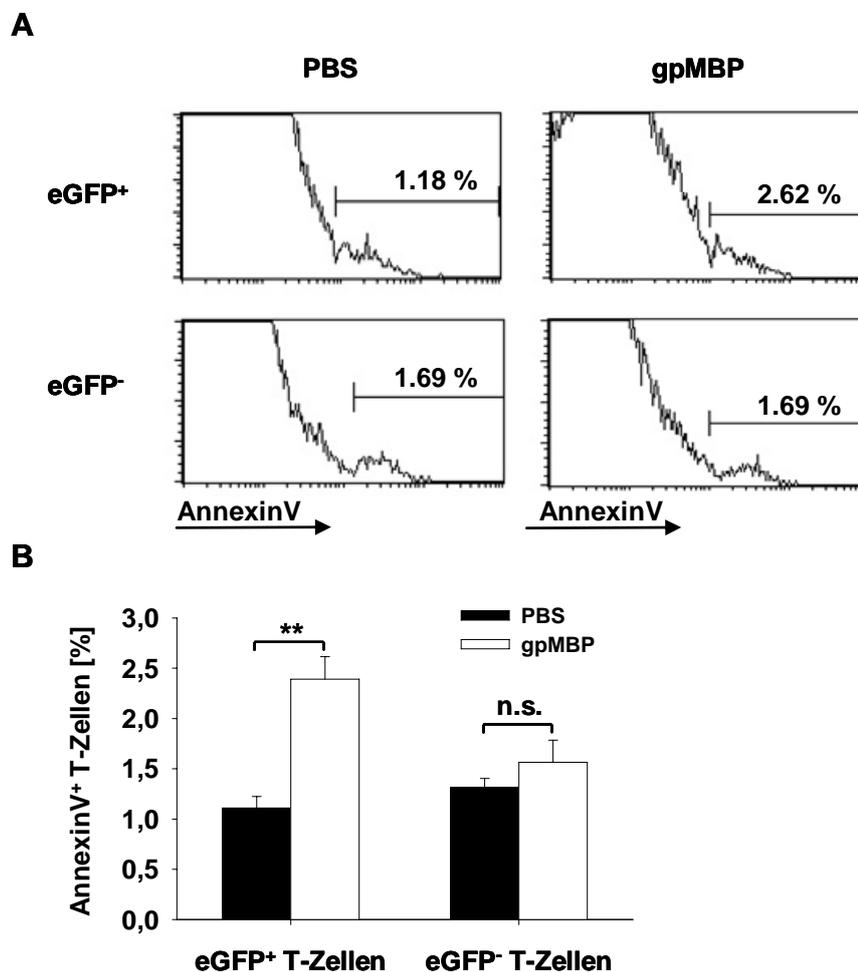


**Abb.4-15 Verteilung enzephalitogener und konventioneller T-Zellen nach der Therapie einer AT-EAE mit Antigen in der Milz und im Rückenmark.** Eine AT-EAE wurde durch den Transfer eGFP<sup>+</sup> enzephalitogener T-Zellen induziert und an Tag 3 und 4 mit 500 µg gpMBP behandelt. 6 h nach der letzten Injektion wurden die Ratten getötet und die Anzahl enzephalitogener und konventioneller T-Zellen analysiert. **A** Dargestellt ist die Anzahl eGFP<sup>+</sup> enzephalitogener und eGFP<sup>-</sup> Bystander T-Zellen im Rückenmark. n = 4 pro Gruppe **B** Gezeigt ist die Anzahl eGFP<sup>+</sup> enzephalitogener und eGFP<sup>-</sup> konventioneller T-Zellen in der Milz. n = 4 pro Gruppe. Statistik: Mann Whitney U Test. \*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ ; n. s. = nicht signifikant. Jedes Experiment wurde dreimal mit ähnlichen Ergebnissen reproduziert.

Nach der wiederholten Injektion von gpMBP war die Anzahl enzephalitogener T-Zellen sowohl im Rückenmark als auch in der Milz signifikant reduziert (**Abb. 4-15 A** und **B**). Auf die Zellzahl konventioneller T-Zellen hingegen hatte die Antigentherapie keinen Einfluss, da sich hier zwischen beiden Gruppen kein Unterschied zeigte. Demzufolge scheinen enzephalitogene und nicht konventionelle T-Zellen der Angriffspunkt der Antigentherapie zu sein.

### 4.2.3 Die Antigen­therapie induziert selektiv Apoptose in enzephalitogenen T-Zellen

Als nächstes stellte sich die Frage, weshalb ausschließlich enzephalitogene und nicht konventionelle T-Zellen durch die Antigen­therapie aus der Milz und dem Rückenmark beseitigt worden waren. Der Grund hierfür könnte in einer unterschiedlichen Apoptoseanfälligkeit beider Lymphozytenpopulationen liegen. Daher wurde die Bindung von AnnexinV an den frühen Apoptosemarker Phosphatidylserin auf T-Zellen im Rückenmark mittels Durchflusszytometrie analysiert. In der Milz war dies nicht möglich, da die Häufigkeit enzephalitogener T-Zellen für eine verlässliche Analyse zu gering war.



**Abb. 4-16 Apoptose in enzephalitogenen und konventionellen T-Zellen nach der Antigen­therapie einer AT-EAE.** **A** T-Zellen PBS oder gpMBP behandelter Ratten wurden aus dem Rückenmark isoliert und auf frühe Apoptoseanzeichen mittels Durchflusszytometrie untersucht. Die abgebildeten Histogramme beziehen sich entweder auf lebende eGFP<sup>+</sup> enzephalitogene oder lebende eGFP<sup>-</sup> konventionelle T-Zellen. Gezeigt ist der Prozentsatz AnnexinV<sup>+</sup> T-Zellen unter diesen Lymphozytenpopulationen. **B** Dargestellt ist die Quantifizierung früh apoptotischer T-Zellen unter

---

eGFP<sup>+</sup> enzephalitogenen und eGFP<sup>-</sup> konventionellen T-Lymphozyten nach der Verabreichung von PBS oder gpMBP. Statistik: Mann Whitney U Test. \*\*  $P < 0,01$ ; n. s. = nicht signifikant. Jedes Experiment wurde dreimal mit ähnlichen Ergebnissen reproduziert.

Nach der Verabreichung hoher Dosen gpMBP war ausschließlich die Apoptoserate eGFP<sup>+</sup> enzephalitogener und nicht die eGFP<sup>-</sup> konventioneller T-Zellen im Rückenmark signifikant erhöht (**Abb. 3-16 A und B**).

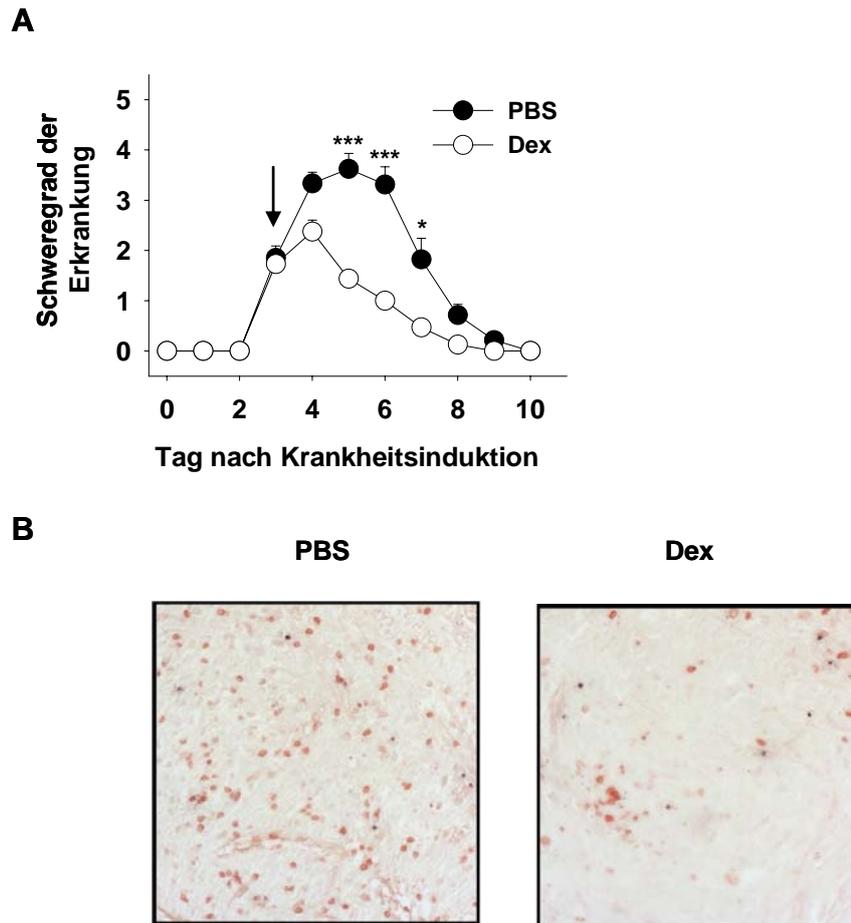
Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass nach der Verabreichung hoher Dosen gpMBP selektiv Apoptose in enzephalitogenen T-Zellen induziert wird und darin vermutlich der Therapieerfolg der Antigen­therapie liegt.

### **4.3 Therapie einer AT-EAE mit hohen Dosen an Glukokortikoiden**

Zu einer Standardtherapie von Multipler Sklerose (MS) und EAE zählt die Verabreichung sehr hoher Dosen an Glukokortikoiden. Der Therapieerfolg beruht dabei vor allem auf der Induktion von Apoptose und einer allgemeinen Immunsuppression (Reichardt et al., 2006). Bisher konnte allerdings nicht zwischen den Effekten auf pathogene und konventionelle T-Zellen unterschieden werden. Wenig bekannt ist auch über nicht-genomische Effekte von Glukokortikoiden, die vor allem bei hohen Konzentrationen auftreten (Buttgereit and Scheffold, 2002). Um diese Fragen zu beantworten, wurde eine AT-EAE durch den Transfer eGFP<sup>+</sup> enzephalitogener T-Zellen induziert und die Tiere an Tag 3 nach der Krankheitsinduktion intravenös mit 20 mg/kg Dexamethason behandelt. Anschließend wurden die Wirkungen der Glukokortikoidtherapie auf den Krankheitsverlauf und das Immunsystem, insbesondere auf enzephalitogene und konventionelle T-Zellen, untersucht.

#### **4.3.1 Glukokortikoide verbessern den Krankheitsverlauf einer AT-EAE und reduzieren die T-Zellanzahl im Rückenmark**

Zunächst wurde analysiert, wie sich die einmalige therapeutische Verabreichung von 20 mg/kg Dexamethason auf den Krankheitsverlauf einer AT-EAE in Lewis Ratten auswirkt.



**Abb. 4-17 Krankheitsverlauf und Zahl der T Lymphozyten im Rückenmark nach der Behandlung einer AT-EAE mit PBS oder Dex.** **A** Eine AT-EAE wurde durch den Transfer eGFP<sup>+</sup> enzephalitogener T-Zellen induziert. Dargestellt ist der Krankheitsverlauf von Tieren, die an Tag 3 nach Injektion der Zellen mit PBS oder 20 mg/kg Dex behandelt worden waren (gekennzeichnet durch den Pfeil).  $n = 7 - 12$  pro Gruppe. Statistik: Mann Whitney U Test. \*  $P \leq 0,05$ ; \*\*\*  $P < 0,001$ . Die Daten von zwei unabhängigen Experimenten wurden zusammengefasst. **B** 20 h nach der Behandlung mit PBS oder Dex wurden die Tiere getötet und zervikale Rückenmarkschnitte auf die Anwesenheit von T-Zellen immunhistochemisch untersucht. Dargestellt ist das Ergebnis eines von vier Tieren. Jedes Experiment wurde dreimal mit ähnlichen Ergebnissen reproduziert.

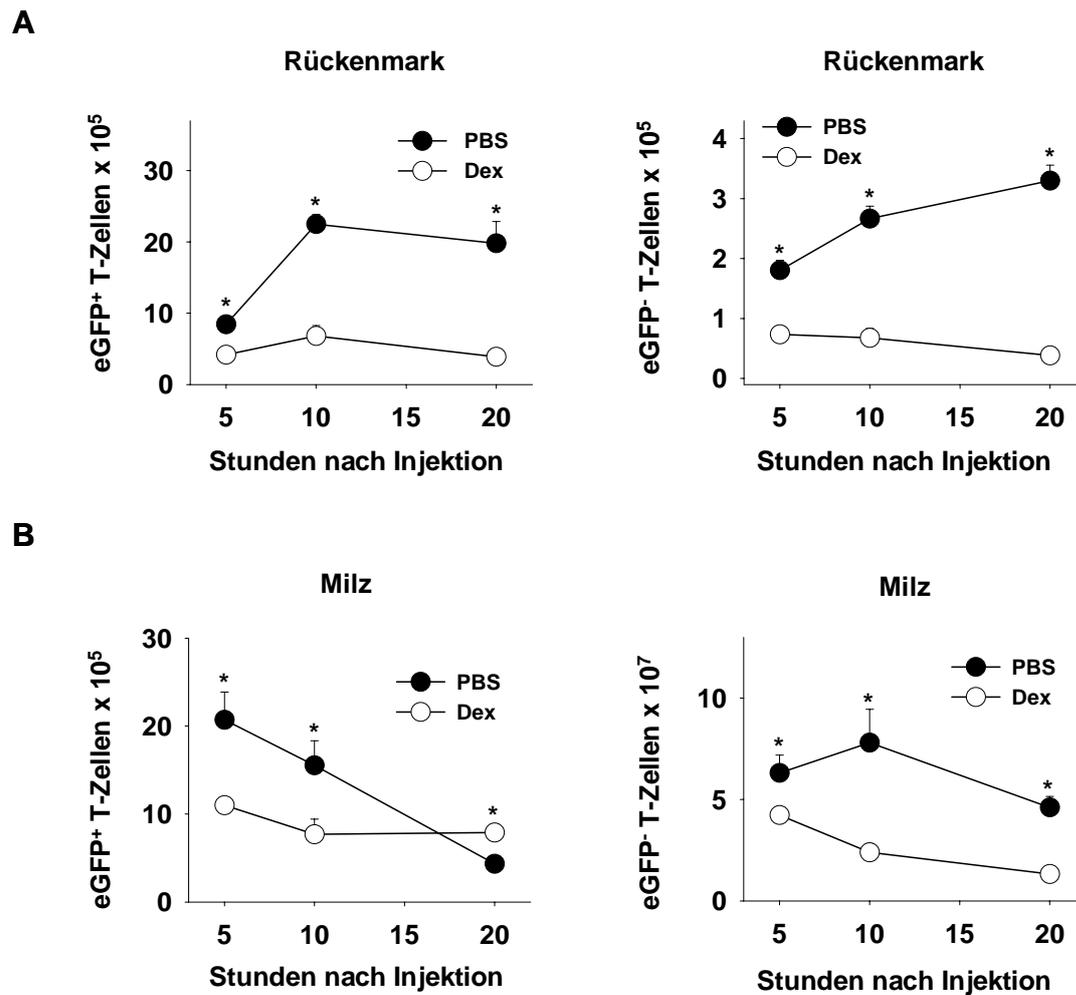
Obwohl sich der Krankheitsverlauf Dex behandelte Tiere am Tag nach der Injektion noch leicht verschlechterte, zeigte sich im Vergleich zu der Kontrollgruppe bereits zu dem Zeitpunkt ein Therapieerfolg, da diese einen höheren Krankheitsgrad aufwiesen. Ab diesem Zeitpunkt verbesserte sich der Krankheitsverlauf Dex injizierter Tiere kontinuierlich, während PBS behandelte Tiere zwischen Tag 5 und 6 ein Krankheitsmaximum erreichten und nur sehr langsam zu ihrem Ausgangszustand zurückkehrten (**Abb. 4-17 A**). Einen ersten Hinweis für die Ursache dieses schnellen

Therapieerfolges lieferte die histologische Analyse von zervikalen Rückenmarksschnitten. Schon 20 h nach der Injektion von Dexamethason war die Anzahl an T Lymphozyten im Rückenmark im Vergleich zu der Kontrollgruppe drastisch reduziert (**Abb. 4-17 B**).

Für die verminderte Anzahl an T-Zellen im Rückenmark nach der Behandlung mit einer hohen Dosis an Glukokortikoiden kommen folgende Prozesse in Frage: die Induktion von Apoptose, Effekte auf die Bluthirnschranke und die Beeinflussung der Migrationsfähigkeit von Lymphozyten zum Entzündungsort (Reichardt et al., 2006). Im Folgenden wurde untersucht, welchen Beitrag diese Prozesse zum Therapieerfolg von Glukokortikoiden erbringen.

#### **4.3.2 Glukokortikoide induzieren gleichermaßen Apoptose in pathogenen und konventionellen T-Zellen**

Zunächst wurde analysiert, inwieweit Glukokortikoide Apoptose in pathogenen und konventionellen T-Zellen induzieren und ob sich beide Lymphozytensubpopulationen in ihrem Apoptoseverhalten voneinander unterscheiden. Hierfür wurde die Anzahl sowie die Bindung von AnnexinV an Phosphatidylserin auf der Oberfläche eGFP<sup>+</sup> enzephalitogener und eGFP<sup>-</sup> Bystander T Lymphozyten im Rückenmark und der Milz verglichen.



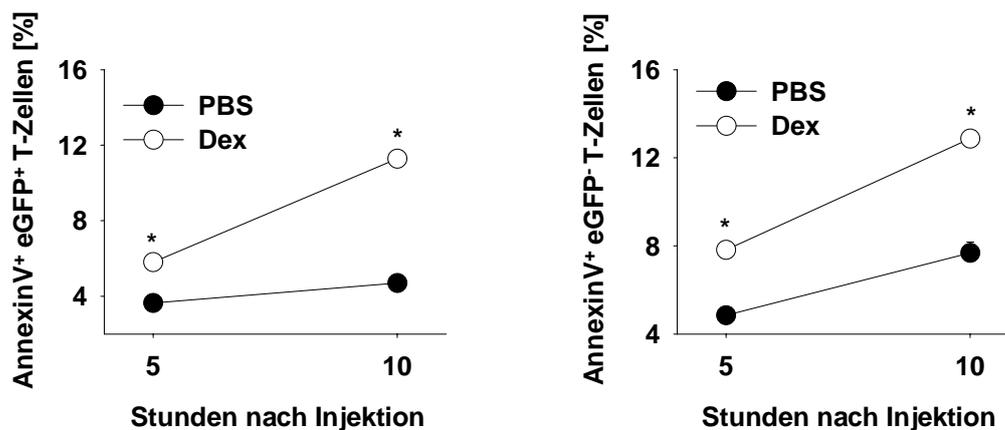
**Abb. 4-18** Enzephalitogene und Bystander T-Zellen im Rückenmark und der Milz nach der Therapie mit Glukokortikoiden. Eine AT-EAE wurde durch die Injektion eGFP<sup>+</sup> enzephalitogener T-Zellen in weiblichen Lewis Ratten induziert und die Tiere drei Tage später mit PBS oder 20 mg/kg Dexamethason behandelt. **A** Dargestellt ist die Anzahl eGFP<sup>+</sup> enzephalitogener-T Zellen und eGFP<sup>-</sup> Bystander T-Zellen im Rückenmark. n = 4 pro Gruppe. **B** Gezeigt ist die Anzahl eGFP<sup>+</sup> enzephalitogener T-Zellen und eGFP<sup>-</sup> Bystander T-Zellen in der Milz. n = 4 pro Gruppe. Statistik: Mann Whitney U Test. \*  $P \leq 0,05$ . Das Experiment wurde mit ähnlichen Ergebnissen reproduziert.

Bereits 5 h nach Injektion von Dexamethason war im Rückenmark sowohl die Anzahl eGFP<sup>+</sup> enzephalitogener als auch eGFP<sup>-</sup> Bystander T-Zellen signifikant erniedrigt (**Abb. 4-18 A**). Auch zu einem späteren Zeitpunkt kam es im Gegensatz zu PBS behandelten Tieren zu keiner weiteren Erhöhung der Zellzahl.

Wie im Rückenmark führte in der Milz die Verabreichung von Dex nach 5 h zu einer starken Reduktion enzephalitogener und konventioneller T-Zellen (**Abb. 4-18 B**). Während die Menge konventioneller T-Zellen in Dex behandelten Tieren über den gesamten Beobachtungszeitraum (bis 20 h nach der Injektion) im Vergleich zu der

Kontrollgruppe erniedrigt blieb, stellte sich die Situation bei den pathogenen T Lymphozyten ganz anders dar. Erstaunlicherweise befanden sich 20 h nach Injektion von Dexamethason in der Milz mehr enzephalitogene T-Zellen als in der von Tieren, denen PBS injiziert worden war.

Wie bereits erwähnt kommt als eine Ursache für die Reduktion des Rückenmarkinfiltrates nach der Behandlung mit Dexamethason die Induktion von Apoptose in Frage. Diese Möglichkeit wurde durch eine Inkubation der Zellen mit AnnexinV überprüft.



**Abb. 4-19 Apoptose in enzephalitogenen und Bystander T-Zellen im Rückenmark nach der Therapie mit Glukokortikoiden.** T-Zellen PBS oder Dex behandelter Ratten wurden aus dem Rückenmark isoliert und auf frühe Apoptoseanzeichen mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die Betrachtung wurde entweder auf lebende eGFP<sup>+</sup> enzephalitogene oder lebende eGFP<sup>-</sup> konventionelle T-Zellen beschränkt und der Prozentsatz AnnexinV<sup>+</sup> T-Zellen unter diesen Lymphozytenpopulationen ermittelt. n = 4 pro Gruppe. Statistik: Mann Whitney U Test. \*  $P \leq 0,05$ . Das Experiment wurde mit ähnlichen Ergebnissen reproduziert.

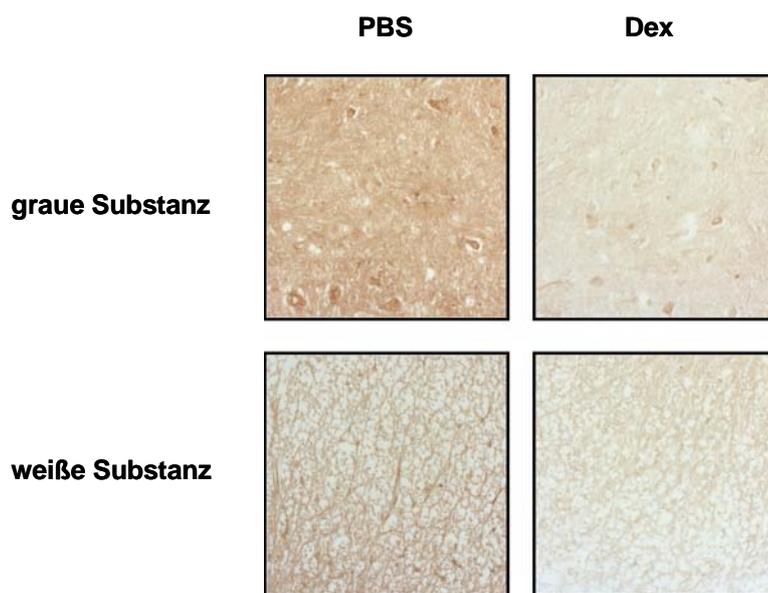
Bereits 5 h nach der Injektion von Dexamethason war der Anteil apoptotischer T-Lymphozyten sowohl unter enzephalitogenen als auch unter Bystander T-Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöht. Dieser Trend setzte sich fort und nach 10 h hatte sich die Apoptoserate ausgehend vom 5 h Zeitpunkt sogar verdoppelt (**Abb. 4-19**).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass Dexamethason gleichermaßen Apoptose in enzephalitogenen T-Zellen und Bystander T-Zellen induziert, da sich zum einen die Zellzahl beider Lymphozytenpopulationen nach der Verabreichung von Dexamethason gleichermaßen reduziert und zum anderen sich die Prozentsätze AnnexinV<sup>+</sup> T-Zellen unter T<sub>enz</sub> und T<sub>bys</sub> Zellen ähneln. Demzufolge besteht ein

Wirkungsmechanismus von Glukokortikoiden in der Induktion von Apoptose in pathogenen und konventionellen T-Zellen.

### 4.3.3 Dexamethason inhibiert die Öffnung der Bluthirnschranke

Die Öffnung der Bluthirnschranke wird durch in das Rückenmark migrierte pathogene T-Zellen vermittelt, welche proinflammatorische Zytokine und Mediatoren freisetzen und dadurch eine Entzündungsreaktion hervorrufen. Neben der Induktion von Apoptose können Glukokortikoide auch auf die Permeabilität der Bluthirnschranke wirken und eine weitere Zerstörung ihrer Integrität inhibieren (Paul and Bolton, 1995). Aus diesem Grund wurde die Integrität der Bluthirnschranke in einer AT-EAE nach der Verabreichung von PBS bzw. Dexamethason miteinander verglichen.



**Abb. 4-20 Integrität der Bluthirnschranke bei einer AT-EAE nach Verabreichung von Dexamethason.** 20 h nach der Verabreichung von Dexamethason oder PBS wurden histologische Schnitte vom zervikalen Enden des Rückenmarks gewonnen und mit einem Anti-Albumin Antikörper gefärbt. Die Zerstörung der Bluthirnschrankenintegrität wurde mittels Immunoperoxidase visualisiert. Dargestellt ist die graue und weiße Substanz weiblicher Ratten, die mit PBS oder Dexamethason behandelt worden waren.

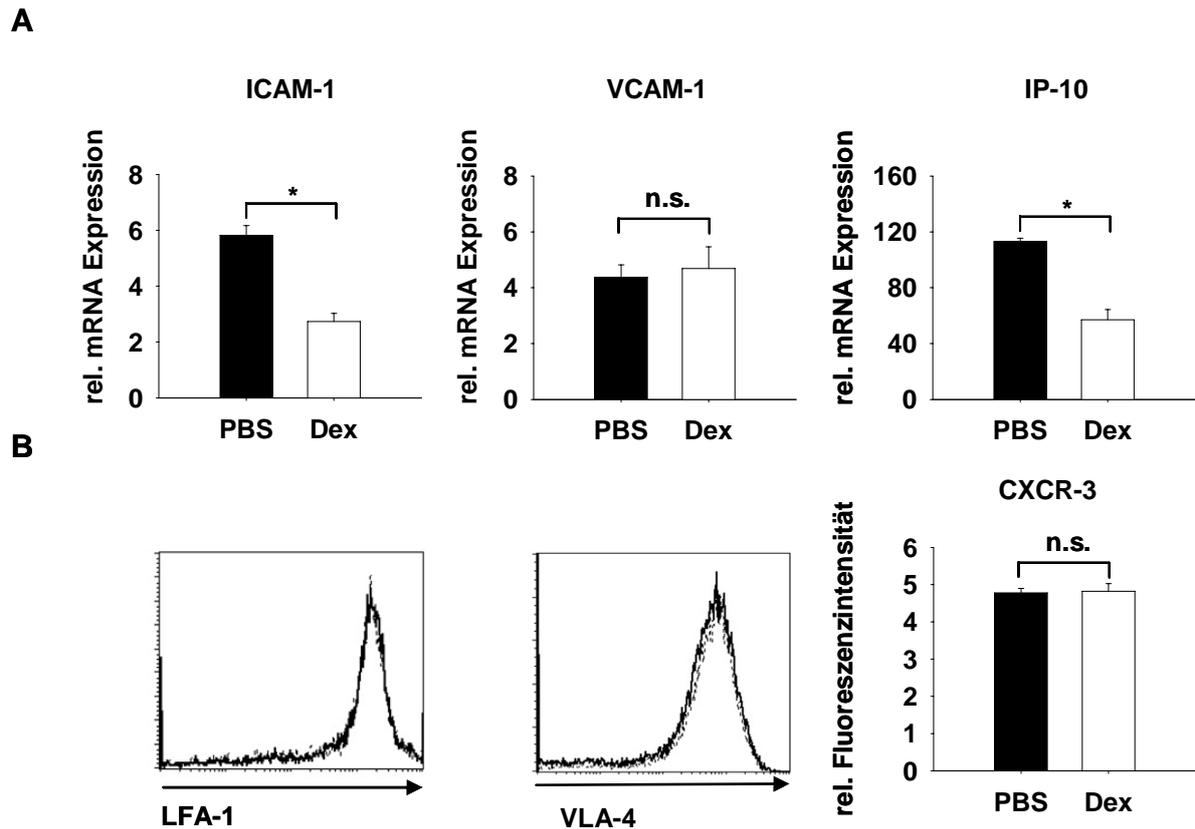
Nach der Verabreichung von Dexamethason war die Integrität der Bluthirnschranke im Vergleich zu PBS behandelten Tieren weniger zerstört (**Abb. 4-20**). Dies kommt

durch die schwächere braune Anfärbung von Albumin in der weißen und grauen Substanz Dex injizierter Ratten zum Ausdruck.

Es stellt sich nun die Frage, worin die Ursache für die verminderte Öffnung der Bluthirnschranke nach der Verabreichung von Glukokortikoiden liegt. Zunächst könnte dies ein direkter Effekt von Glukokortikoiden auf das Endothel sein (Romero et al., 2003), was in *in vivo* Modellen aber nur schwer nachweisbar ist. Möglich wäre auch, dass durch die Verminderung enzephalitogener T-Zellen die Entzündungsreaktion im ZNS abklingt und die Integrität der Bluthirnschranke durch die vermindert sekretierten pro-inflammatorischen Zytokine wiederhergestellt wird. Dafür spricht, dass durch die Induktion von Apoptose tatsächlich die Anzahl an T-Zellen im Rückenmark nach der Verabreichung von Dexamethason stark reduziert ist. Als weitere Möglichkeit kommt aber auch die Inhibierung der Migration pathogener T Zellen in das Rückenmark in Frage. Inwieweit dieser Mechanismus zur Verbesserung des Krankheitsverlaufes beitragen kann, wurde als nächstes untersucht.

#### **4.3.4 Glukokortikoide inhibieren die Expression von Adhäsionsmolekülen und Chemokinen im Rückenmark nicht aber ihrer Liganden auf enzephalitogenen T-Zellen**

Chemokine, Adhäsionsmoleküle und ihre Liganden sind für die Extravasation pathogener T-Zellen in das ZNS notwendig (Engelhardt, 2006) und in früheren Studien konnte gezeigt werden, dass sie mögliche Ziele von Glukokortikoiden darstellen (Engelhardt, 2000). Eine verminderte Expression dieser Moleküle könnte den Eintritt enzephalitogener T Lymphozyten ins ZNS inhibieren und dadurch zur Aufrechterhaltung der Bluthirnschranke und zum Therapieerfolg von Glukokortikoiden beitragen. Daher wurde die Expression von ICAM-1, VCAM-1 und IP-10 im Rückenmark sowie LFA-1, VLA-4 und CXCR-3 auf enzephalitogenen T-Zellen untersucht.



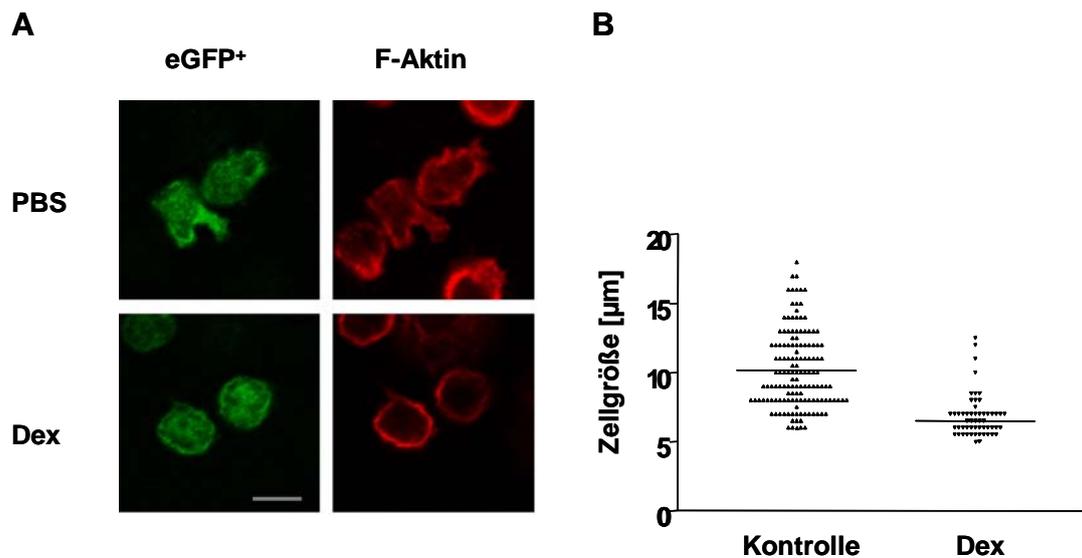
**Abb. 4-21 Expression von Adhäsionsmolekülen und Chemokinen im Rückenmark sowie ihrer Liganden auf enzephalitogenen T-Zellen nach der Behandlung einer AT-EAE mit Dexamethason oder PBS.** 10 h nach der Verabreichung von Dexamethason oder PBS wurden die Tiere getötet und das Rückenmark entnommen. Aus einem kleinen Stück vom zervikalen Ende des Rückenmarks wurde die RNA extrahiert und aus dem Rest das Leukozyteninfiltrat isoliert. **A** Die relative mRNA Expression von VCAM-1, ICAM-1 und IP-10 wurde mittels Real-Time PCR analysiert. **B** Die Expression von VLA-4 und LFA-1 auf enzephalitogenen T-Zellen wurde mittels Durchflusszytometrie untersucht. Die Histogrammdarstellungen beziehen sich auf lebende eGFP<sup>+</sup> enzephalitogene T-Zellen. Die Expression von CXCR-3 auf enzephalitogenen T-Zellen wurde durch konfokale Mikroskopie untersucht, indem die Zellen mit Antikörpern gegen eGFP und CXCR-3 inkubiert wurden. Dargestellt ist die Fluoreszenzintensität von CXCR-3 auf eGFP<sup>+</sup> enzephalitogenen T-Zellen. n = 3 - 4 pro Gruppe. Statistik: Mann Whitney U test, \*  $P \leq 0,05$ .

Nach der Verabreichung von Dexamethason war im Rückenmark nur die Expression von ICAM-1 und IP-10 nicht aber von VCAM-1 signifikant im Vergleich zu den Kontrolltieren reduziert (**Abb. 4-21**). Keine Unterschiede hingegen ergaben sich für ihre Liganden LFA-1, CXCR-3 und VLA-4 auf enzephalitogenen T-Zellen. Somit ist in diesem Versuchsansatz die Wirkung von Glukokortikoiden auf die Expression von Chemokinen und Adhäsionsmolekülen im Rückenmark beschränkt. Ein direkter Einfluss von Glukokortikoiden auf die Migrationsfähigkeit enzephalitogener T-Zellen

über eine Reduktion von Adhäsionsmolekülen auf ihrer Oberfläche ist daher unwahrscheinlich. Die beobachtete verminderte Expression von ICAM-1 und IP-10 im Rückenmark kann sowohl durch direkte Effekte von Glukokortikoiden z. B. durch die Transrepression von Genen oder sekundär aus der durch die Eliminierung enzephalitogener T-Zellen verminderten Entzündungsreaktion resultieren. Inwieweit die beiden zuletzt erwähnten Mechanismen zur Wiederherstellung der Bluthirnschrankeintegrität beitragen, kann durch die vorliegenden Ergebnisse nicht festgestellt werden.

#### **4.3.5 Glukokortikoide induzieren morphologische Veränderungen enzephalitogener T-Zellen *in vivo* und *in vitro***

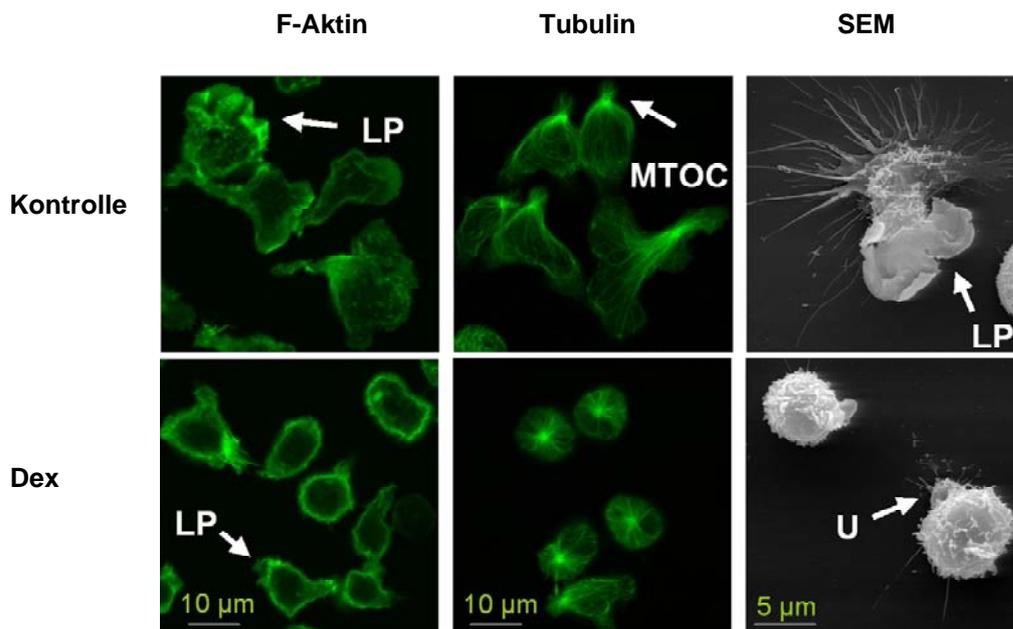
Obwohl Glukokortikoide keinen Einfluss auf die Expression von Integrinen und Chemokinen auf enzephalitogenen T-Zellen haben, bedeutet dies nicht, dass sie nicht auf andere Art und Weise ihre Migration und die Infiltration des Rückenmarks inhibieren. Hierfür spricht, dass schon 5 h nach der Injektion von Dexamethason die Anzahl enzephalitogener T-Zellen im Rückenmark erniedrigt war (**Abb. 4-18**). Aufgrund der Kürze der Zeit ist allerdings unwahrscheinlich, dass Apoptose alleine für die Reduktion eGFP<sup>+</sup> enzephalitogener T-Zellen verantwortlich ist. Neben Adhäsionsmolekülen trägt auch die Zellmorphologie für die Migration zum Entzündungsort bei (Friedl und Brocker, 2000). Aktivierte T-Zellen sind durch eine starke Polymerisation von F-Aktin charakterisiert, die zu einer Polarisierung der Zelle führt. Das vordere Ende zeichnet sich durch einen vorstehenden großflächigen Lamellopoden aus, dem am entgegen gesetzten Ende ein Uropod gegenüber steht. Dafür verantwortlich ist auch das Mikrotubulinorganisationszentrum (MTOC), welches nach Aktivierung der Zellen im Uropoden lokalisiert ist (Samstag et al., 2003). Um zu untersuchen, ob Glukokortikoide die Migrationsfähigkeit pathogener T-Zellen durch Effekte auf ihre Morphologie beeinflusst werden könnte, wurden enzephalitogene T-Zellen im Rückenmark nach der Verabreichung von Dexamethason oder PBS miteinander verglichen.



**Abb. 4-22 Zellgröße und Morphologie encephalitogener T-Zellen im Rückenmark nach der Behandlung einer AT-EAE mit Dexamethason oder PBS.** **A** 20 h nach der Verabreichung von Dexamethason oder PBS wurde das Rückenmarkinfiltrat isoliert und die Verteilung von F-Aktin in eGFP<sup>+</sup> encephalitogenen T-Zellen nach der Inkubation mit einem anti-GFP Antikörpern und fluorochromkonjugiertem Phalloidin mittels konfokaler Mikroskopie analysiert. **B** Die Zellgröße encephalitogener T-Zellen wurde bestimmt, indem der Durchmesser von einem Pol zum entgegengesetzten gemessen wurde. Balken = 5  $\mu\text{m}$ .

Encephalitogene T-Zellen im Rückenmark PBS behandelter Tiere besaßen die charakteristische Morphologie aktivierter Effektorlymphozyten. Die Zellen waren polarisiert und wiesen eine starke Polymerisation von F-Aktin auf (**Abb. 4-22**). Im Gegensatz dazu ähnelten encephalitogene T-Zellen Dex injizierter Tiere ruhenden T-Zellen. Sie hatten sich abgerundet und F-Aktin bildete nur noch eine Ringstruktur um die Zelle. Ihre Größe reduzierte sich etwa um etwa die Hälfte im Vergleich zu den Kontrolltieren.

Um dieses Phänomen näher zu untersuchen, wurden die Analysen auf *in vitro* Experimente ausgedehnt. Hierfür wurden encephalitogene T-Zellen in der An- oder Abwesenheit von  $10^{-7}$  M Dexamethason für 3 h kultiviert. Anschließend wurde die Polymerisation von F-Aktin, die Lokalisation des MTOC sowie die Morphologie der Zelle mittels konfokaler und Raster-Elektronenmikroskopie untersucht.



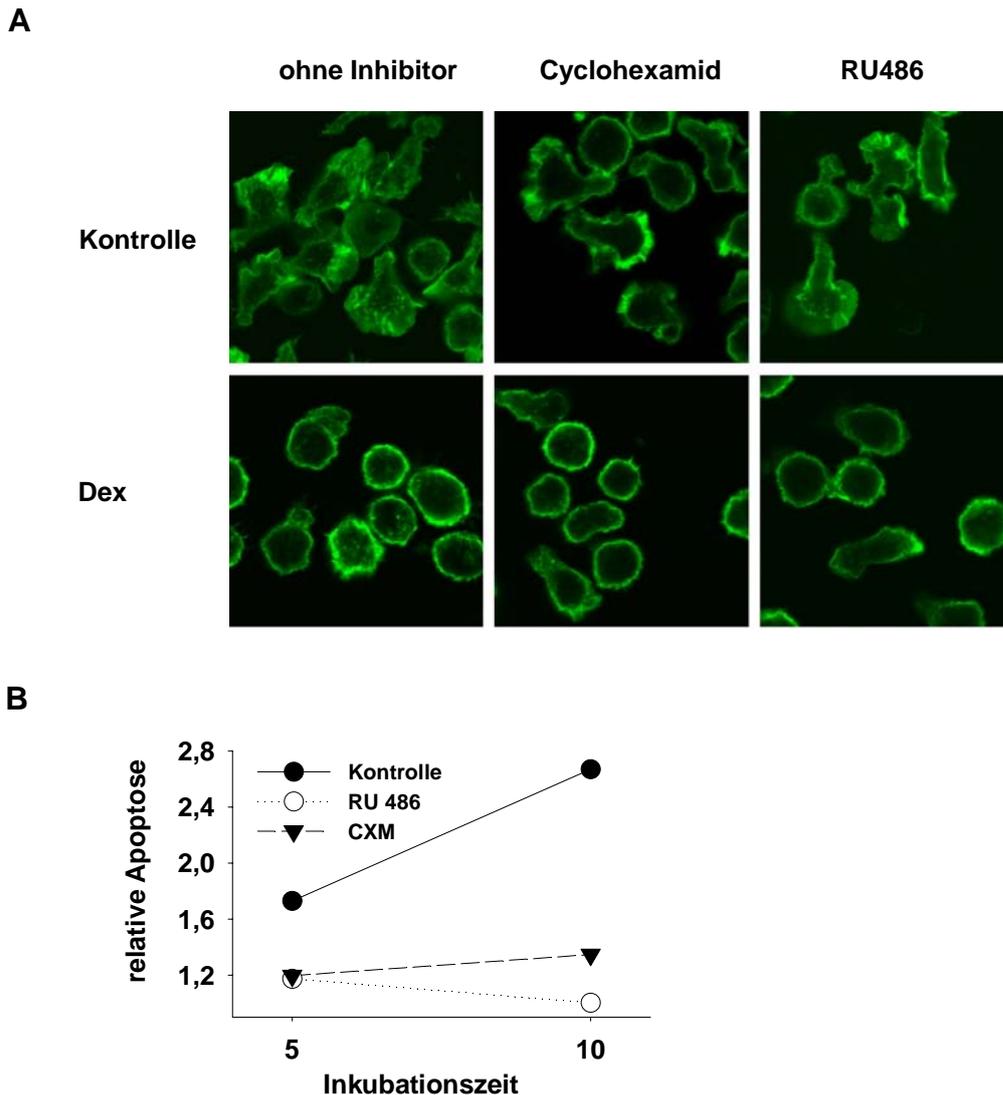
**Abb. 4-23 Zellmorphologie enzephalitogener T-Zellen nach einer Kultivierung in der An- bzw. Abwesenheit von Dexamethason.** Enzephalitogene T-Zellen wurden mit oder ohne  $10^{-7}$  M Dexamethason für 3 h kultiviert. Anschließend wurde die Verteilung von F-Aktin und die Lage des MTOC durch konfokale Mikroskopie bestimmt. Die Zellmorphologie wurde zusätzlich mittels Raster-Elektronenmikroskopie analysiert.

Wie *in vivo* zeichneten sich enzephalitogene T-Zellen in der Kontrollkultur durch die Morphologie aktivierter Lymphozyten aus (**Abb. 4-23**). F-Aktin war polymerisiert, was eine Polarisierung der Zellen bedingte. Raster-elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigen die Unterteilung der Zellen in ein vorderes Ende, gekennzeichnet durch den Lamellopoden, und einen hinteren Pol mit einem Uropoden. In diesen ist das MTOC verlagert, welches lange Mikrotubulifortsätze in den Lamellopod entsendet. Nach der Kultur mit Dexamethason hingegen hatten enzephalitogene T-Zellen ihre polarisierte Struktur verloren. Der Lamellopod hatte sich fast vollständig zurückgebildet und nur noch ein kleiner Rest des Uropoden war zu erkennen. Ebenso war F-Aktin nur noch am Rand als Ring lokalisiert und das MTOC befand sich nicht mehr im Uropoden sondern im Zentrum der Zelle.

Glukokortikoide führen also zu einer Depolarisierung von enzephalitogenen T-Zellen und könnten dadurch ihre Migration ins des Rückenmarks inhibieren.

#### **4.3.6 Die Depolarisation enzephalitogener T-Zellen wird durch nicht-genomische Effekte von Glukokortikoiden verursacht**

Das Erstaunliche an den zuvor gemachten Beobachtungen ist, dass sie schon nach einer dreistündigen Kultivierung in der Anwesenheit von Glukokortikoiden auftraten. Dies spricht für einen nicht-genomischen Effekt, welche zuvor vor allem bei hohen Glukokortikoidkonzentrationen beobachtet worden waren (Buttgereit et al., 2005). Auszuschließen war bis jetzt allerdings nicht, dass es sich beim durch Dexamethason verursachten Abrunden enzephalitogener T-Zellen eventuell um ein frühes Apoptosemerkmal handelte. Um zu ermitteln, welcher Mechanismus für die Depolarisation enzephalitogener T-Zellen verantwortlich ist, wurden die Zellen vor der Zugabe von Dexamethason mit Inhibitoren behandelt, die das Auftreten genomischer Effekte verhindern sollen. Folgende Substanzen kamen dabei zum Einsatz: Der GR-Antagonist RU486, welcher die Transaktivierung von Genen unterdrückt, und der Translationsinhibitor Cyclohexamid. Diese Reagenzien verhindern u. a. auch die durch Dexamethason induzierte Apoptose, da hierfür sowohl die Transaktivierung von als auch die Translation von Genen erforderlich sind (Herold et al., 2006). Depolarisieren enzephalitogene T-Zellen in der Anwesenheit von Inhibitoren sowie Dexamethason, und sind keine Anzeichen für Apoptose (Bindung von AnnexinV an Phosphatidylserin) zu erkennen, sind dies wichtige Hinweise für nicht-genomischen Effekt.



**Abb. 4-24 Nicht-genomische Effekte von Glukokortikoiden auf enzephalitogene T-Zellen. A** Enzephalitogene T-Zellen blieben unbehandelt oder wurden entweder mit 5 µg/ml Cyclohexamid oder  $10^{-7}$  M RU486 für 30 Minuten inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in der An- bzw. Abwesenheit von  $10^{-7}$  M Dexamethason für 3 h kultiviert. Die Zellmorphologie sowie die Verteilung von F-Aktin in enzephalitogenen T-Zellen wurden durch konfokale Mikroskopie analysiert. **B** Nach 5 und 10 h wurde die Induktion von Apoptose mittels AnnexinV-Bindung analysiert. Die relative Apoptose wurde berechnet, indem der Prozentsatz apoptotischer Zellen aus der Kontrollkultur durch den Prozentsatz apoptotischer Zellen aus dem Dexamethasonansatz dividiert wurde.

Tatsächlich induzierte Dexamethason eine Abrundung und eine Depolymerisierung von F-Aktin in enzephalitogenen T-Zellen trotz der Zugabe von Cyclohexamid oder RU486. Hierfür waren nicht die Inhibitoren verantwortlich, da in der Kontrollkultur ohne Dexamethason in allen drei Ansätzen die polarisierte Zellmorphologie enzephalitogener T-Zellen erhalten blieb. Zudem verhinderten die Inhibitoren das Auftreten Dex-induzierter Apoptose. Während in der Kontrollkultur (ohne Inhibitoren)

---

die relative Apoptoserate nach 5 und 10 h sich nahezu verdoppelt hatte, änderte sich der Anteil apoptotischer Zellen in der Gegenwart der Inhibitoren nicht. Bei der durch Dexamethason induzierten Depolarisation enzephalitogener T-Zellen handelt es sich also nicht um ein frühes Anzeichen von Apoptose. Vielmehr wird dies durch einen neuartigen genomischen Effekt bewirkt, der unabhängig von der Translation und wahrscheinlich auch vom Glukokortikoidrezeptor arbeitet.

## 5 Diskussion

### 5.1 Aktivierung und Expansion regulatorischer T-Zellen *in vivo* mittels des $\alpha$ -CD28 superagonistischen Antikörpers JJ316

Es ist allgemein akzeptiert, dass regulatorische T-Zellen für die Homeostase des Immunsystems sowie die Unterdrückung von Autoimmunerkrankungen notwendig sind (Wing et al., 2005). In vielen Autoimmunerkrankungen ist sowohl die Anzahl als auch die Funktion regulatorischer T-Zellen eingeschränkt (Aoki et al., 2005; Viglietta et al., 2004). Ansätze, die zur Aktivierung und Expansion regulatorischer T-Zellen führen, stellen somit eine elegante Möglichkeit zur Therapie von Autoimmunerkrankungen dar. In der EAE, einem Tiermodell für Multiple Sklerose wurden durch die Verabreichung des  $\alpha$ -CD28 superagonistischen Antikörpers JJ316 endogene regulatorische T-Zellen aktiviert und expandiert, was zu einer Verbesserung des Krankheitsverlaufes führte (Beyersdorf et al., 2005). Über den Wirkungsort sowie den Suppressionsmechanismus regulatorischer T-Zellen ist bisher allerdings nur wenig bekannt.

Hier konnte gezeigt werden, dass durch JJ316 aktivierte und expandierte regulatorische T-Zellen das Ausbrechen einer EAE verhindern bzw. abmildern, indem sie die Infiltration des Rückenmarks durch enzephalitogene T-Zellen inhibieren. Für die Suppression enzephalitogener T-Zellen ist eine Migration regulatorischer T-Zellen in das Rückenmark nicht notwendig. Vielmehr interferieren sie mit pathogenen T-Zellen in sekundären lymphatischen Organen, indem sie die Ausschüttung von IFN- $\gamma$  inhibieren. Dies führt zu einer reduzierten Expression von CXCR-3, einem Chemokinrezeptor, der für die Migration und Infiltration des Rückenmarks durch enzephalitogene T-Zellen verantwortlich ist. Die verminderte Expression von CXCR-3 auf pathogenen T-Zellen stellt somit einen Wirkungsmechanismus dar, durch den aktivierte regulatorische T-Zellen den Krankheitsverlauf einer EAE aber auch anderer Autoimmunerkrankungen verbessern können.

Sowohl durch die Expansion von regulatorischen T-Zellen *in vivo* als auch durch deren adoptiven Transfer kann auf den Krankheitsverlauf von Autoimmunerkrankungen eingewirkt werden (Beyersdorf et al., 2005; Mottet et al., 2003; Sakaguchi et al., 1995). Allerdings ist bisher nur wenig sowohl über ihren Wirkungsort als auch Mechanismus bekannt. Ebenso unterscheiden sich die

Beobachtungen abhängig von dem Versuchsmodell oder den gewählten Bedingungen. Das Wirken regulatorischer T-Zellen wurde sowohl an der Entzündungsstelle z. B. im Pankreas (Green et al., 2002), Gelenk (Morgan et al., 2005) oder im Gehirn (Kleinewietfeld et al., 2005) aber auch in sekundären lymphatischen Organen (Denning et al., 2005) beobachtet.

Nach der Verabreichung von JJ316 findet die Suppression enzephalitogener T-Zellen durch regulatorische T-Zellen hauptsächlich in sekundären lymphatischen Organen statt. Dafür sprechen die folgenden Beobachtungen.

An Tag 4 nach der Krankheitsinduktion hatte die Verabreichung von JJ316 zu einer Anreicherung enzephalitogener T-Zellen in der Milz geführt. Trotz allem kam es zu keiner gesteigerten Infiltration des Rückenmarks und die Anzahl an enzephalitogenen T-Zellen, Bystander T-Zellen und Makrophagen lag unter denen in den Kontrolltieren. Auch zu einem späteren Zeitpunkt wurde keine signifikante Erhöhung der Zellzahl beobachtet. Würde die Suppression am Entzündungsort, d. h. im Rückenmark stattfinden, müsste die Anzahl enzephalitogener T-Zellen zumindest zu Krankheitsbeginn der in PBS behandelten Tieren entsprechen. Vielmehr aber wurde die Migration enzephalitogener T-Zellen in das ZNS in sekundären lymphatischen Organen inhibiert. Dafür spricht auch, dass nach der Verabreichung von JJ316 die Integrität der Bluthirnschranke nach der Injektion von JJ316 weitgehend erhalten blieb.

Der Grund für die zuvor gemachten Beobachtungen liegt in der Aktivierung und Expansion regulatorischer T-Zellen in den sekundären lymphatischen Organen nach der Verabreichung von JJ316. Bis Tag 4 nach der Krankheitsinduktion hatte jedoch keine Migration regulatorischer T-Zellen in das Rückenmark statt gefunden. Die Kontrolltiere hingegen hatten zu diesem Zeitpunkt schon beinahe ihr Krankheitsmaximum erreicht, litten unter Lähmungserscheinungen und wiesen eine hohe Infiltration des Rückenmarks durch enzephalitogene T-Zellen auf. Daher ist es nicht möglich, dass die Suppression enzephalitogener T-Zellen zu diesem Zeitpunkt durch regulatorische T-Zellen am Entzündungsort geschieht. Vielmehr deuten die Ergebnisse auf ein Wirken regulatorischer T-Zellen in sekundären lymphatischen Organen hin.

Unterstützt wird dies auch durch Ergebnisse aus der therapeutischen Behandlung der AT-EAE mit JJ316. Zum Zeitpunkt der Verabreichung von JJ316 sind bereits enzephalitogene T-Zellen in das Rückenmark eingewandert und haben dort eine

Entzündungsreaktion hervorgerufen, was durch das Auftreten von ersten Lähmungserscheinungen zum Ausdruck kommt. Aber schon einen Tag nach der Injektion des Superagonisten, wird eine weitere Erhöhung der Zellzahl verhindert und es erfolgte eine rasche Genesung der Tiere. Eine Migration bzw. Anreicherung regulatorischer T-Zellen im Rückenmark hat bis zu diesem Zeitpunkt allerdings nicht statt gefunden. Zwar kommt es wie im prophylaktischen Therapieansatz zu einer Aktivierung und Expansion regulatorischer T-Zellen in der Milz, aber auch im späteren Krankheitsverlauf wird kein signifikanter Anstieg regulatorischer T-Zellen im Rückenmark beobachtet. Somit kommen als Hauptwirkungsort von regulatorischen T-Zellen nur die sekundären lymphatischen Organe in Frage.

In den vorherigen Abschnitten wurde postuliert, dass es nach der prophylaktischen Verabreichung von JJ316 bis einschließlich Tag 4 nach der Krankheitsinduktion zu keiner Anreicherung regulatorischer T-Zellen im Rückenmark kommt und daher sich die Suppression autoreaktiver Lymphozyten in sekundären lymphatischen Organen ereignet. Im späteren Krankheitsverlauf kann man dieser These nicht mehr vollkommen zustimmen, denn ab Tag 6 steigt die Anzahl regulatorischer T-Zellen immer mehr im Rückenmark JJ316 behandelte Tiere an. Die gleiche Beobachtung wurde auch nach dem Transfer eGFP<sup>+</sup> regulatorischer T-Zellen als Indikatorzellen und der Injektion von JJ316 gemacht. Wie lässt sich dies erklären? Eine Voraussetzung für die Migration regulatorischer T-Zellen in das Rückenmark ist die vorherige Aktivierung durch JJ316 und das gleichzeitige Vorherrschen einer Entzündungsreaktion im ZNS: Die Anreicherung von regulatorischen T-Zellen wurde nur in Tieren beobachtet, in denen sowohl eine AT-EAE induziert als auch JJ316 verabreicht worden war. PBS behandelte Tiere leiden zwar unter einer Entzündungsreaktion, aber ihre T<sub>reg</sub> Zellen sind nicht ausreichend für eine Suppression enzephalitogener T-Zellen aktiviert. Die alleinige Verabreichung von JJ316 aktiviert und expandiert zwar regulatorische T-Zellen, aber ohne das Vorhandensein enzephalitogener T-Zellen im Rückenmark wandern sie nicht dorthin. Darin könnte eine Erklärung für die verzögerte Migration regulatorischer T-Zellen zum Entzündungsort liegen. Zu Krankheitsbeginn reicht die Entzündung im Rückenmark nicht als Einwanderungsreiz für regulatorische T-Zellen aus, um dorthin zu wandern. Würde sich die Entzündung im späteren Krankheitsverlauf verstärken, könnte dies regulatorische T-Zellen anlocken. Dass dem so ist, wird durch experimentelle Daten belegt (vergleiche 4.1.1 und 4.1.2). Obwohl sich an Tag 4 nur

sehr wenige enzephalitogene T-Zellen im Rückenmark JJ316 behandelter Tiere befinden, nimmt die Anzahl pathogener T-Zellen danach im geringen Umfang zu. Dies führt zu einer Verstärkung der Entzündungsreaktion, was sich auch in einer gesteigerten Öffnung der Bluthirnschranke äußert. Gleichzeitig beginnen regulatorische T-Zellen sich im Rückenmark anzureichern. Ihre Anwesenheit dort könnte ein verzögertes Ausbrechen von EAE Symptomen verhindern und erklären, weshalb die Tiere über den gesamten Beobachtungszeitraum (18 Tage) gesund bleiben.

Man könnte nun einwenden, dass im therapeutischen Versuchsansatz eine Entzündung im Rückenmark besteht und die regulatorischen T-Zellen durch JJ316 aktiviert sind, aber trotz allem keine Infiltration des Rückenmarks durch regulatorische T-Zellen stattfindet. Es könnte sein, dass es sich bei den regulatorischen T-Zellen in den sekundären lymphatischen Organen und denjenigen am Entzündungsort um unterschiedliche Subpopulationen handelt. So inhibieren  $\alpha_E^-$  CD25<sup>+</sup> regulatorische T-Zellen die Expansion naiver T Lymphozyten in drainierenden Lymphknoten;  $\alpha_E^+$  CD25<sup>+</sup> regulatorische T-Zellen hingegen wirken am Entzündungsort in der Haut (Siegmond et al., 2005). Letztere benötigen aber eine längere Induktionszeit und treten vor allem im späteren Krankheitsverlauf auf. Der Unterschied zwischen der prophylaktischen und therapeutischen Verabreichung von JJ316 liegt sowohl in der Verabreichungszeit als auch der Einwirkungszeit auf regulatorische T-Zellen. Nach der therapeutischen Behandlung mit JJ316 werden die Tiere schon einen Tag nach der Injektion analysiert. Dieser Zeitraum könnte zur Induktion von regulatorischen T-Zellen, die zum Entzündungsort wandern, nicht ausreichen. Im Vergleich dazu beobachtet man eine Anreicherung regulatorischer T-Zellen im prophylaktischen Versuchsansatz erst 5 Tage (Tag 6 nach der Krankheitsinduktion) nach der Injektion von JJ316. Das Ausbleiben regulatorischer T-Zellen im Rückenmark therapeutisch mit JJ316 behandelter Tiere, könnte also damit erklärt werden, dass bis dahin noch keine T<sub>reg</sub> Zellen angereichert worden waren, die präferentiell zum Entzündungsort migrieren.

Weshalb bleiben sie aber auch zu späteren Zeitpunkten dem Rückenmark fern? Eventuell sind die im Rückenmark verbleibenden enzephalitogenen T-Zellen im späten Krankheitsverlauf nicht mehr in der Lage eine ausreichend starke Entzündung hervorzurufen, um dadurch regulatorische T-Zellen anzulocken. Die letzte Phase der EAE ist durch eine Verbesserung des Krankheitsverlaufes und eine Verminderung

der Entzündung im Rückenmark gekennzeichnet, da in den pathogenen T-Zellen Apoptose induziert wird (Schmied et al., 1993). Dies könnte auch auf die restlichen enzephalitogenen T-Zellen im Rückenmark therapeutisch behandelte Tiere zutreffen, insbesondere da eine weitere Infiltration „neuer“ enzephalitogener T-Zellen sofort nach der Injektion von JJ316 gestoppt wird und sich danach ihre Anzahl reduziert. Als Erklärungen für das Ausbleiben regulatorischer T-Zellen im Rückenmark nach einer therapeutischen Verabreichung von JJ316 kommen somit zum einen ein zu geringer Zeitraum zur Anreicherung von  $T_{reg}$  Zellen, die präferentiell zum Entzündungsort wandern, und zum anderen die mangelnde Fähigkeit enzephalitogener T-Zellen noch eine Entzündung im späteren Krankheitsverlauf hervorzurufen, in Frage. Für eine genaue Beantwortung dieser Fragestellung sind allerdings noch weitere Untersuchungen notwendig.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass durch JJ316 aktivierte regulatorische T-Zellen zunächst enzephalitogene T-Zellen in sekundären lymphatischen Organen inhibieren, was durch eine verminderte Infiltration des Rückenmarks durch enzephalitogene T-Zellen zum Ausdruck kommt. Verstärkt sich im späteren Krankheitsverlauf die Entzündung im Rückenmark, könnten durch JJ316 aktivierte regulatorische T-Zellen auch dort zu einer weiteren Unterdrückung von Krankheitssymptomen beitragen.

Neben dem Wirkungsort wurde auch der Suppressionsmechanismus regulatorischer T-Zellen untersucht. In der Vergangenheit wurde eine Vielzahl an Mechanismen vorgeschlagen, durch die andere Lymphozyten supprimiert werden können (von Boehmer, 2005). Dazu zählen sowohl Zell-Zellkontakte z. B über CTLA-4, aber auch Zytokine wie IL-10 oder TGF- $\beta$ . Nach der Verabreichung von JJ316 wurde ein allgemeiner  $T_H2$ -Shift hervorgerufen, was sich durch die erhöhte Sekretion von IL-4 und IL-10 äußerte. IL-10 wird neben  $T_H2$  Zellen auch von regulatorischen T-Zellen produziert (Ito et al., 2007). Im Gegensatz dazu wird zwar kein IL-4 von regulatorischen T-Zellen hergestellt, aber es ist in der Lage, deren suppressorische Effizienz zu steigern (Maerten et al., 2005). Die wichtigste Erkenntnis aber ist die reduzierte Freisetzung von IFN- $\gamma$  durch enzephalitogene T-Zellen nach Injektion von JJ316. IFN- $\gamma$  zählt zu den wichtigsten  $T_H1$  Effektorzytokinen, welche einen hohen Beitrag zur Induktion und der Pathogenität von EAE und Multipler Sklerose leisten (Moldovan et al., 2003; Yura et al., 2001). Ein Eingriff in diese Mechanismen, kann zu einer Verbesserung des Krankheitsverlaufes beitragen. Dass für die reduzierte

Menge an IFN- $\gamma$  regulatorische T-Zellen verantwortlich sind, wird durch andere Studien unterstützt. Eine reduzierte Produktion von IFN- $\gamma$  durch Effektorlymphozyten konnte auch *in vitro* nach Kokultivierung mit regulatorischen T-Zellen festgestellt werden (Baecher-Allan et al., 2001). Ebenfalls wurde in einem EAN-Modell eine verminderte Anzahl IFN- $\gamma$  produzierender CD4<sup>+</sup> T Lymphozyten nach der Behandlung mit JJ316 beschrieben (Schmidt et al., 2003a). In einigen Studien hatte die Reduktion von IFN- $\gamma$  jedoch nicht zu einer Verbesserung, sondern zu einer Verschlechterung des Krankheitsverlaufes geführt (Ferber et al., 1996; Willenborg et al., 1999). Teilweise wurden in diesen Modellen Knockout Stämme verwendet (Chu et al., 2000), d.h. es fand überhaupt keine Produktion von IFN- $\gamma$  statt. Im vorliegenden Versuchsansatz allerdings war die Menge an IFN- $\gamma$  zwar stark reduziert aber nicht vollkommen unterdrückt. Dies könnte den Unterschied zu anderen Untersuchungen erklären. Außerdem muss man bedenken, dass sich die verschiedenen Tiermodelle in vielen Aspekten unterscheiden. Dies kann die Anfälligkeit für EAE, den Krankheitsverlauf oder die Art der Zellen, durch welche EAE induziert wird, betreffen.

Welcher Zusammenhang besteht nun zwischen der verminderten Freisetzung von IFN- $\gamma$  und der eingeschränkten Migration enzephalitogener T-Zellen zum Rückenmark? IFN- $\gamma$  ist für die Induktion des Chemokinrezeptors CXCR-3 verantwortlich. Dieser Rezeptor wird vornehmlich auf T<sub>H</sub>1 Lymphozyten sowie pathogenen Effektorzellen exprimiert und vermittelt deren Migration in entzündetes Gewebe (Liu et al., 2005). In vielen Autoimmunerkrankungen exprimieren gewebeinfiltrierende Lymphozyten CXCR-3, z. B. in Diabetes mellitus Typ 1 (Sarween et al., 2004) aber auch in der Multiplen Sklerose (Sorensen et al., 2002). Die Expression dieses Rezeptors auf pathogenen Lymphozyten spielt somit eine wichtige Rolle für die Infiltration des Zielgewebes sowie die Induktion und Entwicklung einer Entzündungsreaktion. Die Reduktion von IFN- $\gamma$  könnte eine verminderte Expression von CXCR-3 zur Folge haben und dadurch die Infiltration des Zielgewebes behindern. Darin liegt auch eine Erklärung für die gestörte Migration enzephalitogener T-Zellen in das Rückenmark. Neben der stark verminderten Freisetzung von IFN- $\gamma$  ist sowohl die Intensität als auch die Häufigkeit CXCR-3<sup>+</sup> enzephalitogener aber auch CXCR-3<sup>+</sup> konventioneller T-Zellen nach der Verabreichung von JJ316 reduziert. Regulatorische T Zellen könnten somit die

Migration enzephalitogener T Zellen in das Rückenmark inhibieren, indem sie zu einer verminderten Expression von CXCR-3 führen.

Als nächstes stellt sich die Frage, ob für die beobachteten Effekte von JJ316 tatsächlich regulatorische T-Zellen verantwortlich sind, oder ob dies vielmehr durch die direkte Wirkung des Superagonisten auf enzephalitogene T-Zellen verursacht wird. Bereits in früheren Studien konnte gezeigt werden, dass ausschließlich durch den Transfer JJ316 aktivierter regulatorischer T-Zellen der Krankheitsverlauf einer EAE verbessert wird (Beyersdorf et al., 2005). In Mäusen, in denen regulatorische T-Zellen erfolgreich depletiert worden waren, wurde kein Therapieerfolg mit anti-CD28 superagonistischem Antikörper erzielt (interne Kommunikation). Aber auch in der Ratte wurde gezeigt, dass JJ316 keine direkte Inhibierung enzephalitogener T-Zellen bewirkt, sondern sie im Gegenteil sogar aktiviert. Obwohl enzephalitogene T-Zellen nach der Injektion von JJ316 nicht mehr in das Rückenmark wandern, erhöht sich die Expression der Aktivierungsmarker CD25 und CD134. *In vitro* stimuliert JJ316 sogar die Proliferation enzephalitogener T-Zellen. Ebenso wird nach der Kultivierung mit JJ316 kein  $T_H2$  Shift in den Zellen induziert, denn es werden weiterhin hohe Mengen des  $T_H1$  Zytokins  $IFN-\gamma$  produziert, während die typischen  $T_H2$  Zytokine IL-4 und IL-10 nicht nachweisbar sind. Aufgrund der unveränderten Synthese von  $IFN-\gamma$  bleibt auch die Expression von CXCR-3 gleich. Damit kann ausgeschlossen werden, dass die verminderte Expression von CXCR-3 auf der Oberfläche durch die direkte Bindung von JJ316 an enzephalitogene T-Zellen verursacht wird. Außerdem konnte gezeigt werden, dass es sich bei den in Tiere transferierten Zellen um eine reine Population handelt und diese nicht durch regulatorische T-Zellen verunreinigt waren. Auch nach einer Kultivierung in Gegenwart von JJ316 steigt der Prozentsatz FoxP3 exprimierender Zellen nicht weiter an. JJ316 ist demzufolge per se nicht in der Lage, enzephalitogene T-Zellen in regulatorische T-Zellen zu verwandeln. Die positiven Effekte auf den Krankheitsverlauf einer EAE nach der Verabreichung von JJ316 können daher nur von der Aktivierung und Expansion endogener regulatorischer T-Zellen resultieren und nicht aus der direkten Wirkung des Superagonisten auf enzephalitogene T-Zellen.

Weshalb insbesondere regulatorische T-Zellen nach der Verabreichung von JJ316 aktiviert und in Vergleich zu anderen Lymphozytenpopulationen überproportional expandiert werden, ist bis jetzt noch nicht genau geklärt. Diskutiert wird, dass dies mit der Homeostase regulatorischer T-Zellen zusammenhängt. Regulatorische T-

Zellen sind die einzigen Zellen die kontinuierlich CD25 (IL2R $\alpha$ ) (Wing et al., 2005) auf ihrer Oberfläche exprimieren, weshalb sie sehr schnell freigesetztes IL-2 binden und darauf reagieren können. IL-2 wird zwar nicht für die Entwicklung regulatorischer T-Zellen benötigt, ist aber zum Erhalt ihrer Homeostase und ihrer Fitness *in vivo* notwendig (Fontenot et al., 2005). So wird auch das autoimmune lymphoproliferative Syndrom, unter welchem IL-2- bzw. IL-2R-defiziente Mäuse leiden, durch einen Mangel und Funktionsverlust regulatorischer T-Zellen erklärt. Eine ebenso wichtige Rolle für regulatorische T-Zellen spielen Signale durch CD28, die für die Entwicklung regulatorischer T-Zellen im Thymus und das Überleben in der Peripherie unabkömmlich sind. Des Weiteren wird durch CD28 die Produktion und Freisetzung von IL-2 durch CD4<sup>+</sup>CD25<sup>low/-</sup> konventionelle T-Zellen induziert. Es wird vermutet, dass durch CD28-Superagonisten diese beiden Achsen aktiviert und verstärkt werden. Man nimmt an, dass durch die Bindung des Superagonisten konventionelle aber auch autoreaktive T-Zellen aktiviert werden, was zu einer erhöhten Produktion von IL-2 führt. Dieses induziert dann zusammen mit einem starken CD28 Signal durch die Bindung des Superagonisten die Aktivierung und Expansion regulatorischer T-Zellen. Die Suppression konventioneller und autoreaktiver T-Zellen durch regulatorische T-Zellen führt zu einem Erlöschen der IL-2 Quelle, was wiederum zur Apoptose der expandierten T<sub>reg</sub> Zellen und einer Wiederherstellung der Ausgangszahl führt (Hünig und Dennehy, 2005). Demzufolge resultiert die Aktivierung und Expansion regulatorischer T-Zellen nach der Verabreichung eines CD28 superagonistischen Antikörpers aus der Generierung eines starken aktivierenden Signals in T<sub>reg</sub> Zellen selbst und aus der Induktion von IL-2 in CD4<sup>+</sup>CD25<sup>low/-</sup> T-Zellen. Allerdings sind zur Verifizierung dieses Modells noch weiterführende Studien notwendig.

Während CD28-spezifische Antikörper wie JJ316 erfolgreich zur Behandlung von Autoimmunerkrankungen im Tiermodell eingesetzt werden konnten (Beyersdorf et al., 2005; Rodriguez-Palmero et al., 2006; Schmidt et al., 2003a), schlug die Verabreichung eines humanisierten Antikörpers in einer klinischen Phase I Studie fehl. Im Gegensatz zu den Tiermodellen traten verheerende Nebenwirkungen nach Injektion einer niedrigen Konzentration auf. Kurz nach der Injektion wurde in den Patienten ein Zytokinsturm beobachtet, der u. a. zu einem Multiorganversagen führte. Die genauen Ursachen für die unterschiedlichen Ergebnisse im Tier und im Menschen sind noch nicht geklärt, wobei eine Verunreinigung ausgeschlossen

werden kann. Eventuell fand eine schnellere und stärkere Aktivierung konventioneller Lymphozyten statt, bevor dies durch regulatorische T-Zellen hätte unterdrückt werden können. Diese These wird durch vorläufige Ergebnisse aus Ratten, denen JJ316 injiziert worden war, unterstützt. Wie in den Probanden (Suntharalingam et al., 2006) wurde in den Ratten kurz nach der Verabreichung von JJ316 die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine und eine Lymphopenie im peripheren Blut beobachtet. Allerdings verläuft die Reaktion in den Tieren nach außen weit milder als im Menschen. Für die Lymphopenie könnte man die verminderte Expression von Edg-1 auf Lymphozyten verantwortlich machen. Dieser Rezeptor ermöglicht Leukozyten den Egress aus den sekundären lymphatischen Organen (Chiba et al., 2006) und wird ebenso nach der Kostimulation von Lymphozyten vermindert auf ihrer Oberfläche exprimiert (Graeler und Goetzl, 2002). Da es sich bei JJ316 um einen kostimulatorischen Antikörper handelt, könnte die starke Aktivierung der Lymphozyten zu einer Abnahme von Edg-1 geführt haben und dadurch die Lymphopenie verursacht haben. Inwieweit noch andere Prozesse daran beteiligt sind, sollte noch durch weiterführende Experimente, die nicht Gegenstand dieser Arbeit sind, geklärt werden.

Trotz allem konnte in dieser Studie gezeigt werden, dass eine polyklonale Aktivierung regulatorischer T-Zellen einen sinnvollen Therapieansatz zur Behandlung von Multipler Sklerose oder anderer Autoimmunerkrankungen darstellen könnte. Dies kann möglicherweise durch andere Substanzen mit weniger schädlichen Nebenwirkungen erreicht werden. Beispiele hierfür sind die gleichzeitige Verabreichung von Dexamethason und IL-2 (Chen et al., 2006), die Kostimulation über CD52 durch den monoklonalen Antikörper 4C8 (Watanabe et al., 2006), die Verabreichung eines anti-CD3 Antikörpers (Kohm et al., 2005), die Antikörperverstärkte Therapie mit IL-2 (Boyman et al., 2006) und der Einsatz eines Vitamin D Rezeptor-Liganden (Adorini, 2003).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass nach der prophylaktischen und therapeutischen Verabreichung des anti-CD28 superagonistischen Antikörpers JJ316 regulatorische T-Zellen in sekundären lymphatischen Organen aktiviert sowie expandiert werden, was zur Inhibierung enzephalitogener T-Zellen und einer verminderten Infiltration des Rückenmarks führt. Erreicht wird dies durch eine Einschränkung der Migrationsfähigkeit enzephalitogener T-Zellen, indem die Produktion von IFN- $\gamma$  und die Expression des Chemokinrezeptors CXCR-3 auf der

Zelloberfläche reduziert wird. Dies erklärt die positiven Effekte der polyklonalen  $T_{reg}$  Zellaktivierung und Expansion in einem Tiermodell für Multiple Sklerose nach der Verabreichung eines anti-CD28 superagonistischen Antikörpers.

## 5.2 Therapie einer EAE mit hohen Dosen MBP

In vorangegangenen Studien wurde durch die Verabreichung hoher Dosen Antigen in der Abwesenheit von Adjuvans eine Verbesserung des Krankheitsverlaufes in Autoimmunerkrankungen erzielt (Critchfield et al., 1994; Gold et al., 1997). Erreicht wird dies durch die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine, insbesondere  $TNF-\alpha$ , was zur Induktion von Apoptose führt (Weishaupt et al., 2000a; Weishaupt et al., 2000b). Bis jetzt konnte allerdings nicht festgestellt werden, welche Zellen – enzephalitogene und/oder konventionelle T-Zellen – das Ziel der Apoptose sind. In dieser Studie konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass spezifisch pathogene nicht aber konventionelle T-Zellen durch die Antigentherapie mittels Apoptose eliminiert werden. In früheren Studien wurde dies zwar vermutet, aber ein definitiver Beweis konnte bisher nicht erbracht werden. So wurde gezeigt, dass nach der Verabreichung hoher Dosen MBP vermehrt Apoptose in  $V\beta 8.2^+$  T-Zellen gemessen wurde (Ishigami et al., 1998). Allerdings wird diese TZR-Variante auch von konventionellen T-Zellen exprimiert, die nicht autoreaktiv sind (Chan et al., 1999; Gold et al., 1997). Ebenso binden andere TZR-Varianten z. B.  $V\beta 3.3$  an MBP (Chan et al., 1999), die unter diesen Umständen nicht erfasst wurden. Aus diesem Grund konnte in diesen Experimenten keine definitive Schlussfolgerung über das Apoptoseverhalten pathogener und konventioneller T-Zellen nach einer Antigentherapie getroffen werden. Dieses Problem konnte durch den Einsatz  $eGFP^+$  enzephalitogener T-Zellen umgangen werden, da eine genaue Differenzierung zu den  $eGFP^-$  konventionellen T-Zellen möglich ist. Zwar sind auch unter den  $eGFP^+$  enzephalitogenen T-Zellen  $V\beta 8.2$  (30%) und  $V\beta 3.3$  (13%) TZR-Subtypen angereichert, aber auch T Lymphozyten mit anderen als den eben genannten TZR-Varianten sind vorhanden (eigene Beobachtungen, Daten nicht gezeigt). Diese würden bei der Verwendung  $eGFP^-$  enzephalitogener T-Zellen bei der Analyse mittels TZR-Antikörpern unberücksichtigt bleiben. Durch den Einsatz  $eGFP^+$

enzephalitogener T-Zellen konnte hier gezeigt werden, dass die Antigentherapie tatsächlich zellspezifisch ist.

In vielen Therapiestrategien ist der genaue Wirkungsmechanismus der eingesetzten Medikamente nur unzureichend bekannt oder unerwünschte Nebenwirkungen treten als Begleiterscheinung auf (Fontoura et al., 2006). In der EAE konnten mit der Verabreichung hoher Dosen Antigen ein Therapieerfolg erzielt werden, allerdings waren die Zielzellen der Therapie unbekannt (Weishaupt et al., 1997; Weishaupt et al., 2000b). Nun wurde festgestellt, dass ausschließlich in autoreaktiven enzephalitogenen und nicht in konventionellen T-Zellen Apoptose induziert wird. Damit wäre eine selektivere und gezieltere Behandlung als mit anderen immunregulatorischen Medikamenten wie z. B. IFN- $\beta$  möglich (Rio and Montalban, 2005). Ebenso könnten dadurch unerwünschte Nebenwirkungen auf andere Immunzellen, wie sie z. B. bei der Therapie mit alternativen immunsuppressorischen Medikamenten auftreten (Hemmer et al., 2006), vermieden werden.

Antigenbasierende Therapieansätze zur Behandlung von Multipler Sklerose im Menschen wurden bereits getestet. Die dabei verfolgten Strategien zielten auf die Induktion von Toleranz in autoreaktiven T-Zellen ab. Dies sollte entweder durch die orale Verabreichung von Myelinantigenen oder der Injektion von APL (Altered Peptide Ligand) geschehen. In beiden klinischen Phase III Studien wurden jedoch negative Ergebnisse erzielt (Hohlfeld und Wiendl, 2001) und die APL Studie musste wegen der Nebenwirkungen sogar abgebrochen werden (Kappos et al., 2000). Zurzeit wird untersucht, ob die T-Zellantwort durch Vakzinierung mit einem Myelinantigen kodierenden DNA-Plasmid unterdrückt werden kann (Lobell et al., 2003). Obwohl die antigenbasierenden Therapieansätze im Menschen bis jetzt keinen Erfolg zeigten, bedeutet dies noch nicht das Ende der Antigentherapie. Die im Menschen verfolgten Strategien zielen auf die Induktion von Toleranz ab, während in unserem Versuchsansatz die Zellen spezifisch durch Apoptose eliminiert wurden. Hinzu kommt, dass man das oder die Antigene, durch welche die Immunantwort in der Multiplen Sklerose ausgelöst wird, nicht kennt. Ob daher bei der vorliegenden Strategie ähnliche Nebenwirkungen auftreten würden, bedarf näherer Untersuchungen. Auf jeden Fall stellt die spezifische Suppression bzw. Beseitigung autoreaktiver T-Zellen eine attraktive Option zur Behandlung von Multipler Sklerose dar.

### 5.3 Glukokortikoidtherapie der AT-EAE

Die Behandlung akuter MS Schübe mit Glukokortikoiden gehört zu den gängigsten Therapiestrategien. An 3 – 5 aufeinander folgenden Tagen wird den Patienten 20 – 50 mg/kg Methylprednisolon intravenös verabreicht (Grauer et al., 2001). Da es bei einer abrupten Beendigung der Therapie häufig zu einer Verschlechterung des Krankheitsbildes kam, werden die Patienten anschließend einer oralen Glukokortikoidtherapie mit abnehmenden Konzentrationen unterzogen (orales Ausschleichen). Obwohl diese Therapieform zu einer Verbesserung des Krankheitsbildes führt, kommt es zu keiner vollständigen Genesung der Patienten. Zudem leiden sie häufig unter Nebenwirkungen. Eine effektivere Behandlung mit weniger schädlichen Begleiterscheinungen wäre daher wünschenswert. Dies ist allerdings nur dann möglich, wenn man mehr über den Wirkungsmechanismus von Glukokortikoiden in Erfahrung bringt.

Theorien über die Wirkweise von Glukokortikoiden in der Multiplen Sklerose sind vielfältig und umfassen die Induktion von Apoptose (Gold et al., 2001), Effekte auf die Bluthirnschranke (de Boer und Gaillard, 2006), eine allgemeine Immunsuppression (Goodkin, 1994) und die Einschränkung der Migrationsfähigkeit von Leukozyten durch eine verminderte Expression von Adhäsionsmolekülen (Engelhardt, 2000). Ein Problem, welches sich bei vielen Studien ergab, ist die fehlende Möglichkeit zwischen pathogenen und konventionellen T Lymphozyten zu unterscheiden. Dies verhindert eine exakte Verifizierung der Effekte von Glukokortikoiden auf diese Zellen. Durch die Verwendung eGFP<sup>+</sup> enzephalitogener T-Zellen konnte in dieser Studie dieses Problem umgegangen werden. So konnte gezeigt werden, dass der therapeutische Erfolg von Glukokortikoiden aus dem Zusammenspiel verschiedener Effekte beruht.

Nach der Verabreichung von Dexamethason erholen sich die Tiere sehr schnell wieder von den Krankheitssymptomen und die Anzahl des T-Zellinfiltrates im Rückenmark ist drastisch reduziert. Ein Grund liegt hierfür in der Induktion von Apoptose, was durch Beobachtungen aus früheren Studien untermauert wird. Generell sorgen Glukokortikoide, die während der Entzündungsreaktion einer AT-EAE freigesetzt werden, für die Beseitigung autoreaktiver Lymphozyten aus dem Rückenmark, was zu einer Genesung der unter EAE leidenden Tiere führt (Chang et al., 2003). Im Gegensatz dazu verläuft die Krankheit in adrenaletomierten Tieren

viel schneller und schwerer (Smith et al., 1996, eigene unveröffentlichte Daten). Diese Eigenschaft von Glukokortikoiden hat man sich für die Therapie von Autoimmunerkrankungen zu Nutze gemacht. So erhöht sich die Apoptoserate unter Blutleukozyten nach einer Glukokortikoidtherapie von MS Patienten (Leussink et al., 2001). Auch im Tiermodell steigt die Anzahl apoptotischer T-Zellen *in situ* abhängig von der Dosis nach der Verabreichung von Methylprednisolon an (Schmidt et al., 2000). In einer Studie wurde postuliert, dass sich autoreaktive und andere Lymphozytenpopulationen in ihrem durch Glukokortikoide induzierten Apoptoseverhalten voneinander unterscheiden könnten (McCombe et al., 1996). Allerdings wurden in dieser Untersuchung ausschließlich  $V\beta 8.2^+$  T-Zellen als enzephalitogene T-Zellen definiert, was nach dem heutigen Stand des Wissens jedoch nicht mehr als Unterscheidungskriterium ausreicht (Gold et al., 1995). Aufgrund der eGFP Expression enzephalitogener T-Zellen konnte hier gezeigt werden, dass sowohl enzephalitogene als auch konventionelle T-Zellen durch Apoptose aus dem ZNS beseitigt werden und sie sich nicht in ihrem Apoptoseverhalten voneinander unterscheiden. Dexamethason macht also in Bezug auf die Induktion von Apoptose keinen Unterschied zwischen autoreaktiven und konventionellen T-Zellen.

Wie lässt es sich jedoch erklären, dass in der Milz 20 h nach der Verabreichung von Dexamethason mehr enzephalitogene T-Zellen als in der Kontrollgruppe zu finden sind? Apoptose reicht hier als alleinige Ursache nicht aus. Zur Auslösung einer Entzündungsreaktion im Rückenmark müssen enzephalitogene T-Zellen zunächst die Bluthirnschranke durchqueren, welche unter normalen Umständen das ZNS vor dem systemischen Immunsystem schützt. Diese besteht aus Endothelzellen sowie den Fußenden der Astrozyten und Perizyten. Die Endothelzellen des ZNS unterscheiden sich von anderen dadurch, dass sie keine Fenestration enthalten, jedoch ausgedehnte Tight junctions und ein spezifisches Transportsystem (Ballabh et al., 2004) besitzen. In vielen Studien wurde ein Einfluss von Glukokortikoiden auf die Bluthirnschranke beobachtet (Gaillard et al., 2001; Orchinik et al., 1991; Paul and Bolton, 1995; Wolkowitz et al., 1990). Auch in dieser Untersuchung war die Integrität der Bluthirnschranke in Dex behandelten Tieren weniger in Mitleidenschaft gezogen. Der genaue Mechanismus, durch den Glukokortikoide zur Bewahrung oder Wiederherstellung der Bluthirnschrankenintegrität beitragen ist nicht bekannt. Direkte Effekte von Glukokortikoiden auf die Bluthirnschranke konnten in *in vitro* Modellen

gezeigt werden. In kultivierten Gehirndothelzellen führte Dexamethason zu einer Abnahme der Poren, der Konzentrierung von F-Aktin und Cortactin an der Zellperipherie sowie zu einer vermehrten Expression von ZO-1 und Occludin (Förster et al., 2005; Förster et al., 2006; Romero et al., 2003). Welche Rolle diese Prozesse *in vivo* spielen, ist bis jetzt noch ungeklärt, was u. a. auch daran liegt, dass die Analyse dieser Mechanismen im Tiermodell schwierig ist. Neben direkten Effekten von Glukokortikoiden auf die Bluthirnschranke kann ihre Integrität auch durch sekundäre Wirkungen wiederhergestellt werden. Zum Zusammenbruch der Bluthirnschranke kommt es normalerweise nur, nachdem pathogene T-Zellen in das ZNS eingewandert sind und dort durch die Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen und Mediatoren eine Entzündungsreaktion hervorgerufen haben (Engelhardt, 2006b). Folglich müsste das Abklingen der Entzündung, z. B. durch die Eliminierung von autoreaktiven T-Zellen aus dem ZNS, die Integrität der Bluthirnschranke wieder herstellen. Dies könnte auch in dieser Untersuchung stattgefunden haben. Nach der Verabreichung von Dexamethason wurde in den enzephalitogenen T-Zellen im Rückenmark Apoptose induziert und die Bluthirnschranke war weniger weit geöffnet. Wahrscheinlich stellen Glukokortikoide die Integrität sowohl durch direkte als auch indirekte Effekte wieder her. Welche Wirkungsmechanismen hierbei überwiegen, konnte bis jetzt nicht ermittelt werden.

Neben der Wirkung auf die Bluthirnschranke wird angenommen, dass Glukokortikoide auch auf die Fähigkeit pathogener T-Zellen in das ZNS einzuwandern Einfluss nehmen. Für die Extravasation von enzephalitogenen T-Zellen in das Rückenmark ist die Expression von Adhäsionsmolekülen und Chemokinen auf Endothelzellen sowie von Integrinen und Chemokinrezeptoren auf pathogenen T-Zellen notwendig (Engelhardt, 2006a). Nach der Verabreichung von Dexamethason beobachteten wir tatsächlich, dass die Expression von ICAM-1 und IP-10 im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant reduziert war. Keinen Einfluss hatten die Glukokortikoide hingegen auf die Expression von Integrinen und Chemokinrezeptoren auf enzephalitogenen T-Zellen. Ein Einfluss von Glukokortikoiden auf die Expression von Adhäsionsmolekülen auf T Lymphozyten wie ICAM-1 oder E-Selektin war in der Vergangenheit gezeigt worden, allerdings basieren diese Beobachtungen auf *in vitro* Studien in humanen Zelllinien und können daher nicht unbedingt auf die Situation *in vivo* übertragen werden (Dietrich, 2004). Ebenso waren die löslichen Mengen an VCAM-1 und E-Selektin in MS Patienten, die

mit Methylprednisolon behandelt worden waren, reduziert, was allerdings nichts über die Expression auf Lymphozyten aussagt (Elovaara et al., 2000). In früheren Untersuchungen war außerdem gefunden worden, dass die Menge von VLA-4 und LFA-1 auf Blutleukozyten nach einer Glukokortikoidtherapie vermindert war (Elovaara et al., 1998), allerdings konnte hier nicht zwischen konventionellen und autoreaktiven T-Zellen unterschieden werden. Auch ist nicht klar, inwieweit präapoptotische Zellen in die Analysen miteingeflossen sind, bei denen es ebenso zu einer verminderten Expression dieser Moleküle kommen kann. Eine reduzierte Expression von Integrinen und Chemokinrezeptoren auf enzephalitogenen T-Zellen ist somit als Erklärungsmöglichkeit für deren inhibierte Migrationsfähigkeit nach der Behandlung mit Glukokortikoiden fragwürdig. Trotz allem wurde jedoch eine verminderte Expression von Adhäsionsmolekülen im Rückenmark nachgewiesen. Ob dies durch einen direkten Effekt von Glukokortikoiden auf Endothelzellen oder aus einem Rückgang der Entzündung resultiert kann nicht festgestellt werden. Allerdings muss erwähnt werden, dass die Endothelzellen des Rückenmarks unter normalen physiologischen Bedingungen nur sehr wenig oder gar keine Adhäsionsmoleküle oder Chemokine exprimieren (Engelhardt, 2006b). Diese werden erst induziert, nachdem autoreaktive T-Zellen die Bluthirnschranke durchquert haben und nach der Antigenerkennung proinflammatorische Zytokine und Mediatoren freigesetzt haben. Die Expression dieser Moleküle wird also nur durch die Entzündungsreaktion im ZNS hervorgerufen. Durch die Beseitigung enzephalitogener T-Zellen aufgrund der Induktion von Apoptose bzw. durch eine vermindertes Nachströmen enzephalitogener T-Zellen in das Rückenmark erlischt die Quelle für proinflammatorische Mediatoren und damit der Auslöser für die Expression von Adhäsionsmolekülen und Chemokinen. Das Abklingen der Entzündung würde somit als Erklärung für die verminderte Expression von ICAM-1 und IP-10 im Rückenmark Dex behandelte Tiere ausreichen.

Obwohl Glukokortikoide in unserem Modell keinen Einfluss auf die Expression von Integrinen auf enzephalitogenen T-Zellen hatten, heißt dies nicht, dass sie nicht auf eine andere Art die Migrationsfähigkeit pathogener T-Zellen beeinflussen können. Für die Wanderung zum Entzündungsort spielt die Morphologie der Zelle eine wichtige Rolle (Friedl und Brocker, 2000). Aktivierte T-Zellen zeichnen sich durch eine polarisierte Struktur aus. Das vordere Ende ist durch einen großflächigen Lamellopod gekennzeichnet, dem am anderen Ende der Uropod gegenüber steht,

mit welchen sich die Zelle fortbewegt (Samstag et al., 2003). Ebenso zeichnen sich aktivierte Effektorzellen durch eine starke Polymerisierung von F-Aktin und eine Verlagerung des Mikrotubuliorganisationszentrum in den Uropoden aus, welches lange Mikrotubuli in den Lamellopoden entsendet (Sanchez-Madrid und del Polo, 1999). Nach der Verabreichung von Dexamethason hingegen ähnelten die enzephalitogenen T-Zellen sowohl *in vivo* als auch *in vitro* eher ruhenden als aktivierten Lymphozyten. Dies könnte ihre Migrationsfähigkeit in das ZNS reduzieren und eine zusätzliche Erklärung für die rasche Abnahme enzephalitogener T-Zellen im Rückenmark nach der Verabreichung von Dexamethason bieten. Ein Einfluss von Glukokortikoiden auf das Zytoskelett wurde bereits zuvor in anderen Untersuchungen beobachtet. Die erzielten Ergebnisse sind allerdings teilweise widersprüchlich. Ähnlich zu den hier gemachten Beobachtungen führte die Kultivierung einer Gehirndothelzelllinie in der Gegenwart von Dexamethason zu einer Verlagerung von filamentösem Aktin und Cortactin an die Zellperipherie (Romero et al., 2003). Auch Osteoblasten, die zusammen mit Dexamethason kultiviert worden waren, rundeten sich aufgrund des Zusammenbruches des Zytoskelettes ab (Hughes-Fulford et al., 1992). In einer anderen Studie verlangsamte sich nach einer Behandlung mit Methylprednisolon die Wundheilung in Endothelzellen aufgrund einer verzögerten Verlagerung des Zentrosoms in Richtung der Wundstelle (Fyfe et al., 1995). Eine gegensätzliche Beobachtung wurde hingegen in humanen Ishikawa endometrialen Zellen gemacht. 15 Minuten nach Zugabe von Dexamethason trat hier eine verstärkte Polymerisation von Aktin auf (Clark et al., 2005). Diese widersprüchlichen Ergebnisse könnten dadurch zustande gekommen sein, dass bei den Analysen verschiedene Zellarten zum Einsatz kamen und diese durch Glukokortikoide unterschiedlich beeinflusst wurden. Weitere Ursachen könnten in der Art des eingesetzten Glukokortikoids, die Konzentration und die Dauer der Kultivierung liegen.

Bezüglich der Frage, wie Dexamethason die Depolarisation enzephalitogener T-Zellen verursacht, können bislang nur Vermutungen angestellt werden. Generell unterscheidet man genomische und nicht-genomische Effekte von Glukokortikoiden. Als „genomisch“ werden solche Wirkungen definiert, die durch einen direkten Effekt auf das Genom – also über Transkription und Translation – vermittelt werden. Diese Prozesse sind u. a. vermutlich auch für die durch Glukokortikoide induzierte Apoptose verantwortlich. Im Gegensatz dazu versteht man unter „nicht-

genomischen“ Effekten diejenigen, bei denen der GR nicht mit dem Genom interagiert (Buttgereit et al., 2005). Außerdem treten nicht-genomische Effekte schon nach sehr kurzer Zeit und insbesondere bei hohen Glukokortikoidkonzentrationen auf (Buttgereit and Scheffold, 2002). Welcher dieser Effekte trifft nun auf die durch Dexamethason induzierte Depolarisation enzephalitogener T-Zellen zu? Die Versuchsergebnisse deuten auf einen nicht-genomischen Effekt hin. Dies wird durch folgende Beobachtungen unterstützt. Zunächst kommt es schon innerhalb kürzester Zeit zu einer Abrundung der Zellen. Effekte die über das Genom ablaufen, brauchen mehrere Stunden bis eine Auswirkung auf den Phänotyp der Zellen zu erkennen ist. Auch die Inhibierung der Translation durch Cyclohexamid kann eine Depolarisation enzephalitogener T-Zellen durch Dexamethason nicht verhindern. Wie oben bereits erwähnt, zeichnen sich genomische Effekte aber genau durch die Transkription und Translation von Genen aus. Die gleiche Beobachtung wurde gemacht, nachdem die Zellen vor der Zugabe von Dexamethason mit RU486 behandelt worden waren. RU486 bindet wie Dexamethason an den Glukokortikoidrezeptor und ist ebenso in der Lage in den Zellkern zu wandern. Allerdings ist die Bindung von Koaktivatoren an den Glukokortikoidrezeptor, was für die Transaktivierung von Genen notwendig ist, nicht mehr möglich. Damit kann ausgeschlossen werden, dass es sich beim Abrunden enzephalitogener T-Zellen um ein frühes Anzeichen von Apoptose handelt, da hierfür die Transaktivierung von Genen erforderlich wäre. Jedoch kann nach der Bindung von RU486 immer noch die Transrepression von Genen z. B. durch die Bindung an Transkriptionsfaktoren stattfinden (Heck et al., 1994). Da es nach der Inkubation mit RU486 aber nicht zu einer Abrundung der Zellen kommt, ist diese Möglichkeit auch unwahrscheinlich.

Das deutet darauf hin, dass es sich beim durch Glukokortikoide induzierten Abrunden der enzephalitogenen T-Zellen um einen nicht-genomischen Effekt handelt. Folgende Mechanismen wurden hierfür vorgeschlagen: die Bindung an einen membrangebundenen Glukokortikoidrezeptor, die Interaktion mit Signalprozessen mittels eines zytosolischen Glukokortikoidrezeptors und physikochemische Wechselwirkungen mit zellulären Membranen (Song et al., 2005).

Im ersten Konzept wird die Existenz eines membrangebundenen Glukokortikoidrezeptors (mGR) diskutiert. Dieser wurde bereits auf amphibischen neuronalen Membranen (Orchinik et al., 1991), Lymphomzellen (Gametchu et al., 1993) und humanen peripheren mononuklearen Blutzellen (Bartholome et al., 2004)

nachgewiesen. Nach der Stimulation von Monozyten wurde eine verstärkte Expression des mGR in der Membran beobachtet (Bartholome et al., 2004). Es wurde daher postuliert, dass nach einer starken Stimulation des Immunsystems beispielsweise durch eine Infektion die mGR Expression in Immunzellen wie Monozyten induziert wird, wodurch die Zellen anfälliger für durch mGR und Glukokortikoide induzierte Apoptose werden (Sackey et al., 1997). Mittels dieses negativen Rückkopplungsmechanismus könnte die Aktivität des Immunsystems verringert werden. Im vorliegenden Fall ist die Wirkung über einen membrangebunden Rezeptor eher unwahrscheinlich. Zum einen wurde vorgeschlagen, dass der mGR vor allem für eine bessere Apoptoseinduktion hochreguliert wird. Dieser Prozess steht allerdings in keinerlei Zusammenhang mit der hier beobachteten Depolarisation der Zellen. Hierfür würden eher Prozesse, die mit der Umlagerung des Zytoskelettes in Verbindung stehen, in Frage kommen. Im vorherigen Abschnitt wurde außerdem erwähnt, dass RU486 an den Glukokortikoidrezeptor bindet und dies von sich aus keine Abrundung enzephalitogener T-Zellen induziert. Nach der Zugabe von Dexamethason zu diesem Ansatz depolarisieren die Zellen jedoch. Da aber die meisten Bindungsstellen für Dexamethason auf dem Glukokortikoidrezeptor durch RU486 besetzt sind, müsste die Abrundung enzephalitogener T-Zellen dementsprechend ohne die Involvierung des Glukokortikoidrezeptors stattfinden. Aus diesem Grund scheint die Beteiligung eines mGR an der Depolarisation enzephalitogener T-Zellen sehr unwahrscheinlich. Selbst wenn in Anwesenheit von RU486 einige GR unbesetzt sind und an diese Dex binden würde, würde dies nicht für die Umlagerung des Zytoskelettes ausreichen. Als zweite Möglichkeit käme noch in Frage, dass der GR von einem anderen Gen kodiert wird und andere Bindungseigenschaften für Dex und RU486 aufweist. Hierfür sind allerdings noch weitere Untersuchungen nötig.

Aufgrund dessen ist auch die 2. Hypothese, welche die Interaktion des zytosolischen Glukokortikoidrezeptors (cGR) mit Signalprozessen postuliert, als Erklärungsmöglichkeit eher unwahrscheinlich. Es gibt zwei Möglichkeiten, wie nicht-genomische Effekte durch einen cGR vermittelt werden können. Der unaktivierte cGR ist im Zytoplasma mit einem Multiproteinkomplex assoziiert, welcher aus Hitzeschockproteinen und auch mehreren Kinasen des MAPK-Signalweges u. a. auch src besteht. Nach der Bindung von Glukokortikoiden dissoziiert dieser Komplex (Reichardt et al., 2006). Es wird nun angenommen, dass die freigesetzten Kinasen

durch die Interaktion mit ihrem Substrat nicht-genomische Effekte vermitteln (Croxtall et al., 2000). Es wäre aber auch möglich, dass der cGR nach der Bindung von Glukokortikoiden direkt mit einem Signalmolekül interagiert und dessen Aktivität moduliert, was u. a. für JNK und PI3K (Limbourg et al., 2002) gezeigt wurde. Dies steht im besonderen Interesse, da PI3K über AKT und Cofilin an der Umorganisation des Zytoskelettes beteiligt ist (Samstag et al., 2003). Wie bereits erwähnt, wäre hierfür aber die Involvierung des Glukokortikoidrezeptors nötig. Da die Dex induzierte Abrundung enzephalitogener T Zellen in der Anwesenheit von RU486 aber auftrat, lässt sich dies nicht durch diesen Mechanismus erklären.

Im dritten Konzept wird davon ausgegangen, dass Glukokortikoidmoleküle bei hohen Konzentration in zellulären Membranen (Plasma und Mitochondriummembran) interkalieren und dadurch den Kationenaustausch durch die Plasmamembran ändern sowie den Protonenausstrom durch die Mitochondrien erhöhen. Der gestörte Kationenfluss sowie die eingeschränkte ATP Produktion über die oxidative Phosphorylierung sollen zu einer allgemeinen Immunsuppression führen (Buttgereit and Scheffold, 2002; Buttgereit et al., 2004). Vor allem die verminderte Verfügbarkeit an Energie soll hierzu beitragen, da für die Synthese von Zytokinen, Antigenprozessierung bzw. -präsentation, Effektorfunktionen wie die Synthese von Antikörpern aber auch die Migration, ATP benötigt wird (Buttgereit, 2000; Buttgereit et al., 2005). Auch für den Aufbau des Zytoskelettes ist ATP notwendig (Samstag et al., 2003). Eine Reduktion dieser Moleküle könnte daher das Abrunden enzephalitogener T Zellen durch Dexamethason erklären. Ebenso wäre hierfür nicht die Präsenz eines Glukokortikoidrezeptors notwendig.

Die gezeigten Ergebnisse sprechen insbesondere für den zuletzt diskutierten Mechanismus. Für eine genaue Erklärung der gemachten Beobachtungen sind allerdings noch weitere Experimente nötig.

Eine genauere Analyse insbesondere von nicht-genomischen Effekten könnte mit neuen Glukokortikoidderivaten erfolgen. Dies könnte dazu beitragen, verbesserte Therapieansätze zu finden, die von weniger schädlichen Nebenwirkungen begleitet werden. Die meisten durch Glukokortikoide verursachten Nebenwirkungen werden durch Transaktivierung verursacht, während die erwünschten entzündungshemmenden und immunregulatorischen durch Transrepression vermittelt werden (Reichardt, 2004). So genannte selektive Glukokortikoidagonisten (SEGRAs), Nitrosteroidoide und langzirkulierende liposomale Glukokortikoide sind

daher gegenwärtig in den Fokus der Forschung gekommen und werden näher auf ihre Wirkung untersucht (Buttgereit et al., 2005; Mallei et al., 2005; Schacke et al., 2004). Inwieweit dies zu einer effektiveren Behandlung von Autoimmunerkrankungen beitragen kann, wird sich zeigen.

Aus den vorgestellten Ergebnissen ergibt sich folgendes zweistufiges Modell. Kurz nach der Verabreichung von Dexamethason kommt es aufgrund nicht-genomischer Effekte zu einer Umlagerung des Zytoskelettes, was eine weitere Migration und Infiltration des Rückenmarks durch enzephalitogene T-Zellen verhindert. Im weiteren Verlauf hingegen dominieren genomische Effekte. Durch die Induktion von Apoptose werden enzephalitogene T-Zellen aus dem Rückenmark eliminiert, wodurch es zu einer Reduktion der Entzündungsreaktion kommt. Dies äußert sich in einer verminderten Expression von Adhäsionsmolekülen im ZNS und einer Wiederherstellung der Bluthirnschrankenintegrität.

#### **5.4 Schlussfolgerungen**

In dieser Arbeit wurden folgende drei Behandlungsstrategien untersucht: die Aktivierung und Expansion regulatorischer T-Zellen *in vivo*, die Behandlung mit hohen Dosen Antigen und die therapeutische Verabreichung von Glukokortikoiden.

Im ersten Ansatz verhinderten durch einen anti-CD28 superagonistischen Antikörper endogen aktivierte und expandierte regulatorische T-Zellen die Migration enzephalitogener T-Zellen in das ZNS. Dadurch wurde abhängig vom Zeitpunkt der Aktivierung entweder der Ausbruch von EAE vollständig verhindert oder es trat eine sofortige Verbesserung des Krankheitsverlaufes ein. Obwohl die Umsetzung dieser Anwendung im Menschen auf tragische Weise gescheitert ist, stellt das Prinzip der Bekämpfung von Autoimmunerkrankungen durch körpereigene aktivierte regulatorische T-Zellen immer noch einen viel versprechenden Ansatz dar. In zukünftigen Studien sollten hierfür Substanzen zum Einsatz kommen, die spezifischer die regulatorischen T-Zellen aber nicht die autoreaktiven Lymphozyten aktivieren.

Bei der Therapie von EAE mit hohen Dosen an Antigen wurde spezifisch in enzephalitogenen und nicht in konventionellen T-Zellen Apoptose induziert. Dadurch können autoreaktive Lymphozyten aus dem Organismus beseitigt werden, wobei der Pool an restlichen Lymphozyten unangetastet bleibt. Dies funktioniert aber nur, wenn man die Antigenspezifität der pathogenen Lymphozyten kennt. Ist dies nicht der Fall

kann die Verabreichung von Antigen zu einer Verschlechterung des Krankheitsverlaufes beitragen. Weitere Untersuchungen über die Antigenspezifität autoreaktiver T-Zellen könnten somit die Behandlung von Multipler Sklerose mit Antigen ermöglichen.

Die Verabreichung von Glukokortikoiden gehört zu den gängigsten Therapiestrategien von Multipler Sklerose, wobei die Patienten teilweise allerdings unter Nebenwirkungen leiden. Hier konnte gezeigt werden, dass Glukokortikoide insbesondere durch die Induktion von Apoptose in enzephalitogenen aber auch in konventionellen T-Zellen zur Verminderung der Entzündungsreaktion beitragen. Daneben wurde ein neuer nicht-genomischer Effekt nachgewiesen, der zur Depolarisation enzephalitogener T-Zellen führt und dadurch die Migration in das ZNS inhibiert. Diese Kenntnisse könnten zu einer effektiveren Behandlung von MS mit Glukokortikoiden beitragen. Weitere Studien sollten sich darauf konzentrieren, Glukokortikoidderivate zu identifizieren, die sich die hier identifizierten Mechanismen zu Nutzen machen und von weniger schädlichen Nebenwirkungen begleitet werden.

Obwohl in den letzten Jahren viele neue Kenntnisse über Multiple Sklerose gewonnen wurden, existiert bis heute noch keine Therapie, die zur vollständigen Genesung der Patienten führt. Noch viele Studien sind dafür notwendig, um dieses Ziel näher zu kommen.

## 6 Zusammenfassung

Multiple Sklerose (MS) ist eine chronische entzündliche Erkrankung des Zentralen Nervensystems, die wahrscheinlich aus einer Autoimmunreaktion resultiert. Trotz erheblicher Fortschritte in der Forschung in den letzten Jahren existiert bis heute keine Therapie, die zur vollständigen Genesung der Patienten führt. Weitere Studien auf diesem Gebiet sind daher dringend notwendig. Dieses Ziel kann am besten mittels der Experimentellen Autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE), einem allgemeinen akzeptierten Tiermodell für MS erreicht werden. In der vorliegenden Arbeit wurden folgende Therapiestrategien untersucht: (i) die Aktivierung und Expansion regulatorischer T-Zellen *in vivo*, (ii) die Behandlung mit hohen Dosen Antigen und (iii) die therapeutische Verabreichung von Glukokortikoiden. Um zu unterscheiden, welchen Einfluss die verschiedenen Therapieansätze auf autoreaktive und andere Leukozytenpopulationen hat, wurde eine AT-EAE durch den adoptiven Transfer eGFP<sup>+</sup> enzephalitogener T-Zellen induziert.

Zunächst wurde die Interaktion regulatorischer T-Zellen, die *in vivo* mit einem anti-CD28 superagonistischen Antikörper aktiviert und expandiert worden waren, mit enzephalitogenen T-Zellen untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass regulatorische T-Zellen die Infiltration des ZNS durch autoreaktive Zellen inhibieren. Die Repression der enzephalitogenen T-Zellen erfolgt dabei vor allem in den sekundären lymphatischen Organen, da für frühe therapeutische Effekte die Anwesenheit regulatorischer T-Zellen im Rückenmark nicht erforderlich war. Trotz allem kann die verzögerte Migration regulatorischer T-Zellen in das Rückenmark, welche nach der prophylaktischen Verabreichung von JJ316 beobachtet wird, ein verzögertes Ausbrechen von EAE verhindern. Ebenso blieb die Bluthirnschranke nach der Verabreichung von JJ316 weitgehend intakt, die Sekretion von T<sub>H</sub>2 Zytokinen war erhöht und die Ausschüttung von IFN- $\gamma$  durch enzephalitogene T-Zellen stark reduziert. Letzteres führte zu einer verminderten Expression des Chemokinrezeptors CXCR-3 auf pathogenen T-Zellen, worin ein Grund für die verringerte Fähigkeit in das ZNS zu wandern liegt. Diese Effekte waren nicht das Ergebnis einer direkten Wirkung von JJ316 auf enzephalitogene T-Zellen. Vielmehr resultierte die polyklonale Aktivierung regulatorischer T-Zellen in den sekundären

lymphatischen Organen in einer verminderten Infiltration des ZNS durch autoreaktive T-Zellen.

Bereits in früheren Studien konnte gezeigt werden, dass die Verabreichung hoher Dosen Antigen den Krankheitsverlauf einer EAE durch die Induktion von Apoptose verbessert. Welche Zellen das Ziel der antigeninduzierten Apoptose sind, war bisher allerdings nicht bekannt. Nach der zweimaligen Injektion von gpMBP wurde ausschließlich die Anzahl enzephalitogener aber nicht der konventionellen T-Zellen im Rückenmark und in der Milz drastisch reduziert. Dies resultiert aus der alleinigen Induktion von Apoptose in antigenspezifischen autoreaktiven T-Zellen. Durch die spezifische Beseitigung pathogener T-Zellen könnten so schädliche Nebenwirkungen vermieden werden.

Glukokortikoide gehören zur gängigsten Therapieform der Multiplen Sklerose, obwohl die Patienten unter zahlreichen Nebenwirkungen leiden und nie vollständig genesen. Eine bessere Aufklärung des Wirkungsmechanismus von Glukokortikoiden könnte zu einer effektiveren Behandlung beitragen. Die therapeutische Verabreichung von Dexamethason führte zu einer schnellen Verbesserung des Krankheitsverlaufes aufgrund der Reduktion des Rückenmarkinfiltrates. Dies resultierte zum einen aus der Induktion von Apoptose in enzephalitogenen und konventionellen T-Zellen, wobei sich beide Lymphozytenpopulationen in ihrer Apoptoseanfälligkeit nicht voneinander unterschieden. Ebenso war nach der Glukokortikoidtherapie die Integrität der Bluthirnschranke wieder partiell hergestellt und die Expression von ICAM-1 sowie IP-10 im Rückenmark reduziert. Keinen Einfluss hingegen hatte Dexamethason auf die Expression von LFA-1, VLA-4 und den Chemokinrezeptor CXCR-3 auf enzephalitogenen T-Zellen. Während diese Veränderungen vor allem auf genomische Effekte zurückzuführen sind, wurde in dieser Arbeit auch ein neuartiger nicht-genomischer Effekt beschrieben. Dexamethason induzierte die Depolarisation enzephalitogener T-Zellen, so dass sie dadurch die Zellmorphologie ruhender T Lymphozyten annahmen. Dies könnte zur verminderten Migration pathogener T-Zellen in das ZNS beitragen. Daraus ergibt sich folgendes zweistufiges Modell. Nicht-genomische Effekte verursachen eine Umlagerung des Zytoskelettes, was eine weitere Infiltration des Rückenmarks durch enzephalitogene T-Zellen inhibiert. Im späteren Verlauf bewirken genomische Effekte die Reduktion des Rückenmarkinfiltrates und die Wiederherstellung der Bluthirnschrankenintegrität. All diese Prozesse tragen zur Genesung der Tiere bei.

Die Ergebnisse dieser Arbeit könnten zu verbesserten Therapiestrategien von Multipler Sklerose und anderen Autoimmunerkrankungen beitragen.

## 7 Summary

Multiple sclerosis is a chronic inflammatory disease of the CNS with presumed autoimmune origin. In spite of considerable advances over the last years there is still no efficient therapy available that would allow to completely cure multiple sclerosis patients. Therefore further studies are urgently needed. This can be achieved by using Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE) a widely accepted animal model for multiple sclerosis. In this study the following therapeutic strategies were investigated: (i) activation and expansion of regulatory T cells *in vivo* by using a superagonistic  $\alpha$ -CD28 antibody, (ii) treatment with high doses of antigen, and (iii) the therapeutic administration of glucocorticoids. To dissect effects on autoreactive and other leukocyte populations AT-EAE was induced by the adoptive transfer of eGFP<sup>+</sup> encephalitogenic T cells.

At first the interaction of regulatory T cells activated and expanded with the superagonistic  $\alpha$ -CD28 antibody JJ316 on encephalitogenic T cells was investigated. It could be demonstrated that regulatory T cells inhibit the migration of autoreactive T cells to the CNS. The suppression of encephalitogenic T cells occurs mainly in secondary lymphoid organs because the presence of regulatory T cells in the spinal cord was not essential for early therapeutic effects. However, the delayed migration of regulatory T cells into the spinal cord observed after prophylactic administration of JJ316 may prevent a delayed outbreak of EAE. In addition, the blood brain barrier remained widely intact, the secretion of T<sub>H</sub>2 cytokines was increased and the secretion of IFN- $\gamma$  by encephalitogenic T cells was reduced. The latter resulted in a diminished expression of CXCR-3 on pathogenic T cells, which may represent one reason for their impaired migration into the CNS. These observations were not the result of a direct effect of JJ316 on encephalitogenic T cells. In contrast the polyclonal activation and expansion of regulatory T cells within secondary lymphoid organs inhibited the infiltration of the CNS by autoreactive T cells.

In previous studies the administration of high doses of antigen improved the course of diseases of an EAE by the induction of apoptosis. Until now it remained unknown which cells were affected by antigen-induced apoptosis. After gpMBP was injected twice only the number of encephalitogenic but not conventional T cells was reduced, both in the spinal cord and the spleen. This resulted from the exclusive induction of

apoptosis amongst antigen-specific autoreactive T cells. This suggests that by the specific elimination of pathogenic T cells negative side effects might be prevented. Glucocorticoids are amongst the most common therapeutic strategies of multiple sclerosis in spite of being associated with negative side effects and incomplete recovery. An enlightenment of the exact mode of action of glucocorticoids may contribute to a more effective treatment of multiple sclerosis. The therapeutic administration of dexamethasone improved the course of disease of EAE due to a decreased spinal cord infiltrate. The injection of high doses of glucocorticoids induced apoptosis equally among encephalitogenic and conventional T cells. In addition, the integrity of the blood-brain barrier was partially restored less and the expression of ICAM-1 and IP-10 in the spinal cord reduced. In contrast, dexamethasone did not influence the expression of LFA, VLA-4 and CXCR-3 on encephalitogenic T cells. Whereas all of these changes were the result of genomic effects also a novel type of non-genomic effects by glucocorticoids was described. Dexamethasone induced the depolarisation of encephalitogenic T cells, which consequently acquired the phenotype of resting T cells. This may impair their migration to the spinal cord. Therefore we propose the following two-step model. Non-genomic effects induce the depolarisation of the cytoskeleton of encephalitogenic T cells, thereby inhibiting further infiltration of the spinal cord by encephalitogenic T cells. Subsequently genomic effects lead to the clearance of the spinal cord infiltrate and the reestablishment of the blood-brain barrier integrity. This in turn leads to the recovery of the animals. The results of this work may contribute to the development of improved therapeutic strategies of multiple sclerosis and other autoimmune diseases.

## 8 Literatur

Acuto O, Michel F. CD28-mediated co-stimulation: a quantitative support for TCR signalling. *Nat Rev Immunol* 2003; 3: 939-51.

Adorini L. Tolerogenic dendritic cells induced by vitamin D receptor ligands enhance regulatory T cells inhibiting autoimmune diabetes. *Ann N Y Acad Sci* 2003; 987: 258-61.

Alegre ML, Frauwirth KA, Thompson CB. T-cell regulation by CD28 and CTLA-4. *Nat Rev Immunol* 2001; 1: 220-8.

Almawi WY, Beyhum HN, Rahme AA, Rieder MJ. Regulation of cytokine and cytokine receptor expression by glucocorticoids. *J Leukoc Biol* 1996; 60: 563-72.

Anderson AC, Nicholson LB, Legge KL, Turchin V, Zaghouani H, Kuchroo VK. High frequency of autoreactive myelin proteolipid protein-specific T cells in the periphery of naive mice: mechanisms of selection of the self-reactive repertoire. *J Exp Med* 2000; 191: 761-70.

Anderton SM, Wraith DC. Selection and fine-tuning of the autoimmune T-cell repertoire. *Nat Rev Immunol* 2002; 2: 487-98.

Annacker O, Pimenta-Araujo R, Burlen-Defranoux O, Barbosa TC, Cumano A, Bandeira A. CD25<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T cells regulate the expansion of peripheral CD4 T cells through the production of IL-10. *J Immunol*. 2001; 166: 3008-18.

Aoki CA, Borchers AT, Ridgway WM, Keen CL, Ansari AA, Gershwin ME. NOD mice and autoimmunity. *Autoimmun Rev* 2005; 4: 373-9.

Baecher-Allan C, Brown JA, Freeman GJ, Hafler DA. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> regulatory cells in human peripheral blood. *J Immunol* 2001; 167: 1245-53.

Ballabh P, Braun A, Nedergaard M. The blood-brain barrier: an overview: structure, regulation, and clinical implications. *Neurobiol Dis* 2004; 16: 1-13.

Bartholome B, Spies CM, Gaber T, Schuchmann S, Berki T, Kunkel D, et al. Membrane glucocorticoid receptors (mGCR) are expressed in normal human peripheral blood mononuclear cells and up-regulated after in vitro stimulation and in patients with rheumatoid arthritis. *Faseb J* 2004; 18: 70-80.

Ben-Nun A, Wekerle H, Cohen IR. The rapid isolation of clonable antigen-specific T lymphocyte lines capable of mediating autoimmune encephalomyelitis. *Eur J Immunol* 1981; 11: 195-9.

Beyersdorf N, Gaupp S, Balbach K, Schmidt J, Toyka KV, Lin CH, et al. Selective targeting of regulatory T cells with CD28 superagonists allows effective therapy of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med* 2005; 202: 445-55.

Boyman O, Surh CD, Sprent J. Potential use of IL-2/anti-IL-2 antibody immune complexes for the treatment of cancer and autoimmune disease. *Expert Opin Biol Ther* 2006; 6: 1323-31.

Buttgereit F. Mechanisms and clinical relevance of nongenomic glucocorticoid actions. *Z Rheumatol* 2000; 59 Suppl 2: II/119-23.

Buttgereit F, Scheffold A. Rapid glucocorticoid effects on immune cells. *Steroids* 2002; 67: 529-34.

Buttgereit F, Song IH, Straub RH, Burmester GR. [Current insights into the development of new glucocorticoid receptor ligands]. *Z Rheumatol* 2005; 64: 170-6.

Buttgereit F, Straub RH, Wehling M, Burmester GR. Glucocorticoids in the treatment of rheumatic diseases: an update on the mechanisms of action. *Arthritis Rheum* 2004; 50: 3408-17.

Chan A, Gold R, Giegerich G, Herrmann T, Jung S, Toyka KV, et al. Usage of Vbeta3.3 T-cell receptor by myelin basic protein-specific encephalitogenic T-cell lines in the Lewis rat. *J Neurosci Res* 1999; 58: 214-25.

Chang TT, Sobel RA, Wei T, Ransohoff RM, Kuchroo VK, Sharpe AH. Recovery from EAE is associated with decreased survival of encephalitogenic T cells in the CNS of B7-1/B7-2-deficient mice. *Eur J Immunol* 2003; 33: 2022-2032.

Chen ML, Pittet MJ, Gorelik L, Flavell RA, Weissleder R, von Boehmer H, et al. Regulatory T cells suppress tumor-specific CD8 T cell cytotoxicity through TGF-beta signals in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102: 419-24.

Chen X, Oppenheim JJ, Winkler-Pickett RT, Ortaldo JR, Howard OM. Glucocorticoid amplifies IL-2-dependent expansion of functional FoxP3(+)CD4(+)CD25(+) T regulatory cells in vivo and enhances their capacity to suppress EAE. *Eur J Immunol* 2006; 36: 2139-49.

Chiba K. FTY720, a new class of immunomodulator, inhibits lymphocyte egress from secondary lymphoid tissues and thymus by agonistic activity at sphingosine 1-phosphate receptors. *Pharmacol Ther* 2005; 108: 308-19.

Chiba K, Matsuyuki H, Maeda Y, Sugahara K. Role of sphingosine 1-phosphate receptor type 1 in lymphocyte egress from secondary lymphoid tissues and thymus. *Cell Mol Immunol* 2006; 3: 11-9.

Chu CQ, Wittmer S, Dalton DK. Failure to suppress the expansion of the activated CD4 T cell population in interferon gamma-deficient mice leads to exacerbation of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med* 2000; 192: 123-8.

Clark AF, Brotchie D, Read AT, Hellberg P, English-Wright S, Pang IH, et al. Dexamethasone alters F-actin architecture and promotes cross-linked actin network formation in human trabecular meshwork tissue. *Cell Motil Cytoskeleton* 2005; 60: 83-95.

Coffer PJ, Burgering BM. Forkhead-box transcription factors and their role in the immune system. *Nat Rev Immunol* 2004; 4: 889-99.

Correale J, Arias M, Gilmore W. Steroid hormone regulation of cytokine secretion by proteolipid protein-specific CD4<sup>+</sup> T cell clones isolated from multiple sclerosis patients and normal control subjects. *J Immunol* 1998; 161: 3365-74.

Critchfield JM, Racke MK, Zuniga-Pflucker JC, Cannella B, Raine CS, Goverman J, et al. T cell deletion in high antigen dose therapy of autoimmune encephalomyelitis. *Science* 1994; 263: 1139-43

Critchfield JM, Zuniga-Pflucker JC, Lenardo MJ. Parameters controlling the programmed death of mature mouse T lymphocytes in high-dose suppression. *Cell Immunol* 1995; 160: 71-8.

Croxtall JD, Choudhury Q, Flower RJ. Glucocorticoids act within minutes to inhibit recruitment of signalling factors to activated EGF receptors through a receptor-dependent, transcription-independent mechanism. *Br J Pharmacol* 2000; 130: 289-98.

de Boer AG, Gaillard PJ. Blood-brain barrier dysfunction and recovery. *J Neural Transm* 2006; 113: 455-62.

Denning TL, Kim G, Kronenberg M. Cutting edge: CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells impaired for intestinal homing can prevent colitis. *J Immunol* 2005; 174: 7487-91.

Dietrich JB. Endothelial cells of the blood-brain barrier: a target for glucocorticoids and estrogens? *Front Biosci* 2004; 9: 684-93.

Dunn SE, Youssef S, Goldstein MJ, Prod'homme T, Weber MS, Zamvil SS, et al. Isoprenoids determine Th1/Th2 fate in pathogenic T cells, providing a mechanism of modulation of autoimmunity by atorvastatin. *J Exp Med* 2006; 203: 401-12.

Elenkov IJ. Glucocorticoids and the Th1/Th2 balance. *Ann N Y Acad Sci* 2004; 1024: 138-46.

Elovaara I, Lalla M, Spare E, Lehtimäki T, Dastidar P. Methylprednisolone reduces adhesion molecules in blood and cerebrospinal fluid in patients with MS. *Neurology* 1998; 51: 1703-8.

Elovaara I, Ukkonen M, Leppäkynnas M, Lehtimäki T, Luomala M, Peltola J, et al. Adhesion molecules in multiple sclerosis: relation to subtypes of disease and methylprednisolone therapy. *Arch Neurol* 2000; 57: 546-51.

Engelhardt B. Role of glucocorticoids on T cell recruitment across the blood-brain barrier. *Z Rheumatol* 2000; 59 Suppl 2: II/18-21.

Engelhardt B. Molecular mechanisms involved in T cell migration across the blood-brain barrier. *J Neural Transm* 2006a; 113: 477-85.

Engelhardt B. Regulation of immune cell entry into the central nervous system. *Results Probl Cell Differ* 2006b; 43: 259-80.

Engelhardt B, Ransohoff RM. The ins and outs of T-lymphocyte trafficking to the CNS: anatomical sites and molecular mechanisms. *Trends Immunol* 2005; 26: 485-95.

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

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

Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells. *Nat Immunol* 2003; 4: 330-6.

Fontenot JD, Rasmussen JP, Gavin MA, Rudensky AY. A function for interleukin 2 in Foxp3-expressing regulatory T cells. *Nat Immunol* 2005; 6: 1142-51.

Fontoura P, Steinman L, Miller A. Emerging therapeutic targets in multiple sclerosis. *Curr Opin Neurol* 2006; 19: 260-6.

Förster C, Silwedel C, Golenhofen N, Burek M, Kietz S, Mankertz J, et al. Occludin as direct target for glucocorticoid-induced improvement of blood-brain barrier properties in a murine in vitro system. *J Physiol* 2005; 565: 475-86.

Förster C, Waschke J, Burek M, Leers J, Drenckhahn D. Glucocorticoid effects on mouse microvascular endothelial barrier permeability are brain specific. *J Physiol* 2006; 573: 413-25.

Friedl P, Brocker EB. T cell migration in three-dimensional extracellular matrix: guidance by polarity and sensations. *Dev Immunol* 2000; 7: 249-66.

Friese MA, Fugger L. Autoreactive CD8+ T cells in multiple sclerosis: a new target for therapy? *Brain* 2005; 128: 1747-63.

Fyfe AI, Rosenthal A, Gotlieb AI. Immunosuppressive agents and endothelial repair. Prednisolone delays migration and cytoskeletal rearrangement in wounded porcine aortic monolayers. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995; 15: 1166-71.

Gaillard PJ, Voorwinden LH, Nielsen JL, Ivanov A, Atsumi R, Engman H, et al. Establishment and functional characterization of an in vitro model of the blood-brain barrier, comprising a co-culture of brain capillary endothelial cells and astrocytes. *Eur J Pharm Sci* 2001; 12: 215-22.

Gametchu B, Watson CS, Wu S. Use of receptor antibodies to demonstrate membrane glucocorticoid receptor in cells from human leukemic patients. *Faseb J* 1993; 7: 1283-92.

Gayo A, Mozo L, Suarez A, Tunon A, Lahoz C, Gutierrez C. Glucocorticoids increase IL-10 expression in multiple sclerosis patients with acute relapse. *J Neuroimmunol* 1998; 85: 122-30.

Gilgun-Sherki Y, Panet H, Melamed E, Offen D. Riluzole suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis: implications for the treatment of multiple sclerosis. *Brain Res* 2003; 989: 196-204.

Gold R, Buttgereit F, Toyka KV. Mechanism of action of glucocorticosteroid hormones: possible implications for therapy of neuroimmunological disorders. *J Neuroimmunol* 2001; 117: 1-8.

Gold R, Giegerich G, Hartung HP, Toyka KV. T-cell receptor (TCR) usage in Lewis rat experimental autoimmune encephalomyelitis: TCR beta-chain-variable-region V beta 8.2-positive T cells are not essential for induction and course of disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92: 5850-4.

Gold R, Hartung HP, Lassmann H. T-cell apoptosis in autoimmune diseases: termination of inflammation in the nervous system and other sites with specialized immune-defense mechanisms. *Trends Neurosci* 1997; 20: 399-404.

Gold R, Linington C, Lassmann H. Understanding pathogenesis and therapy of multiple sclerosis via animal models: 70 years of merits and culprits in experimental autoimmune encephalomyelitis research. *Brain* 2006; 129: 1953-71.

Goodkin DE. Role of steroids and immunosuppression and effects of interferon beta-1b in multiple sclerosis. *West J Med* 1994; 161: 292-8.

Goodnow CC, Sprent J, Fazekas de St Groth B, Vinuesa CG. Cellular and genetic mechanisms of self tolerance and autoimmunity. *Nature* 2005; 435: 590-7.

Graeler M, Goetzl EJ. Activation-regulated expression and chemotactic function of sphingosine 1-phosphate receptors in mouse splenic T cells. *Faseb J* 2002; 16: 1874-8.

Grauer O, Offenhausser M, Schmidt J, Toyka KV, Gold R. [Glucocorticosteroid therapy in optic neuritis and multiple sclerosis. Evidence from clinical studies and practical recommendations]. *Nervenarzt* 2001; 72: 577-89.

Green EA, Choi Y, Flavell RA. Pancreatic lymph node-derived CD4(+)CD25(+) Treg cells: highly potent regulators of diabetes that require TRANCE-RANK signals. *Immunity* 2002; 16: 183-91.

Hafler DA. Multiple sclerosis. *J Clin Invest* 2004; 113: 788-94.

Harkness KA, Adamson P, Sussman JD, Davies-Jones GA, Greenwood J, Woodroffe MN. Dexamethasone regulation of matrix metalloproteinase expression in CNS vascular endothelium. *Brain* 2000; 123 ( Pt 4): 698-709.

Hauser SL, Oksenberg JR. The neurobiology of multiple sclerosis: genes, inflammation, and neurodegeneration. *Neuron* 2006; 52: 61-76.

Heck S, Kullmann M, Gast A, Ponta H, Rahmsdorf HJ, Herrlich P, et al. A distinct modulating domain in glucocorticoid receptor monomers in the repression of activity of the transcription factor AP-1. *Embo J* 1994; 13: 4087-95.

Hemmer B, Nessler S, Zhou D, Kieseier B, Hartung HP. Immunopathogenesis and immunotherapy of multiple sclerosis. *Nat Clin Pract Neurol* 2006; 2: 201-211.

Herman AE, Freeman GJ, Mathis D, Benoist C. CD4+CD25+ T regulatory cells dependent on ICOS promote regulation of effector cells in the prediabetic lesion. *J Exp Med* 2004; 199: 1479-89.

Herold MJ, McPherson KG, Reichardt HM. Glucocorticoids in T cell apoptosis and function. *Cell Mol Life Sci* 2006; 63: 60-72.

Hohlfeld R, Wiendl H. The ups and downs of multiple sclerosis therapeutics. *Ann Neurol* 2001; 49: 281-4.

Holt PG, Thomas JA. Steroids inhibit uptake and/or processing but not presentation of antigen by airway dendritic cells. *Immunology* 1997; 91: 145-50.

Hori S, Sakaguchi S. Foxp3: a critical regulator of the development and function of regulatory T cells. *Microbes Infect* 2004; 6: 745-51.

Hughes-Fulford M, Appel R, Kumegawa M, Schmidt J. Effect of dexamethasone on proliferating osteoblasts: inhibition of prostaglandin E2 synthesis, DNA synthesis, and alterations in actin cytoskeleton. *Exp Cell Res* 1992; 203: 150-6.

Hünig T, Dennehy K. CD28 superagonists: mode of action and therapeutic potential. *Immunol Lett* 2005; 100: 21-8.

Ishigami T, White CA, Pender MP. Soluble antigen therapy induces apoptosis of autoreactive T cells preferentially in the target organ rather than in the peripheral lymphoid organs. *Eur J Immunol* 1998; 28: 1626-35.

Ito T, Yang M, Wang YH, Lande R, Gregorio J, Perng OA, et al. Plasmacytoid dendritic cells prime IL-10-producing T regulatory cells by inducible costimulator ligand. *J Exp Med* 2007; 204: 105-15.

Itoh M, Takahashi T, Sakaguchi N, Kuniyasu Y, Shimizu J, Otsuka F, et al. Thymus and autoimmunity: production of CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells as a key function of the thymus in maintaining immunologic self-tolerance. *J. Immunol.* 1999; 162: 5317-26.

Jacobson DL, Gange SJ, Rose NR, Graham NM. Epidemiology and estimated population burden of selected autoimmune diseases in the United States. *Clin Immunol Immunopathol* 1997; 84: 223-43.

Jantzen HM, Strahle U, Gloss B, Stewart F, Schmid W, Boshart M, et al. Cooperativity of glucocorticoid response elements located far upstream of the tyrosine aminotransferase gene. *Cell* 1987; 49: 29-38.

Kappos L, Comi G, Panitch H, Oger J, Antel J, Conlon P, et al. Induction of a non-encephalitogenic type 2 T helper-cell autoimmune response in multiple sclerosis after administration of an altered peptide ligand in a placebo-controlled, randomized phase

II trial. The Altered Peptide Ligand in Relapsing MS Study Group. *Nat Med* 2000; 6: 1176-82.

Karadottir R, Cavelier P, Bergersen LH, Attwell D. NMDA receptors are expressed in oligodendrocytes and activated in ischaemia. *Nature* 2005; 438: 1162-6.

Karlstedt K, Sallmen T, Eriksson KS, Lintunen M, Couraud PO, Joo F, et al. Lack of histamine synthesis and down-regulation of H1 and H2 receptor mRNA levels by dexamethasone in cerebral endothelial cells. *J Cereb Blood Flow Metab* 1999; 19: 321-30.

Keegan BM, Noseworthy JH. Multiple sclerosis. *Annu Rev Med* 2002; 53: 285-302.

Kelly EJ, Sandgren EP, Brinster RL, Palmiter RD. A pair of adjacent glucocorticoid response elements regulate expression of two mouse metallothionein genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94: 10045-50.

Kleinewietfeld M, Puentes F, Borsellino G, Battistini L, Rotzschke O, Falk K. CCR6 expression defines regulatory effector/memory-like cells within the CD25(+)CD4+ T-cell subset. *Blood* 2005; 105: 2877-86.

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

Kohm AP, Williams JS, Bickford AL, McMahon JS, Chatenoud L, Bach JF, et al. Treatment with nonmitogenic anti-CD3 monoclonal antibody induces CD4+ T cell unresponsiveness and functional reversal of established experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 2005; 174: 4525-34.

Langer-Gould A, Steinman L. What went wrong in the natalizumab trials? *Lancet* 2006; 367: 708-10.

Lee DS, Ahn C, Ernst B, Sprent J, Surh CD. Thymic selection by a single MHC/peptide ligand: autoreactive T cells are low-affinity cells. *Immunity* 1999; 10: 83-92.

Leussink VI, Jung S, Merschdorf U, Toyka KV, Gold R. High-dose methylprednisolone therapy in multiple sclerosis induces apoptosis in peripheral blood leukocytes. *Arch Neurol* 2001; 58: 91-7.

Limbourg FP, Huang Z, Plumier JC, Simoncini T, Fujioka M, Tuckermann J, et al. Rapid nontranscriptional activation of endothelial nitric oxide synthase mediates increased cerebral blood flow and stroke protection by corticosteroids. *J Clin Invest* 2002; 110: 1729-38.

Lin CH, Hünig T. Efficient expansion of regulatory T cells in vitro and in vivo with a CD28 superagonist. *Eur J Immunol* 2003; 33: 626-38.

Liu L, Callahan MK, Huang D, Ransohoff RM. Chemokine receptor CXCR3: an unexpected enigma. *Curr Top Dev Biol* 2005; 68: 149-81.

Lobell A, Weissert R, Eltayeb S, de Graaf KL, Wefer J, Storch MK, et al. Suppressive DNA vaccination in myelin oligodendrocyte glycoprotein peptide-induced experimental autoimmune encephalomyelitis involves a T1-biased immune response. *J Immunol* 2003; 170: 1806-13.

Lühder F, Huang Y, Dennehy KM, Guntermann C, Müller I, Winkler E, et al. Topological requirements and signaling properties of T cell-activating, anti-CD28 antibody superagonists. *J Exp Med* 2003; 197: 955-66.

Lundsgaard D, Holm TL, Hornum L, Markholst H. In vivo control of diabetogenic T-cells by regulatory CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-cells expressing Foxp3. *Diabetes* 2005; 54: 1040-7.

Maerten P, Shen C, Bullens DM, Van Assche G, Van Gool S, Geboes K, et al. Effects of interleukin 4 on CD25+CD4+ regulatory T cell function. *J Autoimmun* 2005; 25: 112-20.

Mallei A, Aden SA, Bachis A, Brandoli C, Ongini E, Mocchetti I. The nitrosteroid NCX 1015, a prednisolone derivative, improves recovery of function in rats after spinal cord injury. *Brain Res* 2005; 1062: 16-25.

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

Masferrer JL, Seibert K, Zweifel B, Needleman P. Endogenous glucocorticoids regulate an inducible cyclooxygenase enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89: 3917-21.

McCombe PA, Nickson I, Tabi Z, Pender MP. Corticosteroid treatment of experimental autoimmune encephalomyelitis in the Lewis rat results in loss of V beta 8.2+ and myelin basic protein-reactive cells from the spinal cord, with increased total T-cell apoptosis but reduced apoptosis of V beta 8.2+ cells. *J Neuroimmunol* 1996; 70: 93-101.

McGeachy MJ, Stephens LA, Anderton SM. Natural recovery and protection from autoimmune encephalomyelitis: contribution of CD4+CD25+ regulatory cells within the central nervous system. *J Immunol* 2005; 175: 3025-32.

McMahon EJ, Bailey SL, Castenada CV, Waldner H, Miller SD. Epitope spreading initiates in the CNS in two mouse models of multiple sclerosis. *Nat Med* 2005; 11: 335-9.

Mirowska-Guzel DM, Kurowska K, Skierski J, Koronkiewicz M, Wicha W, Kruszewska J, et al. High dose of intravenously given glucocorticosteroids decrease IL-8 production by monocytes in multiple sclerosis patients treated during relapse. *J Neuroimmunol* 2006; 176: 134-40.

Moldovan IR, Rudick RA, Cotleur AC, Born SE, Lee JC, Karafa MT, et al. Interferon gamma responses to myelin peptides in multiple sclerosis correlate with a new clinical measure of disease progression. *J Neuroimmunol* 2003; 141: 132-40.

Moreira MA, Tilbery CP, Monteiro LP, Teixeira MM, Teixeira AL. Effect of the treatment with methylprednisolone on the cerebrospinal fluid and serum levels of CCL2 and CXCL10 chemokines in patients with active multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand* 2006; 114: 109-13.

Morgan ME, Flierman R, van Duivenvoorde LM, Witteveen HJ, van Ewijk W, van Laar JM, et al. Effective treatment of collagen-induced arthritis by adoptive transfer of CD25+ regulatory T cells. *Arthritis Rheum* 2005; 52: 2212-21.

Mottet C, Uhlig HH, Powrie F. Cutting edge: cure of colitis by CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Immunol* 2003; 170: 3939-43.

Murray TJ. Diagnosis and treatment of multiple sclerosis. *Bmj* 2006; 332: 525-7.

Nagamine K, Peterson P, Scott HS, Kudoh J, Minoshima S, Heino M, et al. Positional cloning of the APECED gene. *Nat Genet* 1997; 17: 393-8.

Navarro J, Aristimuno C, Sanchez-Ramon S, Vigil D, Martinez-Gines ML, Fernandez-Cruz E, et al. Circulating dendritic cells subsets and regulatory T-cells at multiple sclerosis relapse: differential short-term changes on corticosteroids therapy. *J Neuroimmunol* 2006; 176: 153-61.

Olerup O, Hillert J. HLA class II-associated genetic susceptibility in multiple sclerosis: a critical evaluation. *Tissue Antigens* 1991; 38: 1-15.

Orchinik M, Murray TF, Moore FL. A corticosteroid receptor in neuronal membranes. *Science* 1991; 252: 1848-51.

Ott PA, Anderson MR, Tary-Lehmann M, Lehmann PV. CD4+CD25+ regulatory T cells control the progression from periinsulinitis to destructive insulinitis in murine autoimmune diabetes. *Cell Immunol* 2005; 235: 1-11.

Paul C, Bolton C. Inhibition of blood-brain barrier disruption in experimental allergic encephalomyelitis by short-term therapy with dexamethasone or cyclosporin A. *Int J Immunopharmacol* 1995; 17: 497-503.

Piemonti L, Monti P, Allavena P, Sironi M, Soldini L, Leone BE, et al. Glucocorticoids affect human dendritic cell differentiation and maturation. *J Immunol* 1999; 162: 6473-81.

Pryce G, Ahmed Z, Hankey DJ, Jackson SJ, Croxford JL, Pocock JM, et al. Cannabinoids inhibit neurodegeneration in models of multiple sclerosis. *Brain* 2003; 126: 2191-202.

Racke MK, Critchfield JM, Quigley L, Cannella B, Raine CS, McFarland HF, et al. Intravenous antigen administration as a therapy for autoimmune demyelinating disease. *Ann Neurol* 1996; 39: 46-56.

Read S, Powrie F. CD4(+) regulatory T cells. *Curr Opin Immunol* 2001; 13: 644-9.

Reichardt HM. Immunomodulatory activities of glucocorticoids: insights from transgenesis and gene targeting. *Curr Pharm Des* 2004; 10: 2797-805.

Reichardt HM, Gold R, Lühder F. Glucocorticoids in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *Expert Rev Neurother* 2006; 6: 1657-70.

Reichardt HM, Schütz G. Feedback control of glucocorticoid production is established during fetal development. *Mol Med* 1996; 2: 735-44.

Renno T, Taupin V, Bourbonniere L, Verge G, Tran E, De Simone R, et al. Interferon-gamma in progression to chronic demyelination and neurological deficit following acute EAE. *Mol Cell Neurosci* 1998; 12: 376-89.

Rio J, Montalban X. Interferon-beta 1b in the treatment of multiple sclerosis. *Expert Opin Pharmacother* 2005; 6: 2877-86.

Rivers T. M., Sprunt D. H., Berry G. P. Observations on attempts to produce acute disseminated encephalomyelitis in monkeys. *J Exp Med* 1933; 58: 39-53

Rodriguez-Palmero M, Franch A, Castell M, Pelegri C, Perez-Cano FJ, Kleinschnitz C, et al. Effective treatment of adjuvant arthritis with a stimulatory CD28-specific monoclonal antibody. *J Rheumatol* 2006; 33: 110-8.

Rodriguez-Palmero M, Hara T, Thumbs A, Hunig T. Triggering of T cell proliferation through CD28 induces GATA-3 and promotes T helper type 2 differentiation in vitro and in vivo. *Eur J Immunol* 1999; 29: 3914-24.

Romero IA, Radewicz K, Jubin E, Michel CC, Greenwood J, Couraud PO, et al. Changes in cytoskeletal and tight junctional proteins correlate with decreased permeability induced by dexamethasone in cultured rat brain endothelial cells. *Neurosci Lett* 2003; 344: 112-6.

Rosenberg GA, Dencoff JE, Correa N, Jr., Reiners M, Ford CC. Effect of steroids on CSF matrix metalloproteinases in multiple sclerosis: relation to blood-brain barrier injury. *Neurology* 1996; 46: 1626-32.

Sackey FN, Watson CS, Gametchu B. Cell cycle regulation of membrane glucocorticoid receptor in CCRF-CEM human ALL cells: correlation to apoptosis. *Am J Physiol* 1997; 273: E571-83.

Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25).

Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 1995; 155: 1151-64.

Samstag Y, Eibert SM, Klemke M, Wabnitz GH. Actin cytoskeletal dynamics in T lymphocyte activation and migration. *J Leukoc Biol* 2003; 73: 30-48.

Sanchez-Madrid F, del Pozo MA. Leukocyte polarization in cell migration and immune interactions. *Embo J* 1999; 18: 501-11.

Sarween N, Chodos A, Raykundalia C, Khan M, Abbas AK, Walker LS. CD4+CD25+ cells controlling a pathogenic CD4 response inhibit cytokine differentiation, CXCR-3 expression, and tissue invasion. *J Immunol* 2004; 173: 2942-51.

Schacke H, Schottelius A, Docke WD, Strehlke P, Jaroch S, Schmees N, et al. Dissociation of transactivation from transrepression by a selective glucocorticoid receptor agonist leads to separation of therapeutic effects from side effects. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 227-32.

Schmidt J, Elflein K, Stienekemeier M, Rodriguez-Palmero M, Schneider C, Toyka KV, et al. Treatment and prevention of experimental autoimmune neuritis with superagonistic CD28-specific monoclonal antibodies. *J Neuroimmunol* 2003a; 140: 143-52.

Schmidt J, Gold R, Schonrock L, Zettl UK, Hartung HP, Toyka KV. T-cell apoptosis in situ in experimental autoimmune encephalomyelitis following methylprednisolone pulse therapy. *Brain* 2000; 123 ( Pt 7): 1431-41.

Schmidt J, Metselaar JM, Wauben MH, Toyka KV, Storm G, Gold R. Drug targeting by long-circulating liposomal glucocorticosteroids increases therapeutic efficacy in a model of multiple sclerosis. *Brain* 2003b; 126: 1895-904.

Schmied M, Breitschopf H, Gold R, Zischler H, Rothe G, Wekerle H, et al. 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* 1993; 143: 446-52.

Sharpe AH, Freeman GJ. The B7-CD28 superfamily. *Nat Rev Immunol* 2002; 2: 116-26.

Siegmund K, Feuerer M, Siewert C, Ghani S, Haubold U, Dankof A, et al. Migration matters: regulatory T-cell compartmentalization determines suppressive activity in vivo. *Blood* 2005; 106: 3097-104.

Smith T, Schmied M, Hewson AK, Lassmann H, Cuzner ML. Apoptosis of T cells and macrophages in the central nervous system of intact and adrenalectomized Lewis rats during experimental allergic encephalomyelitis. *J Autoimmun* 1996; 9: 167-74.

Song IH, Gold R, Straub RH, Burmester GR, Buttgereit F. New glucocorticoids on the horizon: repress, don't activate! *J Rheumatol* 2005; 32: 1199-1207.

Sorensen TL, Tani M, Jensen J, Pierce V, Lucchinetti C, Folcik VA, et al. Expression of specific chemokines and chemokine receptors in the central nervous system of multiple sclerosis patients. *J Clin Invest* 1999; 103: 807-15.

Sorensen TL, Trebst C, Kivisakk P, Klaege KL, Majmudar A, Ravid R, et al. Multiple sclerosis: a study of CXCL10 and CXCR3 co-localization in the inflamed central nervous system. *J Neuroimmunol* 2002; 127: 59-68.

Sospedra M, Martin R. Immunology of multiple sclerosis. *Annu Rev Immunol* 2005; 23: 683-747.

Steinman L. Blocking adhesion molecules as therapy for multiple sclerosis: natalizumab. *Nat Rev Drug Discov* 2005; 4: 510-8.

Strähle U, Klock G, Schutz G. A DNA sequence of 15 base pairs is sufficient to mediate both glucocorticoid and progesterone induction of gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987; 84: 7871-5.

Suntharalingam G, Perry MR, Ward S, Brett SJ, Castello-Cortes A, Brunner MD, et al. Cytokine storm in a phase 1 trial of the anti-CD28 monoclonal antibody TGN1412. *N Engl J Med* 2006; 355: 1018-28.

Swanborg RH. Experimental autoimmune encephalomyelitis in the rat: lessons in T-cell immunology and autoreactivity. *Immunol Rev* 2001; 184: 129-35.

Tacke M, Hanke G, Hanke T, Hunig T. CD28-mediated induction of proliferation in resting T cells in vitro and in vivo without engagement of the T cell receptor: evidence for functionally distinct forms of CD28. *Eur J Immunol* 1997; 27: 239-47.

Tuckermann JP, Kleiman A, McPherson KG, Reichardt HM. Molecular mechanisms of glucocorticoids in the control of inflammation and lymphocyte apoptosis. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2005; 42: 71-104.

van den Brandt J, Wang D, Kwon SH, Heinkelein M, Reichardt HM. Lentivirally generated eGFP-transgenic rats allow efficient cell tracking in vivo. *Genesis* 2004; 39: 94-9.

Vanderlugt CL, Miller SD. Epitope spreading in immune-mediated diseases: implications for immunotherapy. *Nat Rev Immunol* 2002; 2: 85-95.

Viglietta V, Baecher-Allan C, Weiner HL, Hafler DA. Loss of functional suppression by CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. *J Exp Med* 2004; 199: 971-9.

von Boehmer H. Mechanisms of suppression by suppressor T cells. *Nat Immunol* 2005; 6: 338-44.

Waiczies S, Prozorovski T, Infante-Duarte C, Hahner A, Aktas O, Ullrich O, et al. Atorvastatin induces T cell anergy via phosphorylation of ERK1. *J Immunol* 2005; 174: 5630-5.

Walker LS, Abbas AK. The enemy within: keeping self-reactive T cells at bay in the periphery. *Nat Rev Immunol* 2002; 2: 11-9.

Wang D, Müller N, McPherson KG, Reichardt HM. Glucocorticoids engage different signal transduction pathways to induce apoptosis in thymocytes and mature T cells. *J Immunol* 2006; 176: 1695-702.

Watanabe T, Masuyama J, Sohma Y, Inazawa H, Horie K, Kojima K, et al. CD52 is a novel costimulatory molecule for induction of CD4<sup>+</sup> regulatory T cells. *Clin Immunol* 2006; 120: 247-59.

Weber MS, Youssef S, Dunn SE, Prod'homme T, Neuhaus O, Stuve O, et al. Statins in the treatment of central nervous system autoimmune disease. *J Neuroimmunol* 2006; 178: 140-8.

Webster JI, Tonelli L, Sternberg EM. Neuroendocrine regulation of immunity. *Annu Rev Immunol* 2002; 20: 125-63.

Weishaupt A, Gold R, Gaupp S, Giegerich G, Hartung HP, Toyka KV. Antigen therapy eliminates T cell inflammation by apoptosis: effective treatment of experimental autoimmune neuritis with recombinant myelin protein P2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94: 1338-43.

Weishaupt A, Gold R, Hartung T, Gaupp S, Wendel A, Bruck W, et al. Role of TNF- $\alpha$  in high-dose antigen therapy in experimental autoimmune neuritis: inhibition of TNF- $\alpha$  by neutralizing antibodies reduces T-cell apoptosis and prevents liver necrosis. *J Neuropathol Exp Neurol* 2000a; 59: 368-76.

Weishaupt A, Jander S, Bruck W, Kuhlmann T, Stienekemeier M, Hartung T, et al. Molecular mechanisms of high-dose antigen therapy in experimental autoimmune encephalomyelitis: rapid induction of Th1-type cytokines and inducible nitric oxide synthase. *J Immunol* 2000b; 165: 7157-63.

Wildin RS, Freitas A. IPEX and FOXP3: clinical and research perspectives. *J Autoimmun* 2005; 25 Suppl: 56-62.

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

Wing K, Suri-Payer E, Rudin A. CD4+CD25+-regulatory T cells from mouse to man. *Scand J Immunol* 2005; 62: 1-15.

Wolkowitz OM, Papadopoulos NM, Costello R, Breier A, Doran AR, Pickar D, et al. Prednisone effects on blood-brain barrier permeability and CNS IgG synthesis in healthy humans. *Psychoneuroendocrinology* 1990; 15: 155-8.

Wu Y, Borde M, Heissmeyer V, Feuerer M, Lapan AD, Stroud JC, et al. FOXP3 controls regulatory T cell function through cooperation with NFAT. *Cell* 2006; 126: 375-87.

Wyllie AH. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* 1980; 284: 555-6.

Xie JH, Nomura N, Lu M, Chen SL, Koch GE, Weng Y, et al. Antibody-mediated blockade of the CXCR3 chemokine receptor results in diminished recruitment of T helper 1 cells into sites of inflammation. *J Leukoc Biol* 2003; 73: 771-80.

Yura M, Takahashi I, Serada M, Koshio T, Nakagami K, Yuki Y, et al. Role of MOG-stimulated Th1 type "light up" (GFP+) CD4+ T cells for the development of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *J Autoimmun* 2001; 17: 17-25.

## 9 Anhang

### 9.1 Abbkürzungsverzeichnis

ACTH	Adrenokortikotropes Hormon
AIRE	Autoimmunes Regulatorgen
APC	Antigenpräsentierende Zelle
APC	Allophycocyanin
APL	Altered Peptide Ligand
APS	Autoimmunes polyendokrines Syndrom
AK	Antikörper
AT-EAE	Adoptive Transfer EAE
BSS	balanced salt solution
BSA	bovine serum albumin
B <sub>lym</sub>	B Lymphozyt
bp	Basenpaare
BZR	B-Zellrezeptor
CB 1 Rezeptor	Cannaboidrezeptor
CD	cluster of differentiation
cDNA	complementary DNA
CFA	Complete Freund Adjuvans
CNPase	cyclic nucleotide phosphodiesterase 1
Con A	Concanvalin A
ConAÜ	Concanvalin A Überstand
CREB	cAMP response element-binding protein
CRH	Corticotropin Releasing Hormon
CSF	cerebrospinal fluid
CTLA-4	cytotoxic T lymphocyte associated protein 4
DEPC	Diethylpyrocarbonat
Dex	Dexamethason
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol

EAE	Experimentelle Enzephalomyelitis	Autoimmune
EAN	Experimentelle Autoimmune Neuritis	
FACS	Fluoreszenz aktivierter Zellsortierer	
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat	
FKS	Fötales Kälberserum	
GFP	green fluorescent protein	
GITR	glucocorticoid induced TNF receptor	
gpMBP	guinea pig Myelin Basic Protein	
GR	Glukokortikoidrezeptor	
GRE	glukokortikoid response element	
h	Stunde	
HLA	human leucocyte antigen	
IBD	inflammatory bowel disease	
ICAM-1	intercellular adhesion molecule 1	
ICOS	inducible costimulatory	
IL	Interleukin	
IFN	Interferon	
iNOS	inducible nitric oxide synthase	
IPEX	Immundysregulation, Polyendocrinopathy, Enteropathy, X- linked	
LP	Lamellopod	
LFA-1	leucocyte function associated antigen 1	
MACS	magnetic bead-activated cell sorting	
MAG	myelin associated protein	
MBP	myelin basic protein	
MG	Mikroglia	
MHC	major histocompatibility complex	
mGR	membranegebundener Glukokortikoidrezeptor	
MOBP	Myelin Oligodendrozytenbasisprotein	assoziiertes
MOG	Myelinoligodendrozytenprotein	

---

MØ	Makrophage
MTOC	Mikrotubulinorganisationszentrum
mRNA	messanger Ribonukleinsäure
MS	Multiple Sklerose
NFAT	nuclear factor of activated T cells
NK Zelle	Natürliche Killerzelle
Nrp	Neuropilin
n. s.	nicht signifikant
OSP	Oligodentroyten spezifisches Protein
PBMC	peripheral blood mononuclear cell
PBS	phophat buffered saline
PD-1	Programmed death 1
PE	Phycoerythrin
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PNS	Peripheres Nervensystem
PLP	Proteolipidprotein
Pol	Polymerase
ratReMed	Rattenrestimulationsmedium
RE	response element
rpm	rounds per minute
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SA	Streptavidin
ShaMlg	sheep anti-mouse
SLE	Systemischer Lupus Erythematodes
STAT	Signaltransduktoren und Aktivatoren der Transkription
TCGF	T cell growth factor
T <sub>bys</sub>	Bystander T-Zelle
T <sub>con</sub>	konventionelle T-Zelle
T <sub>cyt</sub>	zytotoxische T-Zelle
T <sub>enz</sub>	enzephalitogene T-Zelle
TGF-β	transforming growth factor-β

---

TLR	Toll-like ceceptor
TNF	Tumornekrosefaktor
TNFR	Tumornekrosefaktorrezeptor
TF	Transkriptionsfaktor
T <sub>reg</sub>	regulatorische T-Zelle
TZR	T-Zellrezeptor
VCAM-1	vascular cell adhesion molecule 1
VLA-4	very late antigen 4
ZNS	Zentrales Nervensystem

## 9.2 Veröffentlichungen

1. Tischner, T., Weishaupt, A., van den Brandt, J., Müller, N., Beyersdorf, N., Ip, C.W., Toyka, K.V., Hünig, T., Gold, R., Kerkau, T., Reichardt, H.M. Polyclonal expansion of regulatory T cells interferes with effector cell migration in a model of Multiple Sclerosis. *Brain* 2006 129, 2635-2647.
2. Tischner, D., Weishaupt, A., van den Brandt, J., Ip, C.W., Kerkau, T., Gold, R., Reichardt, H.M. Antigen therapy of experimental autoimmune encephalomyelitis selectively induces apoptosis of pathogenic T cells. *J Neuroimmunol* 2007 146-150.
3. van den Brandt, J., Lühder, F., McPherson, K.G., Graaf, K.L. Tischner, D., Wiehr, S., Hermann, T., Weissert, R., Gold, R., Reichardt, H.M. Enhanced glucocorticoid receptor signaling in T cells impacts on thymocyte apoptosis and adaptive immune responses. *Am J Pathol* 2007, 1041-1053.
4. Tischner, D., Reichardt, H.M. Glucocorticoids in the control of neuroinflammation. *Mol Cell Endocrinol* 2007, doi: 10.1016/j.mce.2007.03.007
5. Müller, N., Tischner, D., van den Brandt, J., Reichardt, H.M. CD28 superagonistic antibodies elicit two functionally distinct waves of T cell activation. *eingereicht*
6. Wüst, S., Kleinman, A., Tischner, D., Gold, R., Tuckermann, J.P., Lühder, F., Reichardt, H.M. T cells are the essential targets of glucocorticoids in the treatment of experimental autoimmune encephalomyelitis. *eingereicht*

### 9.3 Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gehört meinem Betreuer Professor Dr. Holger Reichardt für seine stetige Diskussionsbereitschaft, die guten und hilfreichen Ratschläge sowie die ausgezeichnete Betreuung.

Dr. Jens van den Brandt danke ich für die Einführung in die Durchflusszytometrie, das stets harmonische Arbeitsklima sowie seinem Vorrat an Süßigkeiten. Frau Dr. Nora Müller danke ich für die konfokale und Rasterelektronenmikroskopie, sowie die nette Atmosphäre im Labor.

Danke auch an PD Dr. Andreas Weishaupt und Sabrina Kirch aus der Neurologie für die gute und effektive Zusammenarbeit, die ich mir nicht hätte besser vorstellen können. Ohne euch wäre das Projekt niemals so schnell und so gut vorangekommen.

Hee-Young Lim danke ich für die koreanischen Nachmittage und hoffe, dass sie auch weiterhin fleißig Deutsch lernt. Danke auch an Dr. Marco Herold für gute Ratschläge und ein tolles Arbeitsklima.

Ein besonderer Dank gilt Kati Voss und Christian Bauer, die mir immer so fleißig bei meinen großen Experimenten geholfen haben (insbesondere Danke für das frühe Aufstehen) und auch privat zur Seite gestanden haben.

Doktor Niklas Beyersdorf und PD Dr. Thomas Kerkau danke ich für die Unterstützung bei Experimenten und die stetige Diskussionsbereitschaft.

Danke auch an meine Familie, die immer für mich da ist, mich immer unterstützt hat und mich letztendlich soweit gebracht hat.

Ein ganz besonderer Dank geht an meinen Freund Thorin Geister für sein Verständnis, seine Unterstützung und Motivation, insbesondere wenn meine pessimistische Grundeinstellung mal wieder vorherrschte.

#### 9.4 Lebenslauf

Name Denise Tischner  
Geburtstag 23.08.1979  
Geburtsort Lauf a. d. Pegnitz, Deutschland  
Anschrift Marienstraße 18, 37073 Göttingen  
Familienstand ledig

Schulausbildung 1986 -1990 Grundschule Lauf, Rudolfshof  
1990 – 1999 Maria-Ward Schule,  
Sozialwissenschaftliches Gymnasium,  
Nürnberg

Studium 1999 – 2004 Studium der Diplom-Biologie  
an der Universität Bayreuth  
Vordiplom 2001  
Diplom 2004 Hauptfach: Zoologie;  
Nebenfächer: Genetik, Biochemie;  
Thema der Diplomarbeit: Soziale Konflikte  
und Immunfunktion der Milz in männlichen  
Laborratten  
Ab 2004 Promotion unter der Betreuung  
von Professor Dr. Reichardt am Institut für  
Virologie und Immunbiologie Würzburg  
Thema der Doktorarbeit: Mechanistische  
Untersuchungen zur Therapie von Multipler  
Sklerose am Beispiel der Experimentellen  
Autoimmunen Encephalomyelitis

Würzburg, den.....

.....

Denise Tischner